

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 31/03/2019.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**



---

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

---

**IRINA JIMÉNEZ GÓMEZ**

**INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO NA FUNGICULTURA DAS**  
**FORMIGAS ATÍNEAS DERIVADAS**

**Rio Claro, SP**

Março – 2017

**IRINA JIMÉNEZ GÓMEZ**

**INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO NA FUNGICULTURA DAS  
FORMIGAS ATÍNEAS DERIVADAS**

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

Orientador: Prof. Dr. André Rodrigues

**Rio Claro, SP**

Março – 2017

589.2 Jimémez Gómez, Irina  
J617i Interação patógeno-hospedeiro na fungicultura das  
formigas atíneas derivadas / Irina Jimémez Gómez. - Rio  
Claro, 2017  
65 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

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

1. Fungos. 2. Antagonismo. 3. Parasito. 4. Jardim de  
fungo. 5. Padrões de infectividade. 6. Virulência. I. Título.



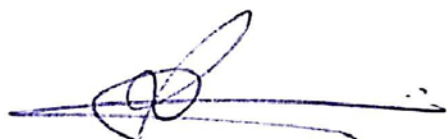
**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: INTERAÇÃO PARASITA-HOSPEDEIRO NA FUNGICULTURA DAS FORMIGAS ATÍNEAS DERIVADAS**

**AUTORA: IRINA JIMÉNEZ GOMEZ**

**ORIENTADOR: ANDRE RODRIGUES**

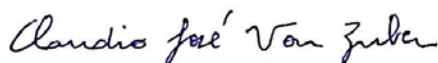
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:



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



Pós-Doutoranda SILMA LEITE ROCHA  
Departamento de Entomologia / Universidade Federal de Viçosa



Prof. Dr. CLAUDIO JOSÉ VON ZUBEN  
Departamento de Zoologia / IB Rio Claro

Rio Claro, 31 de março de 2017

Título alterado para: Interação patógeno-hospedeiro na fungicultura das formigas atíneas derivadas

*Change is the end result of the all true learning*

*- Leo Buscaglia*

*Aos meus pais, por sempre terem enfatizado a importância da educação para a vida e ao meu marido, pelo amor incondicional e pela paciência para aguentar tudo o que aprontei nesses dez anos juntos.*

## AGRADECIMENTOS

Chegar até aqui foi difícil e arriscado. Foi árduo deixar para trás minha família, meus amigos, minha cultura, minha língua e meu país. Foi arriscado deixar tudo isso, sair da minha área de conforto e entrar em um mundo novo e desconhecido.

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que fizeram o caminho mais fácil, que ajudaram a derrubar obstáculos e a ganhar força para continuar. Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais pela formação para a vida, por ensinar sobre independência, esforço, humildade, maturidade para afrontar as dificuldades e, principalmente, pela importância que sempre deram para a formação acadêmica. Ao meu marido por todo, pelo amor e apoio incondicional, por deixar tudo em Cuba e vir detrás de mim, para ficar juntos, para acompanhar meus erros e acertos, para encher meus dias dele e fazer tudo mais fácil. Obrigada por todo amor. A minha tia, minha irmã e meus sogros, pelo apoio e pela força.

Ao programa de convênio Cuba-Brasil que fez possível minha vinda em 2015. Ao meu orientador em Cuba, Julio Mena, que abriu meus olhos para o incrível mundo dos fungos e incentivou meu mestrado no exterior. À todas as pessoas do Instituto de Ecologia e Sistemática (La Habana, Cuba) que ajudaram logisticamente para materializar esta ideia, especialmente Eduardo Furrzola (Furri) e Jorge Ortiz (Yoyi).

Ao CNPq, pelo auxílio concedido (processo 190502/2014-2 - Programa PEC-PG) para a realização da minha pesquisa e ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Área: Microbiologia Aplicada) da UNESP – Rio Claro, pela oportunidade.

