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

BEATRIZ LISBOA SANCHEZ

FUNGOS NEGROS DO TEGUMENTO DE FORMIGAS ATÍNEAS
DERIVADAS E SUAS INTERAÇÕES COM ACTINOBACTÉRIAS

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

Abril – 2019

BEATRIZ LISBOA SANCHEZ

**FUNGOS NEGROS DO TEGUMENTO DE FORMIGAS ATÍNEAS
DERIVADAS E SUAS INTERAÇÕES COM ACTINOBACTÉRIAS**

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

Orientador: Prof. Dr. André Rodrigues

Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca

Rio Claro - SP

Abril – 2019

S211f	Sanchez, Beatriz Lisboa Fungos negros do tegumento de formigas atíneas derivadas e suas interações com actinobactérias / Beatriz Lisboa Sanchez. -- Rio Claro, 2019 54 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro Orientador: André Rodrigues Coorientador: Fernando Carlos Pagnocca 1. Diversidade. 2. Interações. 3. Pseudonocardia. 4. Formigas. 5. Fungos dematiáceos. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: FUNGOS NEGROS DO TEGUMENTO DE FORMIGAS ATÍNEAS
DERIVADAS E SUAS INTERAÇÕES COM ACTINOBACTÉRIAS

AUTORA: BEATRIZ LISBOA SANCHEZ

ORIENTADOR: ANDRÉ RODRIGUES

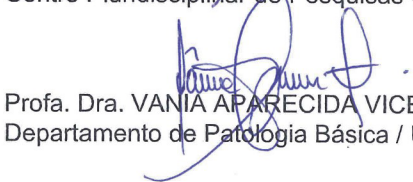
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA), área: Microbiologia Aplicada pela Comissão Examinadora:



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



Profa. Dra. DERLENE ATTALI DE ANGELIS
Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas / Universidade Estadual de Campinas



Profa. Dra. VANIA APARECIDA VICENTE
Departamento de Patologia Básica / Universidade Federal do Paraná

Rio Claro, 28 de fevereiro de 2019

*Dedico este trabalho ao meu avô, por toda a
dedicação e amor depositados em nossa família.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, por ter me dado a vida, a capacidade e a oportunidade de realizar esta pesquisa, além de ter me guardado e abençoado durante toda a duração dela.

Em segundo lugar, gostaria de agradecer à minha família; toda ela, não só a biológica, mas também a constituída durante este período de pesquisa, por todos aqueles que me acolheram e me ajudaram como podiam, que deram o melhor de si visando a minha prosperidade e bem-estar. Amo vocês de todo o meu coração.

Agradeço especialmente ao meu avô Lázaro Plácido Lisboa, cuja fé, perseverança e dedicação à pesquisa me trazem inspiração e motivação nos momentos difíceis de minha vida. Sua força e dedicação mudaram para sempre a história de nossa família e abriram os caminhos que me trouxeram até aqui.

Gostaria de agradecer também ao meu orientador, Prof. Dr. André Rodrigues, por ter confiado em mim, me concedido a oportunidade de trabalhar em seu laboratório, e pelas horas dedicadas ao meu trabalho e por tudo o que aprendi nas discussões científicas sob sua supervisão. A ele e todos que fizeram parte do Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos (LESF) em algum momento desses anos em que ali estive, deixo meu muito obrigada. Vocês foram fundamentais para o meu aprendizado e desenvolvimento acadêmico.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca, por ter acompanhado meu aprendizado em microbiologia desde o início e por ter me dado a oportunidade de trabalhar em seu laboratório durante o desenvolvimento desta pesquisa.

Agradeço a todos os profissionais que integram o Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada) ou que exercem funções que o influenciam de alguma forma. Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Microbiologia e do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), além de todos os estudantes que passaram por eles ao longo de meu mestrado. Cada um de vocês contribuiu de alguma forma para a realização de meu mestrado.

Por fim, gostaria de agradecer a todos os meus amigos e colegas, tanto os que me acompanharam desde antes do início de meu mestrado, até os que conheci ao longo do caminho. O apoio emocional de vocês, as críticas, o otimismo, os sorrisos pelos corredores e a presença de vocês na minha vida tornaram tudo melhor e mais fácil.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

*“Só se nos detivermos a pensar nas pequenas coisas
chegaremos a compreender as grandes”.*
José de Sousa Saramago

RESUMO

Os fungos negros são conhecidos por apresentarem melanina na parede celular, a qual proporciona resistência a diversos estresses ambientais. Nos últimos anos, foram descobertas várias associações entre formigas e fungos negros da ordem Chaetothyriales. No caso das formigas cultivadoras de fungos (atíneas), tais associações permanecem pouco exploradas. Fungos próximos ao gênero *Cyphellophora* (ex-*Phialophora*), encontrados no tegumento de formigas do gênero *Apterostigma* (uma atínea basal), inibem as actinobactérias simbiotes presentes no mesmo local, sendo considerados nocivos para as colônias dessas formigas. Por outro lado, espécies de fungos negros da mesma ordem foram encontradas em baixa abundância no tegumento de alados de *Atta* (uma atínea derivada). Nesse contexto, pouco se sabe sobre a abundância, diversidade e relação ecológica desses fungos em outros gêneros de atíneas derivadas. Este trabalho teve como objetivo descrever a presença e relação ecológica dos fungos negros no tegumento desses insetos. Utilizando dois métodos dependentes de cultivo, avaliamos a diversidade de fungos negros do tegumento de *Acromyrmex coronatus* (cortadeira de folhas) e *Trachymyrmex tucumanus* (não-cortadeira de folhas). Após o isolamento, os fungos foram purificados e identificados com base no sequenciamento da região ITS e um fragmento do gene *tef1*. Em seguida, foram realizados testes de co-cultivo *in vitro* entre quatro actinobactérias frente aos fungos negros obtidos das mesmas espécies de formigas. Um total de 111 fungos negros foi encontrado em ambas as espécies de formigas, incluindo: fungos da ordem Chaetothyriales (13,5 %), os gêneros *Cladosporium* (47,7 %), *Acrodontium* (10,8 %), *Oidiodendron* (10,8 %), além de outros fungos menos frequentes. Alguns dos fungos encontrados são potenciais novas espécies. Os testes de co-cultivo *in vitro* resultaram em 50 % das interações *Pseudonocardia*-Chaetothyriales semelhantes às relatadas na literatura, ou seja, o crescimento do fungo negro foi estimulado na presença da actinobactéria. Entretanto, também observamos outros tipos de interações, incluindo a inibição do crescimento dos fungos negros frente às actinobactérias. Assim, concluímos que diversos fungos negros estão associados ao tegumento dessas atíneas derivadas. Além disso, os fungos negros possivelmente desempenham outros papéis nas colônias das formigas atíneas, além do conhecido antagonismo às actinobactérias.

Palavras-chave: Interação. *Pseudonocardia*. Formigas. Fungos dematiáceos.

ABSTRACT

Black fungi are known for the presence of melanin in their cell walls, which provides resistance to different types of environmental stresses. Recently, many associations between ants and black fungi in the order Chaetothyriales have been discovered. When it comes to fungus-growing ants (the “attines”), these associations remain underexplored. Fungi related to the genus *Cyphellophora* (ex-*Phialophora*), found on the integument of *Apterostigma* ants (lower attines), inhibit the symbiotic actinobacteria also present on the ant integument, and for that are considered detrimental for the ant colonies. However, black fungi species belonging to the same order were found in low abundance on the integument of gynes and drones of *Atta* (higher attines). In this context, little is known about the abundance, diversity and ecological relation of these fungi in other genera of derived attines. The aim of this study was to describe the presence and ecological relation of black fungi on the integument of these insects. By applying two different culture dependent methods, we evaluated the diversity of black fungi on the integument of *Acromyrmex coronatus* (leafcutter) and *Trachymyrmex tucumanus* (non-leafcutter). After isolation, fungi were purified and identified based on ITS region and partial *tef1* gene sequences. Next, we put together *in vitro* co-culture assays between four actinobacteria and black fungi obtained from the same ant species. We found 111 black fungi in both species of ants, including: fungi in the order Chaetothyriales (13.5 %), the genera *Cladosporium* (47.7 %), *Acrodontium* (10.8 %), *Oidiodendron* (10.8 %), in addition to other less frequent fungi. Some of the fungi we found potentially belong to new species. The co-culture assay results were similar to the ones found in other studies in 50 % of the *Pseudonocardia*-Chaetothyriales interactions, which means in that the growth of black fungi was stimulated by actinobacteria in such cases. However, we also observed other types of interactions, including growth inhibition of black fungi cultured along with actinobacteria. We conclude that many black fungi are associated to the integument of the studied derived attines. Moreover, these black fungi may play other roles in the colonies of attine ants, other than the known antagonism to actinobacteria.