Ao meu orientador, Prof. Dr. André Rodrigues, por ter me aceitado como aluna sem nunca ter falado comigo (imagino que foi arriscado). Pelos milhares de documentos, cartas, carimbos e assinaturas que teve que fazer para me trazer de Cuba. Por ter aberto as portas do seu laboratório para mim como para qualquer Brasileiro, nunca senti diferenças, nem sofri preconceitos. Pelas horas dedicadas para melhorar meu trabalho e por ser um orientador muito presente e exigente (que pega no pé), isso me ajudou no crescimento pessoal e profissional.

Agradeço a todos os integrantes do LESF: Ana Maria, Camila, Luciana e Karina pela ajuda e por todo o aprendizado juntos. Ao Danilo, o primeiro brasileiro que conheci, pela ajuda para entender o funcionamento do laboratório e por ideias que mudaram minha vida enchendo tubos com meio de cultura. A Lorena por ter ficado comigo direto nos primeiros meses de aulas e de laboratório, por ensinar todas as coisas necessárias para me desenvolver sem problemas no laboratório, foi muito importante sua ajuda. Ao Júlio por ter passado parte dos métodos do experimento. Ao Quimi pelas conversas e a ajuda em momentos de

desespero. A Bruna pelo aprendizado juntas fazendo testes intermináveis com resultados legais. Ao Tássio pela grande ajuda com a estatística, pelas horas tentando entender a minha montanha de dados e pelas conversas que fizeram nascer ideias boas. A Mariana por tudo, sua ajuda foi essencial desde aquele primeiro meio (com a marca errada) e está sendo até hoje. Obrigada pelas conversas de trabalho e os artigos que passou, esses ajudaram semear um horto de ideias na minha cabeça (nem todas certas...), por passar todo o “tema formiga” para mim, desde onde comprar o pote certo até a estatística, por doar parte das suas formigas de estimação para meus experimentos e pelas horas de psicanálise no *whats*. Ao Aryel e a Lana que muito ajudaram no final, em parte “desflorestando” a UNESP para dar comida ao monte de formigas. À todos, obrigada pelo companheirismo e parceria.

Ao Prof. Dr. Odair C. Bueno, do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS/UNESP) por disponibilizar as colônias e a suas alunas, Thaís e Natália, pela ajuda e dicas para mexer com as formigas.

Ao pessoal do Laboratório de Micologia Ambiental e Industrial (LAMAI): Gabi, Juliana e Lia pela ajuda para manter as formigas presas e pelas alertas de “formigas fugindo!!!”. Agradeço, especialmente, ao Pedro pelas incontáveis viagens ao centro (de motinha, com risco de vida), para fazer todas as compras do material necessário para o experimento das formigas.

Ao pessoal do Laboratório de Genética de Bactérias (LGB), Prof. Dr. Henrique Ferreira e as suas alunas, Lúcia e Luana, pelo tempo e as tentativas de experimento.

À todas as pessoas que ajudaram para melhorar meu português com músicas, sites para treinar e corrigindo meus textos para passar as provas de idiomas Celpe-Bras (português) e a prova de português-inglês, ambas exigências do programa.

Agradeço a todos os integrantes da República Nemelés, por todo o aprendizado acerca do funcionamento do mundo fora do laboratório. Especialmente, gostaria de agradecer ao Igor “camaroncito duro”, quem me recebeu na Rep. e ajudou sempre com tudo o que não sabia e deu errado no começo (que foi tudo mesmo), obrigada pela amizade. A Cláudia, ao Chavez, ao Evaldo, a Laura, ao Thales, ao Gandhi, ao Pássaro, a Paula e ao Vinicius. Aos antigos moradores Rebeca, Paulo e Jesus. Obrigada a todos pela amizade, pelas dicas, jantas e cervejas.

Agradeço a comunidade latina de Rio Claro, que me recebeu e ofereceu sua ajuda desde o começo, especialmente a Yadira, a Paola, a Ana Maria Salazar e o Amilcar. Todos vocês contribuíram com seus ensinamentos e diferentes pontos de vista para fazer de mim uma outra pessoa, que mudou, aprendeu e cresceu, muito além da microbiologia. Obrigada!!!

## RESUMO

A fungicultura das formigas atíneas é um modelo atrativo para estudar associações parasita-hospedeiro, pois abriga um amplo número de parasitas e hospedeiros filogeneticamente diversos. As formigas atíneas dependem do cultivo obrigatório de fungos para alimentar suas crias. Nesse mutualismo, fungos do gênero *Escovopsis* atuam como parasitos especializados do fungo cultivado pelas formigas. Neste trabalho determinamos que a virulência da interação *Escovopsis*-fungo mutualista é o resultado final da susceptibilidade do hospedeiro e a infectividade do patógeno. Para tanto, foram realizados ensaios de co-cultivo *in vitro* utilizando fungos mutualistas e isolados de *Escovopsis* provenientes de colônias de formigas atíneas derivadas. Adicionalmente, foram realizados bioensaios utilizando subcolônias inoculadas com esporos de *Escovopsis*, para avaliar como a complexidade do jardim de fungo, em conjunto com as formigas, interfere na virulência da interação patógeno-hospedeiro. Os resultados indicaram que o fungo mutualista de *Trachymyrmex* sp. é mais susceptível a infecção por *Escovopsis*, quando comparado com *Leucoagaricus gongylophorus*, o fungo mutualista cultivado por *Atta sexdens rubropilosa*. Além disso, foi observado que a susceptibilidade do hospedeiro tem uma maior influência do que infectividade do patógeno, no resultado final da interação *Escovopsis*-fungo mutualista. O fator que determinou a infectividade de *Escovopsis* foi o padrão de reconhecimento frente ao hospedeiro e não a taxa de crescimento do patógeno. Embora *Escovopsis* ocasionou a morte do hospedeiro na maioria dos confrontos *in vitro*, nos experimentos realizados com subcolônias houve a morte de apenas quatro dentre as 90 réplicas tratadas com *Escovopsis*. Tendo em vista que *Escovopsis* ocasiona a morte do fungo mutualista apenas *in vitro*, ou seja, sem a proteção das interações presentes no jardim de fungo, nossos resultados sugerem que *Escovopsis* é um patógeno oportunista.

Palavras-chave: Antagonismo. Parasito. Jardim de fungo. Padrões de infectividade.

Virulência.

## ABSTRACT

Fungus-growing by attine ants is an attractive model system for studying host-parasite associations, because it harbors phylogenetically diverse parasites and hosts. These ants rely on fungal cultivation to feed their brood. In this mutualism, fungi in the genus *Escovopsis* act as specialized parasites of the ant fungal cultivar. Here, we determined that virulence of the interaction between *Escovopsis* and the mutualistic fungus is a result of the host susceptibility and the pathogen infectivity. We carried out *in vitro* dual-culture assays using mutualistic fungi and *Escovopsis* isolates from different higher-attine ant species. In addition, we performed bioassays using subcolonies inoculated with *Escovopsis* spores to evaluate how the complexity of the fungus gardens, along with the ants, interfere in the virulence of the host-pathogen interaction. Our results showed that the fungal cultivar of *Trachymyrmex* sp. is more susceptible to infection by *Escovopsis* when compared to *Leucoagaricus gongylophorus*, the mutualistic fungus cultivated by *Atta sexdens rubropilosa*. In addition, we observed that host susceptibility had a larger impact than the pathogen infectivity in the outcome of the *Escovopsis*- fungal cultivar interaction. The factor that determined the infectivity of *Escovopsis* was the patterns of host recognition but not the pathogen's growth rate. *Escovopsis* caused host death in most *in vitro* assays. On the other hand, only four out of 90 subcolonies treated with *Escovopsis* died during the experiments. Considering that *Escovopsis* caused the death of the mutualistic fungus only *in vitro* (without the protection of the interactions present in fungus garden), our results suggest that this fungus is an opportunistic pathogen.