Keywords: Interaction. *Pseudonocardia*. Ants. Dematiaceous fungi.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO DA LITERATURA	10
2.1 Fungos negros em formigas	10
2.2 Formigas atíneas e os fungos negros	12
2.2.1 <i>Formigas atíneas</i>	12
2.2.2 <i>Ocorrência de fungos negros em formigas atíneas</i>	15
2.2.3 <i>Interações entre fungos negros e o sistema das formigas atíneas</i>	16
3 OBJETIVOS	17
3.1 Geral	17
3.2 Específicos	17
4 MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1 Origem do material biológico	18
4.2 Isolamento dos fungos negros	19
4.3 Isolamento das actinobactérias	20
4.4 Identificação dos micro-organismos	21
4.5 Análise de diversidade	22
4.6 Ensaios de co-cultivo pareado	22
4.7 Análise dos dados dos testes de co-cultivo	23
5 RESULTADOS	25
5.1 Isolamento e identificação de fungos negros	25
5.2 Diversidade de fungos negros	28
5.3 Isolamento e identificação das actinobactérias	29
5.4 Ensaios de co-cultivo pareado	29
6 DISCUSSÃO	31
7 CONSIDERAÇÕES	35
REFERÊNCIAS	36
APÊNDICE A – Análise filogenética de <i>Cladosporium</i> spp.	44
APÊNDICE B – Análises filogenéticas de <i>Pseudonocardia</i> spp.	47
APÊNDICE C – Fotos dos ensaios de co-cultivo	49
APÊNDICE D – Boxplots dos ensaios de co-cultivo	52

1 INTRODUÇÃO

Os fungos negros, dematiáceos ou fungos melanizados formam um grupo heterogêneo, englobando ordens como Chaetothyriales, Dothideales, Capnodiales e Venturiales (Ascomycota). A principal característica desse grupo é a coloração escura, devido à presença de melanina na parede celular das hifas. A presença de complexo melanínico também confere a esses fungos maior capacidade de adaptação em vários ambientes, proporcionando resistência a diversos fatores de estresse ambiental (EISENMAN et al., 2012; GARCÍA-RIVERA et al., 2001; TOLEDO et al., 2017).

Fungos negros da ordem Chaetothyriales, também conhecidos como leveduras negras e fungos relacionados, têm sido encontrados em associação com formigas (LITTLE; CURRIE, 2007; MAYER; VOGLMAYR, 2009). No caso das formigas que habitam em domácias (pequenas câmaras de plantas que abrigam artrópodes simbiossiontes), podem apresentar uma função alimentícia (BLATRIX et al., 2012). Nas formigas que constroem estruturas conhecidas como “papelo”, sua função tem sido considerada apenas estrutural (MAYER; VOGLMAYR, 2009); enquanto nas formigas cultivadoras de fungo, sua presença e papel permanecem pouco estudados (VASSE et al., 2017).

As formigas cultivadoras de fungo, tribo Attini, subtribo Attina (“as atíneas”), reúnem aproximadamente 250 espécies em 17 gêneros (BRANSTETTER et al., 2017, MEHDIABADI; SCHULTZ, 2010; SOSA-CALVO et al., 2018), que ocorrem exclusivamente no continente Americano (MAYHÉ-NUNES; JAFFÉ, 1998; WEBER, 1972). Elas cultivam fungos basidiomicetos como alimento há 55-60 milhões de anos, tendo co-evoluído com seus parceiros fúngicos em uma relação de mutualismo (BRANSTETTER et al., 2017; NYGAARD et al., 2016; WEBER, 1972). Nessa associação, as formigas oferecem proteção e dispersão ao fungo (LITTLE et al., 2006; MUELLER et al., 2010); em contrapartida, este é a principal fonte de alimento e parte da nutrição das operárias (QUINLAN; CHERRETT, 1979; SILVA et al., 2003).

Além do mutualismo com o fungo cultivado, a maioria das atíneas também mantém relações simbióticas com actinobactérias do gênero *Pseudonocardia*. Essas formigas possuem estruturas especializadas no exoesqueleto (tegumento), ligadas a glândulas, para abrigar e nutrir as bactérias simbiossiontes, promovendo aderência seletiva (CURRIE et al., 2006; LI et al., 2018; SCHEURING; YU, 2012). *Pseudonocardia* é capaz de inibir inimigos naturais da colônia, sendo utilizadas pelas formigas para a proteção da mesma (ABRAMOWSKI; CURRIE; POULSEN, 2011; CURRIE et al., 1999; MATTOSO et al., 2012).

Fungos negros também podem ser encontrados no tegumento de formigas atínea. Nos últimos anos, foram realizadas diversas pesquisas sobre a diversidade de fungos negros, cultiváveis e não-cultiváveis, no tegumento de formigas atíneas. Algumas dessas resultaram na descrição de novas espécies encontradas nas formigas *Atta capiguara* e *A. laevigata*, além da descoberta de algumas espécies nunca antes relatadas nesse ambiente (ATTILI-ANGELIS et al., 2014; DUARTE et al., 2016a). Alguns fungos negros encontrados em *A. capiguara* e *A. laevigata* são também fitoassociados ou patógenos oportunistas (DUARTE et al., 2014; GUEDES; ATTILI-ANGELIS; PAGNOCCA, 2012). Adicionalmente, foi relatado que *Cladosporium* é o gênero de fungo negro predominante no tegumento das saúvas (DUARTE et al., 2016b; MANTOVANI, 2013) ou, ao menos, estão entre os fungos negros em maior abundância (GUEDES; ATTILI-ANGELIS; PAGNOCCA, 2012). Ainda não existem estudos que avaliaram a relação ecológica desse gênero na simbiose formiga-fungo.

Fungos da ordem Chaetothyriales também foram isolados com grande frequência em *Apterostigma*, a qual cultiva um fungo mutualista distinto das demais atíneas (LITTLE; CURRIE, 2007). Métodos independentes de cultivo detectaram tais fungos em outras atíneas, sendo sugeridos como simbiontes do complexo sistema de interações dessas formigas. Adicionalmente, foi observado que as leveduras negras isoladas de *Apterostigma* interagem de forma antagônica com *Pseudonocardia*, encontradas no tegumento das mesmas (LITTLE; CURRIE, 2008). A inibição dessas bactérias pelas leveduras negras poderia comprometer a defesa da colônia contra potenciais patógenos, entretanto, tal papel ecológico dos fungos negros permanece sem estudos mais aprofundados.

O presente estudo buscou investigar se há compartilhamento de grupos de fungos negros entre as duas fungiculturas (de derivadas cortadeiras e não-cortadeiras de folhas). Além disso, investigamos as possíveis interações existentes entre fungos negros e actinobactérias do gênero *Pseudonocardia* encontrados no tegumento de formigas atíneas derivadas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Fungos negros em formigas

Os fungos negros, também conhecidos como dematiáceos ou fungos melanizados, compreendem várias taxa, caracterizados pela coloração escura, devido à presença de melanina em sua parede celular. Esses fungos podem apresentar rotas metabólicas para mais de uma classe de complexos melanínicos, como eumelanina, pheomelaninas, piomelaninas, entre outras (GOSTINCAR et al., 2018; TEIXEIRA et al., 2017; TOLEDO et al., 2017). A presença desses complexos também influencia a biologia desses fungos, podendo atuar na morfogênese e expressão de fatores de virulência, além de proporcionar tolerância a diversos fatores de estresse ambiental, como radiação UV, temperatura, agentes oxidantes e antibióticos (EISENMAN et al., 2012; GARCÍA-RIVERA et al., 2001; TOLEDO et al., 2017).

Os fungos negros da ordem Chaetothyriales são encontrados em associação com formigas (MAYER; VOGLMAYR, 2009; LITTLE; CURRIE, 2007). Apesar disso, essas associações permanecem pouco conhecidas, tanto em relação à diversidade dos fungos, quanto ao papel que exercem para as formigas (VASSE et al., 2017). A maior parte desses fungos parece ser composto de espécies novas, havendo ainda muito a ser investigado sobre essas relações e os organismos que as compõem.