Keywords: Antagonism. Parasite. Fungus garden. Infectivity patterns. Virulence.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. FUNDAMENTAÇÃO.....	12
2.1. <i>Formigas cultivadoras de fungos da tribo Attini</i> .....	12
2.2. <i>Comunidade microbiana do jardim de fungo e estratégias de defesa da colônia</i> .....	14
2.3. <i>Ecologia e evolução do parasito Escovopsis</i> .....	15
2.4. <i>Interação parasito-hospedeiro: definição de conceitos</i> .....	18
3. OBJETIVOS.....	20
3.1. <i>Geral</i> .....	20
3.2. <i>Específicos</i> .....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1. <i>Origem e manutenção dos fungos</i> .....	21
4.2. <i>Ensaio de co-cultivo</i> .....	22
4.2.1. <i>Preparação dos ensaios</i> .....	22
4.2.2. <i>Avaliação da susceptibilidade dos fungos mutualistas e infectividade de Escovopsis</i> .....	24
4.2.3. <i>Avaliação da virulência da interação</i> .....	24
4.3. <i>Ensaio em subcolônias</i> .....	25
5. RESULTADOS .....	27
5.1. <i>Ensaio de co-cultivo</i> .....	27
5.1.1. <i>Susceptibilidade dos fungos mutualistas</i> .....	27
5.1.2. <i>Infectividade de Escovopsis</i> .....	28
5.1.3. <i>Virulência da interação entre o fungo mutualista e Escovopsis</i> .....	30
5.2. <i>Ensaio em subcolônias</i> .....	33
6. DISCUSSÃO.....	37
7. CONCLUSÕES.....	42
REFERÊNCIAS .....	43
ANEXOS.....	52

## 1. INTRODUÇÃO

Interações parasito-hospedeiro podem ser compreendidas pela dinâmica coevolutiva entre os parceiros envolvidos e pelos processos ecológicos que afetam a especificidade dessas associações. No geral, essas relações são governadas por uma corrida armamentista, na qual o hospedeiro desenvolve defesas para impedir a ação do parasito, enquanto este desenvolve adaptações para superar as defesas do hospedeiro. Para entender os fatores que moldam as interações parasito-hospedeiro, o cenário ideal é estudar exemplos de interações que incluam uma ampla gama de parasitos e de hospedeiros filogeneticamente diversos. Nesse contexto as simbioses que ocorrem nas colônias de formigas atíneas fornecem o cenário ideal para o estudo dessas interações.

As formigas cultivadoras de fungo (Hymenoptera: Formicidae: “atíneas”) mantêm uma associação obrigatória com fungos pertencentes às famílias Agaricaceae e Pterulaceae. Nessa interação as formigas fornecem proteção e substrato vegetal para o desenvolvimento do fungo mutualista. Tal substrato pode variar desde folhas frescas até fezes e carcaças de insetos. Em contrapartida, o fungo é utilizado como única fonte de alimento para as larvas e a rainha. O substrato coletado pelas operárias é acumulado no interior da colônia em uma estrutura com aspecto esponjoso conhecida como “jardim de fungo”, na qual é encontrado o micélio do fungo mutualista.

Embora o jardim de fungo abrigue um único clone do fungo mutualista, é sabido que existe uma ampla diversidade de micro-organismos, como leveduras, fungos filamentosos e bactérias, a maioria, com funções ainda pouco conhecidas. Dentre esses micro-organismos, fungos do gênero *Escovopsis* são amplamente estudados por serem parasitos (patógenos) especializados<sup>1</sup> do fungo cultivado pelas formigas. Esse patógeno ocasiona impactos negativos severos, visto que colônias infectadas sofrem redução na taxa de crescimento do jardim de fungo, com conseqüente diminuição da produção de novas operárias. Foi sugerido que *Escovopsis* coevoluiu com o fungo mutualista e com as formigas em uma interação tripartida, entretanto, aspectos da biologia do patógeno ainda permanecem obscuros, por exemplo, o modo de transmissão desse entre colônias e os possíveis mecanismo de parasitismo. Estudos sugerem que metabólitos ativos e estruturas especializadas produzidas por *Escovopsis* promovem o parasitismo.