As associações entre os Chaetothyriales e as formigas podem ser divididas em três grupos (VASSE et al., 2017): (i) fungos negros associados ao “papelão” (*carton*) construído por algumas formigas; (ii) fungos negros associados à simbiose planta-formiga; e (iii) fungos negros associados às formigas atíneas. O último grupo é o foco deste estudo e será tratado no item 2.2.

Muitas espécies de formigas possuem a habilidade de construir estruturas semelhantes a papelão (Figura 1) em seus ninhos. Estas estruturas podem ser utilizadas na construção do ninho como um todo (BLAIMER, 2010), ou apenas em parte dele, para criar repartições (MAYER; VOGLMAYR, 2009), formar passarelas e galerias para a captura de presas (SCHMIDT; DEJEAN, 2018) ou, até mesmo, cobrir e proteger seus trofobiontes hemípteros (GIBERNAU; DEJEAN, 2001). Essas estruturas contêm micélio fúngico, o qual cresce nos “papelões” e é cultivado pelas formigas com uma função estrutural para o “papelão”. Esses micélios ajudam a estabilizar os demais componentes utilizados na construção do “papelão”, como detritos de matéria orgânica, solo ou fibras de plantas (MAYER; VOGLMAYR, 2009).

Os fungos encontrados em maior abundância neste local e que podem ser isolados de pedaços de hifas são pertencentes às ordens Chaetothyriales e Capnodiales (BRINKER et al., 2019; MAYER; VOGLMAYR, 2009; NEPEL et al., 2014). Em um mesmo pedaço de “papelão”, podem ser encontradas diferentes espécies de Chaetothyriales, as quais apresentam pouca especificidade em relação à sua formiga de origem (MAYER; VOGLMAYR, 2009; NEPEL et al., 2014).

Outras formigas que convivem frequentemente com fungos da ordem Chaetothyriales são aquelas que vivem em simbiose com plantas. Esses insetos se abrigam em estruturas ocas e especializadas, chamadas domácias (Figura 1). A simbiose formiga-planta é exclusiva das regiões tropicais. As formigas vivem em sua planta hospedeira por toda a vida e recebem proteção e alimento da mesma, de forma direta ou indireta. Por sua vez, a planta recebe proteção contra herbívoros e patógenos, poda de competidoras vizinhas e nutrientes que provêm da atividade das formigas (HEIL; MCKEY, 2003; MAYER et al., 2014; ROSUMÉK et al., 2009).

A presença de fungos em domácias ocupadas por formigas é amplamente conhecida. O que tem sido investigado recentemente é a natureza desses fungos e de sua relação com a simbiose formiga-planta (BLATRIX et al., 2013; DEFOSSEZ et al., 2011; MAYER et al., 2018). Fungos da ordem Chaetothyriales, se encontram presentes em uma fina camada na parede interna de cada domácia (BLATRIX et al., 2013; VOGLMAYR et al., 2011; Figura 1).

Figura 1. Fungos negros e a associação com formigas não atíneas.



A: Operárias de *Afomomyrmex afer* na entrada de uma domácia de *Leonardoxa africana letouzeyi*; B: Operárias de *Petalomyrmex philax* na entrada de uma domácia de *L. a. africana*; C e D: domácias de *L. a. letouzeyi* (C) e *L. a. africana* (D) cortadas longitudinalmente, expondo o interior, recoberto por finas camadas negras; E: Ninho arbóreo de *Crematogaster castanea tricolor*, com parte externa composta por “papelão”; F: Armadilhas de “papelão” com operárias de *Azteca brevis* escondidas nos buracos com mandíbulas abertas, aguardando suas presas.

Barras de escala das imagens A a D correspondem a 3 mm.

Fonte: elaborada pela autora, com imagens de Vittecoq et al. (2011, A a D), Wild (2008, E) e Schmidt e Dejean (2018, F).

Investigações recentes demonstraram que algumas dessas formigas cultivam Chaetothyriales em suas colônias, sendo transmitidos verticalmente, adubados e utilizados pelas mesmas como fonte de alimento (BLATRIX et al., 2012, 2013; DEFOSSEZ et al., 2011; MAYER et al., 2018). Embora algumas linhagens sejam claramente simbiontes de suas formigas associadas, é fato que os ninhos podem ser colonizados por espécies oportunistas de Chaetothyriales (VASSE et al., 2017).

2.2 Formigas atíneas e os fungos negros

2.2.1 Formigas atíneas

As formigas cultivadoras de fungos (Hymenoptera: Formicidae), também conhecidas como atíneas, pertencem à tribo Attini, subtribo Attina, a qual reúne aproximadamente 250 espécies de 17 gêneros (BRANSTETTER et al., 2017, MEHDIABADI; SCHULTZ, 2010; SOSA-CALVO et al., 2018). Esses insetos habitam somente o continente americano, desde o norte da Argentina até o sul dos Estados Unidos (MAYHÉ-NUNES; JAFFÉ, 1998; WEBER, 1972). Elas são classificadas em dois clados principais: as mais basais do clado Paleoattina, e as mais derivadas, do clado Neoattina (SOSA-CALVO et al., 2018)

Há 55-60 milhões de anos, essas formigas cultivam fungos como alimento. Como resultado dessa co-evolução, ambos os organismos desenvolveram adaptações recíprocas (BRANSTETTER et al., 2017; NYGAARD et al., 2016; WEBER, 1972). O fungo mutualista é cultivado em uma estrutura conhecida como jardim de fungo (WEBER, 1972). Este compreende fragmentos de matéria orgânica, encontrados e depositados pelas operárias, além do micélio do fungo. Ele é a única fonte de alimento para as larvas e parte da nutrição das operárias (QUINLAN; CHERRETT, 1979; SILVA et al., 2003).

Como forma de promover alguma estabilidade ao mutualismo (RUSSELL; SANDERS; MOREAU, 2017), ambos os parceiros alinham seus interesses reprodutivos. Deste modo, a transferência de genes do fungo mutualista se dá de modo vertical, durante o voo nupcial das fêmeas aladas (MUELLER et al., 2010). Na fundação de uma nova colônia, a rainha fundadora traz de sua colônia natal um pedaço do fungo cultivado. O fragmento de fungo é carregado em uma cavidade (infrabucal) e, no momento da fundação da colônia, este é regurgitado e cultivado pela rainha (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

A fungicultura das formigas atíneas é dividida em cinco sistemas. Os três principais compreendem fungos basidiomicetos da tribo Leucocoprinae (Agaricales: Agaricaceae). Elas

são: fungicultura basal; fungicultura derivada e fungicultura das formigas-cortadeiras de folhas, um tipo de fungicultura derivada. A maior parte das *Paleoattina* pratica o primeiro tipo, enquanto a maior parte das *Neoattina* pratica a fungicultura derivada. Há também exceções ao cultivo dos *Leucocoprinae*, como é o caso da fungicultura de fungos coral (fungos da família *Pterulaceae*) e a fungicultura de leveduras, realizadas por algumas espécies de *Apterostigma* e algumas espécies de *Cyphomyrmex* gr. *rimosus*, respectivamente (SCHULTZ; BRADY, 2008).

As atíneas não-cortadeiras de folhas da fungicultura derivada, gêneros *Sericomyrmex* e *Trachymyrmex*, utilizam principalmente matéria vegetal morta como substrato para o cultivo do fungo mutualista (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; JEŠOVNIK; CHAUL; SCHULTZ, 2018; WEBER, 1972). As linhagens de fungos cultivadas nesse sistema descendem daquelas da fungicultura basal, porém são consideradas mais “domesticadas”. Algumas evidências que sugerem essa “domesticação” são as maiores modificações para o mutualismo com as formigas (SCHULTZ; BRADY, 2008), como a presença de gongilídeos e a aparente incapacidade de vida livre, ou seja, o fungo não ser encontrado no ambiente sem a presença das formigas.

Os gêneros mais derivados de formigas cultivadoras de fungos são *Acromyrmex* e *Atta*. Eles são conhecidos como formigas cortadeiras de folhas e popularmente denominadas de saúvas e quenquéns. Esses insetos utilizam folhas e flores frescas como substrato para cultivar o fungo (FINE LICHT; BOOMSMA, 2010), diferentemente das atíneas mais basais, que cultivam o fungo em matéria orgânica morta (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Há ainda preferência por algumas espécies vegetais, relacionada à necessidade nutricional do fungo cultivado (ARENAS; ROCES, 2016).