---

<sup>1</sup>No presente trabalho serão utilizados tanto patógeno, quanto parasita para referir a *Escovopsis*. Este fungo foi classificado como um parasito especializado e patógeno do jardim de fungo por Currie et al. (1999a).

Como resultado da coevolução da interação patógeno-hospedeiro é esperado uma especialização do parasito em determinados hospedeiros. Em relação à especificidade *Escovopsis*-fungo mutualista, foi observado uma divisão de *Escovopsis* em quatro grandes clados que estão exclusivamente associados aos seus hospedeiros (i.e. fungos mutualistas). Estes clados também estão correlacionados à grupos de formigas específicos, o que reforça a coevolução tripartida entre esses organismos. Estudos recentes suportam essa hipótese enfatizando a ocorrência de transferências horizontais ocasionais de *Escovopsis*. Entretanto, nosso grupo de pesquisa detectou transferências horizontais frequentes desse patógeno, sugerindo uma baixa especificidade entre *Escovopsis* e o hospedeiro.

A maioria dos estudos procurou entender a relação *Escovopsis*-fungo mutualista quanto a mecanismos do parasitismo, níveis de virulência e padrões de especificidade. Esses trabalhos apresentam em comum uma abordagem da interação parasita-hospedeiro centrada na ação do parasita. Contudo, poucos estudos levaram em consideração a susceptibilidade do fungo mutualista como um fator preponderante na interação com o parasita.

A relação entre o patógeno e o hospedeiro depende tanto da infectividade do patógeno, quanto da susceptibilidade do hospedeiro. O resultado da junção desses aspectos caracteriza a virulência da interação patógeno-hospedeiro. No presente trabalho procuramos responder às seguintes perguntas: (i) Como a susceptibilidade do hospedeiro e a infectividade do patógeno determinam a virulência da interação no sistema das formigas atíneas? (ii) Existem diferenças na susceptibilidade dos fungos mutualistas cultivados por formigas cortadeiras e não-cortadeiras de folhas? (iii) A velocidade de crescimento de *Escovopsis* aumenta a sua infectividade? (iv) Como a complexidade do jardim de fungo interfere na virulência da interação *Escovopsis*-fungo mutualista?

## 7. CONCLUSÕES

- Na fungicultura das formigas atíneas derivadas (cortadeiras e não-cortadeiras de folhas), a virulência da interação *Escovopsis*-fungo mutualista não é determinada pela infectividade do patógeno, mas sim pela susceptibilidade do hospedeiro.
- As diferenças na infectividade de *Escovopsis* são melhor explicadas pelos padrões de reconhecimento patógeno-hospedeiro, do que pelas taxas de crescimento do patógeno.
- A pronunciada diminuição da infectividade do patógeno nos experimentos com subcolônias (i.e. jardim com todas as defesas), quando comparado com os experimentos *in vitro*, sugere que *Escovopsis* é um patógeno oportunista.

## REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, A; LIVELY, C. M. Infection genetics: gene-for-gene versus matching-alleles models and all points in between. **Evolutionary Ecology Research**, Tucson, v. 4, n. 1, p. 91-107, 2002.
- ANTONOVICS, J.; BOOTS, M.; EBERT, D.; KOSKELLA, B.; POSS, M.; SADD, B. M. The origin of specificity by means of natural selection: evolved and nonhost resistance in host–pathogen interactions. **Evolution**, Lancaster, v. 67, n. 1, p. 1-9, 2013.
- AUGUSTIN, J. O.; GROENEWALD, J. Z.; NASCIMENTO, R. J.; MIZUBUTI, E. S. G.; BARRETO, R. W.; ELLIOT, S. L.; EVANS, H. C. Yet more “weeds” in the garden: fungal novelties from nests of leaf-cutting ants. **PLoS One**, São Francisco, v. 8, n. 12, p. 1-17, 2013.
- AYLWARD, F. O.; BURNUM, K. E.; SCOTT, J. J.; SUEN, G.; TRINGE, S. G.; ADAMS, S. M.; BARRY, K. W.; NICORA, C. D.; PIEHOWSKI, P.; PURVINE, S. O.; STARRETT, G. J.; GOODWIN, L. A.; SMITH, R. D.; LIPTON, M. S.; CURRIE, C. R. Metagenomic and metaproteomic insights into bacterial communities in leaf-cutter ant fungus gardens. **ISME Journal**, New York, v. 6, p. 1688-1701, 2012.
- BARCOTO, M. O.; PEDROSA, F.; BUENO, O. C.; RODRIGUES, A. Pathogenic nature of *Syncephalastrum* in *Atta sexdens rubropilosa* fungus gardens. **Pest Management Science**, Sussex, v. 73, n. 5, p. 999-1009, 2017.
- BIRNBAUM, S. S. L.; GERARDO, N. M. Patterns of specificity of the pathogen *Escovopsis* across the fungus-growing Ant Symbiosis. **The American Naturalist**, Chicago, v. 188, n. 1, p. 52-65, 2016.
- BUTLER, E. E. *Rhizoctonia solani* as a parasite of fungi. **Mycologia**, New York, v. 49, n. 3, p. 354-373, 1957.
- CARREIRO, S. C.; PAGNOCCA F. C.; BACCI, M. Jr.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; MIDDELHOVEN, W. J. Occurrence of killer yeasts in leaf-cutting ant nests. **Folia Microbiologica**, Praga, v. 47, n. 3, p. 259–262, 2002.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. A. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. **Infection and immunity**, Washington, v. 67, n 8, p. 3703-3713, 1999.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. A. Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. **Journal of infectious Diseases**, Chicago, v. 184, n 3, p. 337-344, 2001.

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

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

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

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

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

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

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

CURRIE, C. R.; POULSEN, M.; MENDENHALL, J. J.; BOOMSMA, J. J.; BILLEN, J. Coevolved crypts and exocrine glands support mutualistic bacteria in fungus-growing ants. **Science**, Washington, v. 311, n. 81, p. 81-83, 2006.

DE FINE LICHT, H. H.; BOOMSMA, J. J. Variable interaction specificity and symbiont performance in Panamanian *Trachymyrmex* and *Sericomyrmex* fungus-growing ants. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 14, n. 1, p. 244, 2014.

DE FINE LICHT, H.; BOOMSMA, J. J.; TUNLID, A. Symbiotic adaptations in the fungal cultivar of leaf-cutting ants. **Nature Communications**, New York, v. 5, n. 5675, 2014. doi: 10.1038/ncomms6675

ELIZONDO-WALLACE, D. E. E.; ASENSIO, J. G. V.; TOMÁS, A. A. P. Correlation between virulence and genetic structure of *Escovopsis* strains from leaf-cutting ant colonies in Costa Rica. **Microbiology**, Reading, v. 160, n. 8, p. 1727-1736, 2014.

FERNÁNDEZ-MARÍN, H.; ZIMMERMAN, J. K.; NASH, D. R.; BOOMSMA, J. J.; WCISLO, W. T. Reduced biological control and enhanced chemical pest management in the evolution of fungus farming in ants. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, London, v. 276, n. 1665, p. 2263-2269, 2009.

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

FOLGARAIT, P. J.; MARFETÁN, J. A.; CAFARO, M. J. Growth and conidiation response of *Escovopsis weberi* (Ascomycota: Hypocreales) against the fungal cultivar of *Acromyrmex lundii* (Hymenoptera: Formicidae). **Environmental Entomology**, College Park, v. 40, n. 2, p. 342-349, 2011b.

GERARDO, N. M.; CURRIE, C. R.; PRICE, S. L.; MUELLER, U. G. Exploiting a mutualism: parasite specialization on cultivars within the fungus-growing ants symbiosis. **Proceedings of The Royal Society B-Biological Sciences**, London, v. 271, n. 1550, p. 1791-1798, 2004.

GERARDO, N. M.; JACOBS, S. R.; CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G. Ancient host-pathogen associations maintained by specificity of chemotaxis and antibiosis. **PLoS Biology**, California, v. 4, n. 8, p. e235, 2006a.

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

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RIAN, P. D. Past: Palaeontological statistics software package for education and data analysis. Versão. 2.14. **Paleontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 9, 2001. Disponível em [http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/past.pdf](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/past.pdf), acessado em 20/05/2012.

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

JAENIKE, J. Suboptimal virulence of an insect-parasitic nematode. **Evolution**, Lancaster, v. 50, n. 6, p. 2241–2247, 1996.

JEŠOVNIK, A.; GONZÁLEZ, V. L.; SCHULTZ, T. R. Phylogenomics and divergence dating of fungus-farming ants (Hymenoptera: Formicidae) of the genera *Sericomyrmex* and *Apterostigma*. **PLoS One**, São Francisco, v. 11, n 7, p. e0151059, 2016.

KHANNA, D. R.; YADAV, P. R. **Biology of helminthes**. India: Discovery Publishing House, 2004. 456 p.

LITTLE, A. E. F.; CURRIE, C. R. Symbiotic complexity: discovery of a fifth symbiont in the attine ant-microbe symbiosis. **Biology Letters**, London, v. 15, n. 3, p. 501–504, 2007.

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

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

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

MEIRELLES, L. A.; SOLOMON, S.; BACCI JR.; M.; WRIGHT, A.; MUELLER, U.G.; RODRIGUES, A. Shared *Escovopsis* infections destabilize the tripartite coevolution hypothesis in the higher-attine fungus-growing ant symbiosis. **Royal Society Open Science**, London, v. 2, n. 9, p. 150257, 2015b.

MENDES, T. D.; RODRIGUES, A.; DAYO-OWOYEMI, I.; MARSON, F. A. L.; PAGNOCCA, F. C. Generation of nutrients and detoxification: possible roles of yeasts in leaf-cutting ant nests. **Insects**, [s.i.], v. 3, n. 1, p. 228-245, 2012.

MIKHEYEV, A. S.; MUELLER, U. G.; ABBOT, P. Cryptic sex and many-to-one coevolution in the fungus-growing ant symbiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America**, Washington, v. 103, n. 28, p. 10702-10706, 2006.

MIKHEYEV, A. S.; MUELLER, U. G.; ABBOT, P. Comparative dating of attine ant and lepiotaceous cultivar phylogenies reveals coevolutionary synchrony and discord. **American Naturalist**, Chicago, v. 175, n. 6, p. e126–133, 2010.

MONTOYA, Q. V.; MEIRELLES, L. A. CHAVERRI, P., RODRIGUES, A. Unraveling *Trichoderma* species in the attine ant environment: description of three new taxa. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 109, n. 5, p. 633-651, 2016.

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

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

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

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

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

OSTI, J. F. **Evidências experimentais sugerem o gênero *Escovopsioides* como parasito do fungo cultivado pelas formigas atíneas**. 2016. 38f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2016.

PAGNOCCA, F. C.; SILVA, O. A.; BERALDO, M. J. A. H.; BUENO, O. C. Toxicity of sesame extracts to the leaf-cutting ants symbiotic fungus. **Bulletin of Entomological Research**, Cambridge, v. 80, n. 3, p. 349-352, 1990.

PAGNOCCA, F. C.; MASIULIONIS, V. E.; RODRIGUES, A. Specialized Fungal Parasites and Opportunistic Fungi in Gardens of Attine Ants. **Psyche: A journal of entomology**, Cambridge, v. 2012, [s.n.], p. 1-9, 2012.

PINTO-TOMÁS, A. A.; ANDERSON, M. A.; SUEN, G.; STEVENSON, D. M.; CHU, F. S. T.; CLELAND, W.; WEIMER, P.J.; CURRIE, C. R. Symbiotic nitrogen fixation in the fungus gardens of leaf-cutter ants. **Science**, Washington, v. 326, n. 5956, p. 1120-1123, 2009.

POULIN, R.; COMBES, C. The concept of virulence: interpretations and implications. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 15, n. 12, p. 474-475, 1999.