Pelo comportamento de cortar folhas e flores frescas, as formigas cortadeiras são consideradas pragas agrícolas. Danificam áreas de pastagens e áreas cultivadas, ocasionando impacto negativo na economia de vários países (DELLA LÚCIA; et al, 2014). No entanto, não se pode negar a sua importância para os ecossistemas. São importantes dispersoras de sementes, além de aumentarem a aeração, drenagem e enriquecimento dos solos com a construção dos ninhos, tendo importante papel na ciclagem de nutrientes (DELLA LÚCIA; SOUZA, 2011; SOUSA-SOUTO, et al., 2012).

Devido ao comportamento de forrageamento das operárias é esperado que a entrada de potenciais competidores do fungo mutualista seja constante (PAGNOCCA et al., 2011). Em razão disto, as formigas cultivadoras de fungos desenvolveram uma série de estratégias profiláticas para garantir o controle de potenciais patógenos e a sobrevivência do fungo

cultivado (LITTLE et al., 2006; RODRIGUES et al., 2008). Apesar de estarem constantemente mantendo as ameaças sob controle, diversos micro-organismos habitam as colônias dessas formigas (POULSEN; CURRIE, 2006; RODRIGUES et al., 2011), porém, pouco se sabe sobre a possível função de muitos deles, como é o caso dos fungos melanizados.

A maioria dos gêneros de formigas cultivadoras de fungo apresenta uma simbiose com actinobactérias do gênero *Pseudonocardia*, que parece ter se iniciado há aproximadamente 49 milhões de anos (CAFARO; CURRIE, 2005; LI et al., 2018). Essas bactérias se encontram, principalmente, em estruturas especializadas do exoesqueleto, tais como propleura, dorso e mesopleura. Elas são ligadas a glândulas, que parecem ser responsáveis por nutrir as bactérias, promovendo aderência seletiva (CURRIE et al., 2006; SCHEURING; YU, 2012; LI et al., 2018).

As linhagens de *Pseudonocardia* são transmitidas verticalmente, apresentando especificidade com sua formiga de origem (LI et al., 2018; CAFARO et al., 2011). Porém, algumas linhagens encontradas em colônias de formigas atíneas se mostraram relacionadas a linhagens de vida livre (ou seja, encontradas fora das colônias das atíneas) ou também a linhagens provenientes de outras formigas atíneas. Isto sugere que também ocorre a reaquisição e a troca de linhagens de *Pseudonocardia* (MUELLER et al., 2010; CAFARO et al., 2011).

As *Pseudonocardia* do tegumento de formigas são capazes de inibir o parasita específico do ambiente das colônias de atíneas, o fungo do gênero *Escovopsis* (CURRIE et al., 1999; MEIRELLES et al., 2014). Isto indica que o papel destas é, supostamente, aumentar a capacidade das formigas de evitar contaminações na colônia, complementando seus mecanismos comportamentais (CAFARO et al., 2011; CURRIE; STUART, 2001; FINE LICHT; BOOMSMA, 2010). Ainda, quando infectados experimentalmente por *Escovopsis*, as operárias podem apresentar maiores níveis de abundância de *Pseudonocardia* (CURRIE et al., 2003). Há ainda, evidências de que operárias de diferentes castas apresentam diferenças no uso de *Pseudonocardia* para evitar o desenvolvimento de patógenos (ABRAMOWSKI; CURRIE; POULSEN, 2011).

Há autores que sugerem que as actinobactérias não atuam especificamente contra o parasita *Escovopsis*, mas seus metabólitos são utilizados para controlar o crescimento de diversos micro-organismos indesejados (MATTOSO et al., 2012; MUELLER, 2012). O estudo de Meirelles e colaboradores (2014) demonstrou que a inibição promovida por diferentes linhagens de *Pseudonocardia*, isoladas de *Trachymyrmex* spp., é de amplo espectro,

sendo capazes de inibir linhagens de *Escovopsis* isoladas de diferentes gêneros de formigas cultivadoras de fungos. O estudo de Mattoso et al. (2012) demonstrou que linhagens de *Pseudonocardia* isoladas de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* podem inibir fungos entomopatogênicos, podendo beneficiar as formigas diretamente, não apenas frente a *Escovopsis*.

2.2.2 Ocorrência de fungos negros em formigas atíneas

Outros micro-organismos presentes no tegumento das formigas atíneas são os fungos negros. Os fungos negros da ordem Chaetothyriales foram relatados em abundância no tegumento das atíneas pela primeira vez em 2007 (LITTLE; CURRIE, 2007). Esta descoberta foi realizada em formigas do gênero *Apterostigma*, a qual pratica a fungicultura de fungos coral. Os fungos negros frequentemente isolados dessas formigas se encontravam na região especializada em abrigar *Pseudonocardia* (no caso dessas formigas, a propleura). Os autores também tentaram isolar os mesmos fungos de outros gêneros de formigas. As tentativas não foram bem-sucedidas, uma vez que nenhum isolado fúngico foi obtido. Entretanto, fungos filogeneticamente próximos foram encontrados utilizando métodos independentes de cultivo (LITTLE; CURRIE, 2007). Pelo fato de serem encontrados em diversas formigas, Chaetothyriales próximos ao gênero *Cyphelophora* (ex-*Phialophora*, VASSE et al., 2017) foram aclamados como simbiossiontes das atíneas (LITTLE; CURRIE, 2007).

Nos últimos anos, houve algumas pesquisas sobre a diversidade dos fungos negros, cultiváveis e não-cultiváveis, no ambiente das formigas atíneas. Alguns desses estudos proporcionaram a descrição de um gênero e dez novas espécies encontradas no tegumento de alados de *Atta capiguara* e *A. laevigata* (ATTILI-ANGELIS et al., 2014; DUARTE et al., 2016a). Dentre as espécies descritas nesses estudos, estão duas espécies do gênero *Phialophora*, seis espécies do gênero *Xenopenidiella*, uma espécie de *Penidiellopsis* e uma espécie de *Simplicidiella*, gênero criado somente para acomodar *Simplicidiella nigra*. Além disso, foi relatada a presença de outras espécies que ainda não haviam sido observadas nesse ambiente (DUARTE et al., 2016a).

Alguns fungos negros encontrados em *A. capiguara* e *A. laevigata* são também fitoassociados ou patógenos oportunistas de animais (DUARTE et al., 2014; GUEDES; ATTILI-ANGELIS; PAGNOCCA, 2012). Além disso, também foi relatado que os fungos do gênero *Cladosporium* são os fungos negros predominantes em tegumentos das saúvas

(DUARTE et al., 2016b; MANTOVANI, 2013), ou ao menos fazem parte do grupo de fungos negros em maior abundância (GUEDES; ATTILI-ANGELIS; PAGNOCCA, 2012).

2.2.3 Interações entre fungos negros e o sistema das formigas atíneas

Apesar dos estudos sobre a ocorrência de fungos negros no tegumento de atíneas, pouco se sabe sobre a função deles na simbiose formiga-fungo. De modo geral, foi sugerido que a presença dos Chaetothyriales em colônias de formigas pode ser facilitada pela capacidade, de muitas espécies dessa ordem, de metabolizar hidrocarbonetos aromáticos e metabólitos secundários. Estas características demonstram a plasticidade desses fungos e a capacidade deles de viverem em ambientes desfavoráveis a outros fungos (DUARTE et al., 2014; VOGLMAYR et al., 2011; VASSE et al., 2017). Este é o caso do ambiente do tegumento das formigas atíneas, que além de ser modulado por elas por uma série de substâncias antimicrobianas, é rico em hidrocarbonetos (VANDER MEER; MOREL, 1998; GIBBS, 1998).

Apesar da escassez de estudos sobre as interações entre os fungos negros do ambiente das atíneas e os demais organismos do mesmo ambiente, o estudo de Little e Currie (2008) procurou investigar o papel das leveduras negras na simbiose das *Apterostigma* cultivadoras de fungos coral. Testes *in vitro* avaliaram as interações entre os Chaetothyriales e as *Pseudonocardia* presentes na mesma espécie de *Apterostigma*. Os resultados demonstraram a interação antagônica dos isolados fúngicos, sendo os Chaetothyriales próximos à *Cyphellophora* (ex-*Phialophora*) beneficiados em co-cultivo com as *Pseudonocardia*, em detrimento das mesmas (LITTLE; CURRIE, 2008).

Tal vantagem dos fungos negros sobre as *Pseudonocardia* aponta para o possível comprometimento das defesas das colônias de *Apterostigma* pela presença desses fungos, sendo indiretamente prejudiciais ao sistema das formigas estudadas (LITTLE; CURRIE, 2008). Apesar disto, o papel dos fungos negros do tegumento de formigas atíneas de outros sistemas de fungicultura ainda não foi elucidado.

O presente trabalho buscou investigar as possíveis interações existentes entre fungos negros e actinobactérias do gênero *Pseudonocardia* encontrados no microambiente de formigas atíneas derivadas. Além disso, investigamos se há compartilhamento de espécies de fungos negros entre as duas fungiculturas (de cortadeiras e não-cortadeiras de folhas). Nossa intenção foi contribuir para a elucidação da relação dessas actinobactérias com fungos negros que coabitam o tegumento das formigas atíneas.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Descrever a diversidade e o papel dos fungos negros do tegumento de atíneas derivadas.

3.2 Específicos

- Descrever a diversidade dos fungos negros cultiváveis do tegumento de *Acromyrmex coronatus* e *Trachymyrmex tucumanus*.
- Determinar a interação entre fungos negros e actinobactérias obtidas dessas mesmas formigas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Origem do material biológico

Colônias de dois gêneros de atíneas derivadas foram localizadas no Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista (UNESP). As coletas foram realizadas nos meses de Junho, Agosto e Setembro de 2017. Foram localizadas seis colônias de *Acromyrmex coronatus* e sete de *Trachymyrmex tucumanus*, sendo a primeira cortadeira de folhas e a segunda não-cortadeira de folhas (Figura 2 e Tabela 1).

Tabela 1. Dados das colônias de atíneas derivadas utilizadas neste trabalho.

Código da colônia	Espécie de atínea	Coordenadas geográficas	Local encontrado
BLS170801-01	<i>Acromyrmex coronatus</i>	22°23'41,22'' S 47°32'43,98'' W	Árvore
BLS170901-01	<i>Acromyrmex coronatus</i>	22°23'41,28'' S 47°32'47,40'' W	Árvore
BLS170906-01	<i>Acromyrmex coronatus</i>	22°23'39,72'' S 47°32'47,40'' W	Superfície do solo, ao lado de um tronco
BLS170906-02	<i>Acromyrmex coronatus</i>	22°23'41,52'' S 47°32'42,42'' W	Árvore
BLS170911-01	<i>Acromyrmex coronatus</i>	22°23'46,26'' S 47°32'41,28'' W	Árvore
BLS170911-01	<i>Acromyrmex coronatus</i>	22°23'40,20'' S 47°32'42,18'' W	Superfície do solo
BLS170617-01	<i>Trachymyrmex tucumanus</i>	22°23'46,62'' S 47°32'46,14'' W	Subterrâneo
BLS170617-02	<i>Trachymyrmex tucumanus</i>	22°23'46,62'' S 47°32'45,92'' W	Subterrâneo
BLS170617-03	<i>Trachymyrmex tucumanus</i>	22°23'46,50'' S 47°32'45,66'' W	Subterrâneo
BLS170617-04	<i>Trachymyrmex tucumanus</i>	22°23'47,70'' S 47°32'45,18'' W	Subterrâneo
BLS170618-01	<i>Trachymyrmex tucumanus</i>	22°23'47,84'' S 47°32'45,18'' W	Subterrâneo
BLS170618-02	<i>Trachymyrmex tucumanus</i>	22°23'45,96'' S 47°32'42,72'' W	Subterrâneo
BLS170618-03	<i>Trachymyrmex tucumanus</i>	22°23'46,02'' S 47°32'42,42'' W	Subterrâneo

Fonte: elaborado pela autora.

O jardim de fungo das colônias foi exposto conforme método descrito em Rodrigues et al. (2009). Fragmentos de jardim contendo as operárias e crias foram coletados em recipientes estéreis, contendo uma fina camada de gesso umedecido (para evitar a perda de umidade dos

jardins). A coleta dessas amostras foi realizada com auxílio de uma pinça entomológica e colher, ambas esterilizadas. A coleta dos jardins de fungo e não somente das operárias foi necessária para manter as formigas vivas durante mais tempo no laboratório.

Figura 2. Exterior dos ninhos e operárias das espécies de atíneas derivadas estudadas.



Exterior do ninho de *Acromyrmex coronatus* e operária (esquerda). Entrada do ninho de *Trachymyrmex tucumanus* e operária (direita).

Fonte: elaborado pela autora. Imagens dos ninhos obtidas pela autora e imagens das formigas obtidas por Wild (2007, 2009)

4.2 Isolamento dos fungos negros

Foram utilizados dois métodos para o isolamento dos fungos negros: flotação em óleo mineral (IWATSU; MIYAJI; OKAMOTO, 1981; SATOW et al., 2008) e cultivo sem nitrogênio (DUARTE, 2016; THANH, 2006). Ao todo, utilizamos 288 operárias de *A. coronatus* e 336 de *T. tucumanus* para os isolamentos dos fungos. Foi utilizado um *pool* de operárias nos isolamentos como uma forma de aumentar a chance de sucesso na recuperação dos fungos negros.

No método de flotação em óleo mineral as formigas inteiras foram submersas em tubos com 25 mL de solução salina contendo 200 U de penicilina G, 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cloranfenicol; 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de estreptomicina e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cicloheximida (Sigma). Foram utilizadas quatro operárias de *T. tucumanus* ou uma operária de *A. coronatus* por tubo, sendo utilizados oito tubos por colônia. Os tubos foram incubados durante 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 5 mL de óleo mineral esterilizado a cada tubo,

seguido por agitação vigorosa de 5 minutos e descanso de 20 minutos. Aliquotas de 100 μL foram retiradas da interface água-óleo e semeadas em meio Ágar Mycosel (em g L^{-1} : 15 ágar, 10 hidrolisado papaínico de farinha de soja, 0,4 cicloheximida, 0,05 cloranfenicol). As placas (uma por tubo) permaneceram incubadas a 25 °C, até o aparecimento de colônias fúngicas (o que ocorreu até 40 dias). Os tubos contendo a solução salina e o óleo mineral foram incubados a 25 °C durante 45 dias. Quando observados micélios negros nas paredes dos tubos, os fungos foram transferidos para meio Ágar Mycosel, para isolamento.

O método de cultivo sem nitrogênio consistiu em colocar uma operária de cada colônia da espécie *A. coronatus* ou duas de cada colônia de *T. tucumanus* em 1-4 mL de água destilada, em sonicador, durante 15 minutos. Uma alíquota de 150 μL da suspensão obtida foi semeada no meio de cultivo sem nitrogênio (em g L^{-1} : 20 glicose, 20 ágar, 0,85 KH_2PO_4 , 0,15 K_2HPO_4 , 0,5 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 NaCl, 0,1 $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,5 mg H_3BO_3 , 0,04 mg $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,1 mg KI, 0,2 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,4 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,2 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,4 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), descrito por Thanh (2006). As placas foram incubadas a 25 °C, durante três semanas.

Os fungos isolados foram obtidos em culturas puras em Ágar Malte 2 % (MA2 %, em g L^{-1} : 20 extrato de malte e 15 ágar). Posteriormente, foram preparadas culturas estoque em meio de cultivo MA 2% em tubo inclinado. Todas as culturas estoque foram armazenadas a 8 °C.

4.3 Isolamento das actinobactérias

As actinobactérias foram isoladas segundo o método descrito por Poulsen et al. (2005). Resumidamente, cada formiga teve a propleura raspada com uma agulha esterilizada. No caso de *T. tucumanus*, foram raspados também da região superior do tórax e cabeça, regiões nas quais as actinobactérias também se encontravam visíveis. O conteúdo raspado foi semeado em uma placa contendo meio Ágar Quitina (em g L^{-1} : 0,001 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,001 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,01 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,367 KH_2PO_4 , 0,5 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,767 K_2HPO_4 , 4 Quitina, 20 ágar) suplementado com 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cicloheximida e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nistatina (CAFARO; CURRIE, 2005).