POULSEN, M.; CURRIE, C. R. Complexity of insect-fungal associations: exploring the influence of microorganisms on attine ant-fungus symbiosis. In: BOURTZIS, K.; MILLER, T. A. (Eds.) **Insect Symbiosis**, Newbury: CRC Press, v. 2, [s.n.], p. 57-77, 2006.

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

RASBAND, W. S. **ImageJ**, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2014.

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

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

RODRIGUES, A.; BACCI, M. Jr.; MUELLER, U. G.; ORTIZ, A.; PAGNOCCA, F. C. Microfungal “weeds” in the leafcutter ant symbiosis. **Microbial Ecology**, Washington, v. 56, n. 4, p. 604-614, 2008.

RODRIGUES, A.; CABLE, R. N.; MUELLER, U. G.; BACCI, M.; PAGNOCCA, F. C. Antagonistic interactions between garden yeasts and microfungi garden pathogens of leaf-cutting ants. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 96, n. 3, p. 331-342, 2009.

RODRIGUES, A.; MUELLER, U. G.; ISHAK, H. D.; BACCI, M. Jr; PAGNOCCA, F. C. Ecology of microfungi communities in gardens of fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae): a year-long survey of three species of attine ants in Central Texas. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 78, n. 2, p. 244–255, 2011.

SANTOS, A. V.; DILLON, V. M.; REYNOLDS, S. E.; SAMUELS, R. I. Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.239, n.2, p.319-323, 2004.

SCHULTZ, T. R.; BRADY, S. G. Major evolutionary transitions in ant agriculture. **Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 105, n. 14, p. 5435-5440, 2008.

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

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

SILVA, A.; RODRIGUES, A.; BACCI Jr, M.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C. Susceptibility of the ant-cultivated fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Agaricales: Basidiomycota) towards microfungi. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 162, n. 2, p. 115-119, 2006.

SILVA-PINHATI, A. C. O.; BACCI JÚNIOR, M.; HINKLE, G.; SOGIN, M. L.; PAGNOCCA, F. C.; MARTINS, V.G.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A. Low variation in ribosomal DNA and internal transcribed spacers of the symbiotic fungi of leaf-cutting ants (Attini: Formicidae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 37, n. 10, p. 1463-1472, 2004.

SOSA-CALVO, J.; SCHULTZ, T. R.; BRANDÃO, C. R. F.; KLINGENBERG, C.; FEITOSA, R. M.; RABELING, C.; BACCI Jr, M.; LOPES, C. T.; VASCONCELOS, H. L. *Cyatta abscondita*: taxonomy, evolution, and natural history of a new fungus-farming ant genus from Brazil. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 11, p. e80498, 2013.

SUEN, G.; SCOTT, J. J.; AYLWARD, F. O.; ADAMS, S. M.; TRINGE, S. G.; PINTOTOMÁS, A. A.; FOSTER, C. E.; PAULY, M.; WEIMER, P.J.; BARRY, K. W.; GOODWIN, L. A.; BOUFFARD, P.; LI, L.; OSTERBERGER, J.; HARKINS, T. T.; SLATER, S. C.; DONOHUE, T. J.; CURRIE, C. C. An insect herbivore microbiome with high plant biomass-degrading capacity. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 6, n. 9, e1001129, 2010.

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

TAYLOR, A. L.; SASSER, J. N. Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). **Raleigh: International *Meloidogyne* Project**, NCSU & USAID Coop. Publ., 1978. 111p.

VARANDA-HAIFIG, S. S.; ALBARICI, T. R.; NUNES, P. H.; HAIFIG, I.; VIEIRA, P. C.; RODRIGUES, A. Nature of the interactions between hypocrealean fungi and the mutualistic fungus of leaf-cutter ants. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 110, n. 4, p. 593-605, 2017.

WARD, P. S.; BRADY, S. G.; FISHER, B. L.; SCHULTZ, T. R. The evolution of myrmicine ants: phylogeny and biogeography of a hyperdiverse ant clade (Hymenoptera: Formicidae). **Systematic Entomology**, Oxford, v. 40, n. 1, p. 61-81, 2015.

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