De cada colônia, foram utilizadas três operárias para os isolamentos. As placas foram incubadas a 28 °C, até o surgimento de colônias de actinobactérias, as quais foram transferidas para novas placas contendo meio *Yeast Malt Agar* (YMA; em g L^{-1} : 3 extrato de

levedura, 3 extrato de malte, 5 peptona A, 10 dextrose e 20 ágar). As actinobactérias isoladas foram mantidas em tubos inclinados a 28 °C, até o final da realização dos experimentos.

4.4 Identificação dos micro-organismos

Para a identificação foi realizado o sequenciamento parcial do gene que codifica para o fator de alongação alfa (*tef1*) para fungos do gênero *Cladosporium* (previamente identificados em microscopia). Para os demais fungos foi realizado o sequenciamento completo da região ITS e para as bactérias o sequenciamento parcial do gene que codifica para o rRNA 16S. A montagem da reação de amplificação foi realizada conforme descrito por Groenewald et al. (2005), para os isolados de *Cladosporium*, e Duarte et al. (2014) para os demais fungos. A região ITS foi amplificada com os *primers* ITS1 e ITS4 (WHITE et al., 1990), o gene *tef1* com os *primers* EF728F e EF986R (CARBONE; KOHN, 1999) e a região 16S com os *primers* F27 e R1492 (LANE, 1991). As condições de amplificação seguiram os protocolos de Groenewald et al. (2005) e Duarte et al. (2014) para fungos e Meirelles et al. (2014) para as actinobactérias. Os produtos amplificados foram purificados com o *Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega).

O sequenciamento bi-direcional foi realizado para cada amostra utilizando *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Life Technologies). As condições da reação no termociclador seguiram as instruções do fabricante. As sequências *forward* e *reverse* foram geradas no sequenciador ABI 3500 (Life Technologies) e então editadas no programa BioEdit v7.1.3 (HALL, 1999) para a geração de *contigs*. As sequências foram então comparadas com sequências depositadas na base de dados do GenBank.

Também com o objetivo de permitir a identificação de isolados sem identificação morfológica preliminar, as sequências obtidas foram alinhadas com sequências de referência disponíveis no GenBank, com o *software* MAFFT *online* (KATO et al., 2017). A partir dos alinhamentos, foram inferidas árvores filogenéticas utilizando o algoritmo de *neighbor joining*, no *software* MEGA v. 7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016). As inferências foram realizadas utilizando o modelo de Kimura 2-parâmetros, com exclusão total dos sítios contendo *gaps*. O suporte das árvores foi calculado baseado em 1.000 réplicas de *bootstrap*. As árvores foram editadas no *software* Adobe Illustrator CC (2017).

4.5 Análise de diversidade

Com o intuito de descrever a diversidade de fungos encontrados no tegumento de *A. coronatus* e *T. tucumanus*, os resultados obtidos nos isolamentos foram submetidos a análises no *software* EstimateS v.9.1.0 (COLWELL; ELSENJOHN, 2014). Foram calculados os índices de diversidade de Shannon, Simpson inverso e o de riqueza estimada Chao 1; além dos índices de compartilhamento de grupos de Sonresen e Jaccard. Os índices de diversidade foram submetidos ao teste t de diversidade no programa PAST 3.0 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001), para avaliar se existem diferenças significativas.

4.6 Ensaios de co-cultivo pareado

Para avaliar as interações entre fungos negros e actinobactérias isoladas da mesma espécie de formiga, foi utilizado o método descrito por Meirelles e colaboradores (2014), com adaptações. As principais modificações estão relacionadas à forma de inserir o disco de micélio na placa e a distância entre isolados de fungo e bactéria (Figura 3). Quanto aos isolados de fungos utilizados, foram escolhidos quatro isolados de cada táxon, para cada espécie de formiga, sendo eles: Chaetothyriales; *Cladosporium* e outros clados de fungos mais frequentes. Os isolados escolhidos pertencem aos grupos de fungos mais frequentes, representando a diversidade encontrada. Em relação às actinobactérias, foram escolhidos dois isolados de *Pseudonocardia* sp. de cada formiga.

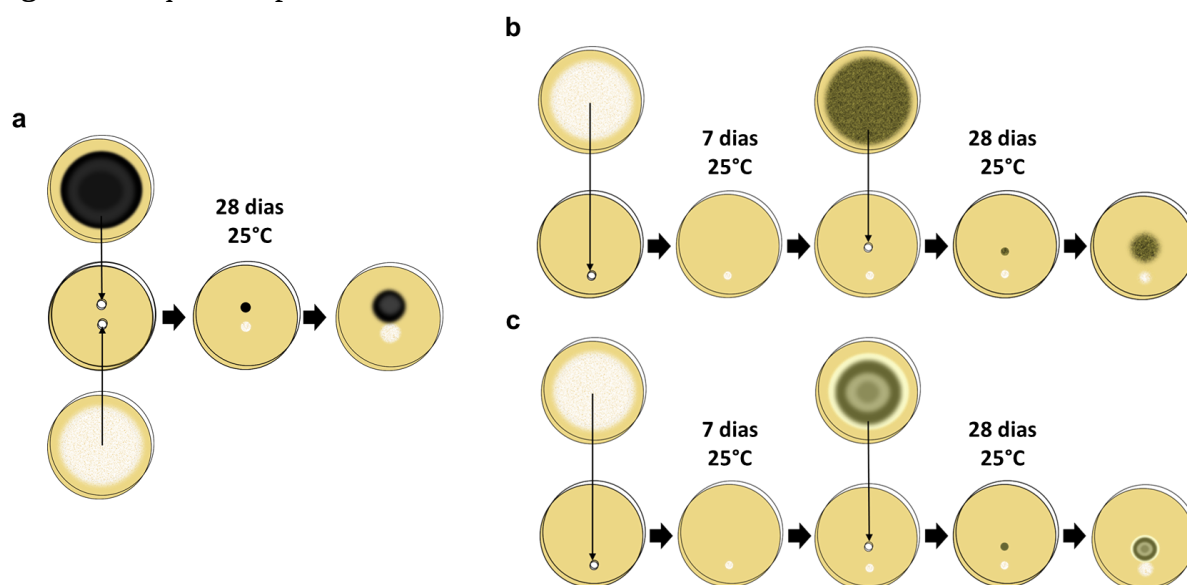
Blocos de cinco mm de diâmetro contendo uma colônia de *Pseudonocardia*, cultivada previamente em YMA durante 21 dias a 25 °C, foram inoculados a 2,75 cm da borda de placas de 60 x 15 mm, contendo meio YMA, em um espaço de mesmo diâmetro, previamente recortado (Figura 3). Apenas uma linhagem de *Pseudonocardia* sp. foi semeada por placa. Em seguida, um bloco de cinco mm de diâmetro contendo micélio de Chaetothyriales, cultivado previamente em YMA por 21 dias, no escuro, a 25 °C, foi inoculado a cinco mm de distância do inóculo da actinobactéria. Esse sistema foi incubado por mais 28 dias, nas mesmas condições.

Para os ensaios com os demais isolados fúngicos, foi realizada a semeadura das actinobactérias a 1 cm da borda de placas de 90 x 15 mm, sete dias antes da inoculação do fungo negro nas placas, devido ao crescimento mais acelerado desses. Após sete dias, no escuro, a 25 °C, foi semeado um bloco de 5 mm de diâmetro de cada fungo, previamente cultivados por 14 dias. Os fungos do gênero *Cladosporium* foram inoculados a 2 cm das

actinobactérias, enquanto os outros fungos foram inoculados a 1,5 cm das mesmas, devido as diferenças de crescimento. Após a inoculação dos fungos, as placas foram incubadas por mais 28 dias, nas mesmas condições (Figura 3).

Um total de 44 confrontos entre *Pseudonocardia*-fungos negros foi realizado, sendo que cada um compreendeu seis placas. Como controle, blocos de cinco mm de diâmetro contendo micélio de cada isolado de fungo negro foi adicionado ao meio YMA, sem a presença das bactérias (controle do experimento). Nesses experimentos também foram utilizadas seis placas. Ao fim do período de incubação de 28 dias, a 25 °C, no escuro, as placas foram marcadas e digitalizadas em *scanner* (HP Deskjet F2050). A área de crescimento micelial dos fungos (em cm²) foi medida utilizando o *software* ImageJ v. 1.38 (ABRÀMOFF; MAGALHÃES; RAM, 2004).

Figura 3. Esquema representativo dos ensaios de co-cultivo.



a: confrontos Chaetothyriales-*Pseudonocardia*; b: confrontos *Cladosporium*-*Pseudonocardia*; c: confrontos *Oidiodendron-Pseudonocardia* e *Acrodontium-Pseudonocardia*

Círculos com contorno preto indicam cortes no ágar, círculos brancos sem contorno representam *Pseudonocardia*. Círculos escuros representam fungos melanizados.

Fonte: elaborado pela autora. Método modificado de Meirelles et al. (2014).

4.7 Análise dos dados dos testes de co-cultivo

Os dados de área de crescimento micelial foram avaliados quanto a normalidade e homocedasticidade, utilizando os testes de Shapiro-Wilk e de Barlett, respectivamente. Tais testes foram realizados no *software* RStudio versão 1.1.453 (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2009). Como nem todos os conjuntos de dados atenderam a tais pressupostos, todos os dados foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis

para verificar se existiam diferenças significativas. Posteriormente, foi realizado o teste de Student-Newman-Keuls, do pacote *Agricolae* no *software* RStudio, para encontrar as diferenças entre as áreas de crescimento (em cm²) de cada isolado fúngico, frente a cada isolado de *Pseudonocardia*.

5 RESULTADOS

5.1 Isolamento e identificação de fungos negros

O isolamento dos fungos resultou em 111 isolados, identificados em 29 grupos (Tabela 2). Foram encontrados fungos negros da ordem Chaetothyriales (13,5 %, Figura 4) e outros fungos melanizados, como os gêneros *Cladosporium* (47,3 %, Apêndice A), *Acrodontium* (10,7 %) e *Oidiodendron* (10,7 %), além de outros (Tabela 2).

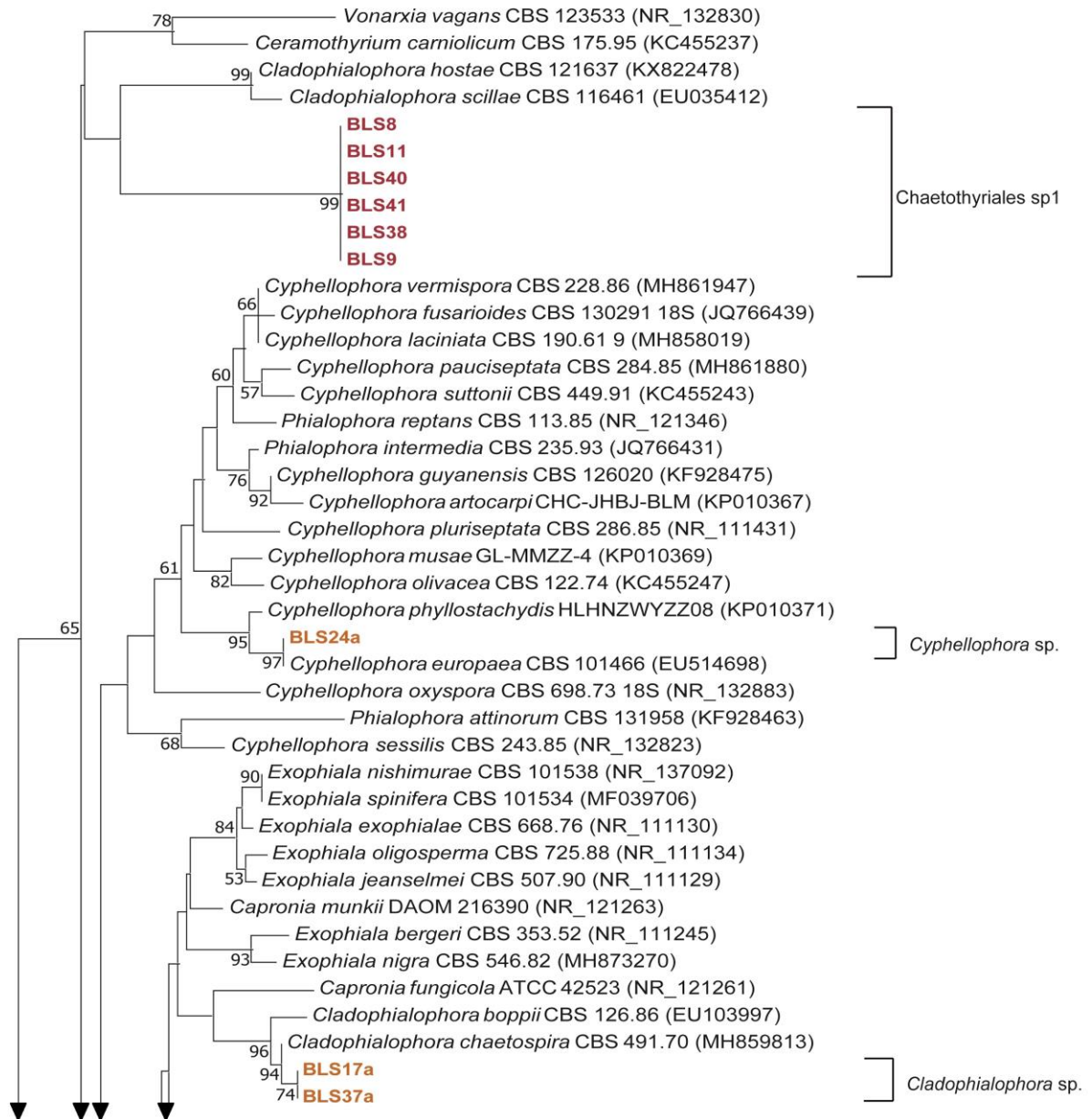
Tabela 2. Fungos negros obtidos de formigas atíneas derivadas (*Acromyrmex coronatus* e *Trachymyrmex tucumanus*).

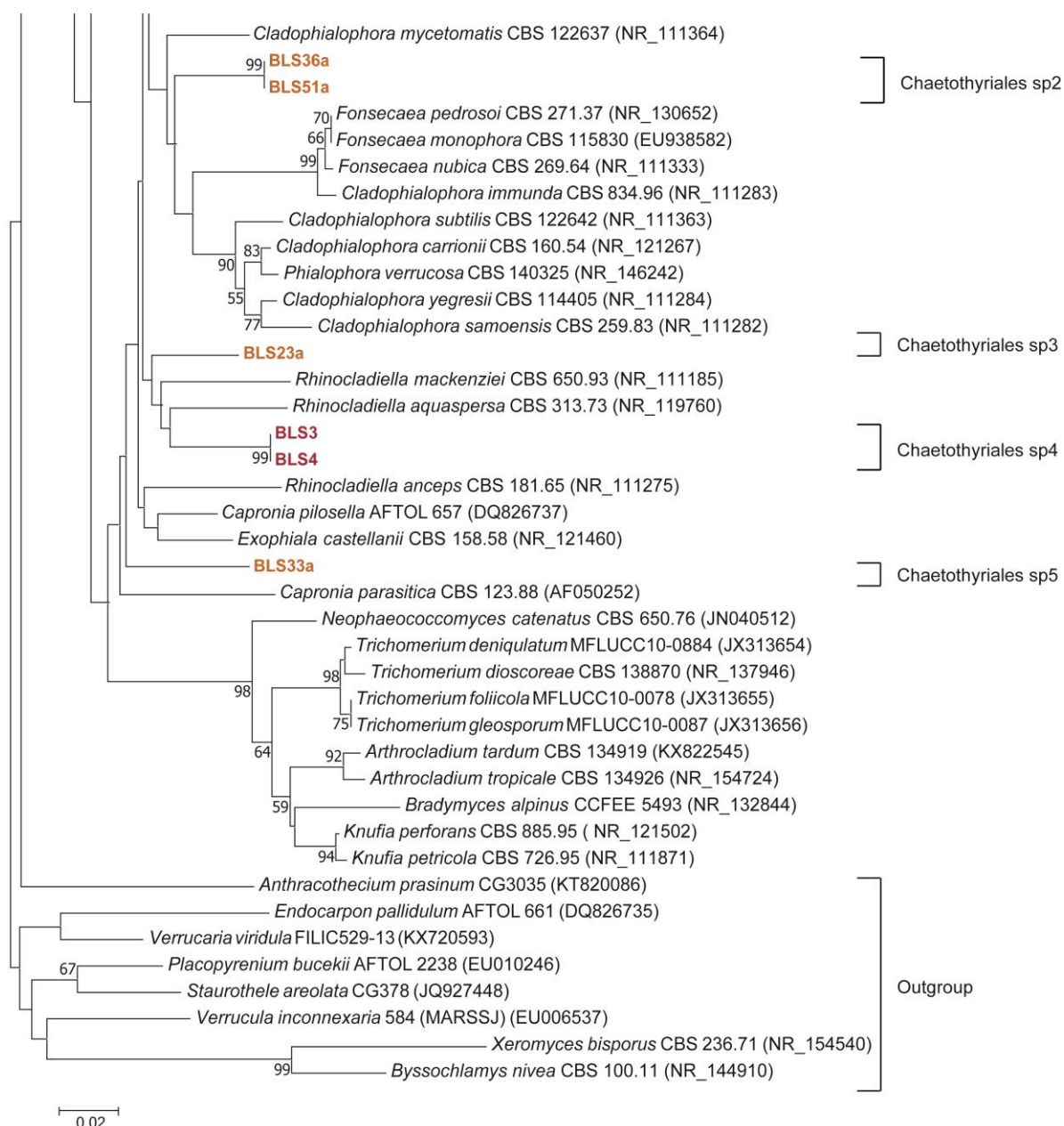
Fungos	Nº de isolados		Total de isolados	Abundância relativa (%)
	<i>A. coronatus</i>	<i>T. tucumanus</i>		
<i>Acrodontium</i> sp.	7*	5*	12	10,8
<i>Oidiodendron</i> sp.	11*	1	12	10,8
<i>Cladosporium anthropophilum</i>	9*	2	11	9,9
<i>Cladosporium perangustum</i>	8*	2	10	9,0
<i>Cladosporium angulosum</i>	2	6*	8	7,2
<i>Cladosporium tenuissimum</i>	4	4	8	7,2
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	5	1	6	5,4
Chaetothyriales sp1	0	6*	6	5,4
<i>Cladosporium xanthochromaticum</i>	1	4*	5	4,5
Ascomycota sp1	4	0	4	3,6
<i>Ochroconis</i> sp.	3	0	3	2,7
<i>Cladophialophora</i> sp.	2*	0	2	1,8
Chaetothyriales sp2	2*	0	2	1,8
Chaetothyriales sp4	0	2*	2	1,8
<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>	0	2	2	1,8
<i>Cladosporium halotolerans</i>	0	2	2	1,8
Ascomycota sp2	2	0	2	1,8
Ascomycota sp3	2	0	2	1,8
Ascomycota sp5	2	0	2	1,8
<i>Cyphellophora</i> sp.	1	0	1	0,9
Chaetothyriales sp3	1	0	1	0,9
Chaetothyriales sp5	1	0	1	0,9
<i>Cladosporium</i> sp1	0	1	1	0,9
Dothideomycetes sp1	1	0	1	0,9
Dothideomycetes sp2	1	0	1	0,9
<i>Neodevriesia</i> sp.	1	0	1	0,9
<i>Pseudocercospora</i> sp.	1	0	1	0,9
<i>Toxicocladosporium irritans</i>	0	1	1	0,9
Ascomycota sp4	1	0	1	0,9
Total	72	39	111	100

* Dos quais dois isolados foram escolhidos para os testes de co-cultivo pareado.

Fonte: elaborado pela autora.

Figura 4. Árvore filogenética representando a diversidade de fungos da ordem Chaetothyriales e demais fungos negros obtidos no presente estudo (indicados com códigos BLS).





A árvore filogenética foi inferida pelo método de *neighbor joining*, utilizando a região ITS (81 sequências no total, com alinhamento de tamanho final de 725 bp). Conjunto de dados baseado em Liu et al. (2015) e Vasse et al. (2017). Os nomes dos fungos precedem os códigos da coleção de cultura e os códigos de acesso do GenBank (entre parênteses). Códigos grafados em laranja representam isolados do tegumento de *Acromyrmex coronatus*, enquanto os grafados em vermelho, representam os de *Trachymyrmex tucumanus*. Valores nos ramos indicam porcentagem de suporte calculada por *bootstrap*. Somente valores acima de 50 % são mostrados.

Fonte: elaborado pela autora.

Foram isolados fungos negros de todas as 13 colônias de formigas exploradas. No entanto, de um total de 208 placas de isolamento utilizadas, apenas 66 apresentaram fungos negros. Em relação às formigas que permaneceram nos tubos de flotação, não foi possível recuperar os fungos negros destas, devido à presença de fungos hialinos, os quais cresceram rapidamente por toda a placa de isolamento.

Houve também alguns isolados não identificados, com sequências de ITS completamente diferentes das presentes no GenBank, sendo esses isolados, potenciais novas espécies (Ascomycota sp1 a 5, Tabela 2). A principal diferença reside no fato de que apenas a região 5.8S do rDNA apresentou alinhamento com as sequências depositadas no banco de dados. As regiões ITS1 e ITS2 não alinharam com qualquer outra presente no banco de dados. No entanto, os isolados da ordem Chaetothyriales tiveram suas sequências ITS agrupadas na árvore filogenética de acordo com sua formiga de origem (Figura 4).

5.2 Diversidade de fungos negros

Os resultados dos índices de diversidade de fungos negros, assim como abundância e riqueza estimada, encontram-se na Tabela 3. A riqueza de fungos obtidos de operárias de *T. tucumanus*, apesar de menor que a obtida para as amostras de *A. coronatus*, corresponde à estimada, segundo os valores do índice de Chao1 (Tabela 3). No entanto, tanto os valores brutos, quanto os valores estimados de riqueza podem ter sido fortemente influenciados pela grande diferença entre o número de isolados recuperados de cada espécie de formiga.

Tabela 3. Índices de riqueza e diversidade derivados das comunidades de fungos negros encontradas nas atíneas derivadas (*Acromyrmex coronatus* e *Trachymyrmex tucumanus*).

Origem	Nº de isolados	Riqueza	Chao 1	Shannon*	Simpson Inv**	Espécies/Isolados
<i>A. coronatus</i>	72	23	28,07	2,79	12,52	3,13
<i>T. tucumanus</i>	39	14	14,97	2,44	9,94	2,79

*Diferença significativa ($P < 0,05$)

**Diferença não significativa ($P > 0,05$)

Fonte: elaborado pela autora

As amostras de *A. coronatus* apresentaram valores de Shannon significativamente maiores, do que as amostras provenientes de *T. tucumanus*. Apesar disso, a diferença entre os índices de Simpson para ambas as comunidades não foi significativa. Quando aplicado a pequenas amostras ($n < 50$ isolados), o índice de Shannon pode subestimar a diversidade de uma comunidade, enquanto o índice de Simpson é considerado um parâmetro robusto e significativo até para pequenos números amostrais (MOUILLOT; LEPRETRE, 1999), como os do presente estudo.

Apesar das semelhanças na diversidade, foram constatadas diferenças em relação ao compartilhamento de espécies de fungos negros entre as duas formigas examinadas. Cerca de 27,6 % de todos os grupos de fungos identificados ($n = 8$) foram encontrados no tegumento de

formigas de ambas as espécies. Por outro lado, 15 grupos foram encontrados exclusivamente em *A. coronatus* e 6 foram encontrados apenas em *T. tucumanus*. Devido a isso, os índices de similaridade foram baixos, sendo o de Jaccard 0,276 e o de Sorensen 0,432.

5.3 Isolamento e identificação das actinobactérias

O isolamento das actinobactérias resultou inicialmente em 36 isolados, sendo 21 pertencentes a *T. tucumanus* e 15 pertencentes a *A. coronatus*. Destes, foram selecionados 13 isolados, um de cada colônia de formiga, ou seja, sete isolados de *T. tucumanus* e seis de *A. coronatus*. Tais isolados representam os morfotipos mais frequentes obtidos.

Devido a problemas no processo de sequenciamento da região 16S, não foi possível obter sequências completas que compreendem os *primers* F27 e R1492. Por isso, foram usados fragmentos cuja qualidade pôde ser observada diretamente nos *tracers*, resultando em sequências com 850 a 1319 pb.

De acordo com comparação no banco de dados do GenBank e nas análises filogenéticas inferidas (Apêndice B), todas as sete bactérias de *T. tucumanus* e uma de *A. coronatus* foram identificadas como *Pseudonocardia* sp. pertencentes ao Clado 1, segundo Mueller et al. (2010). As demais bactérias (n= 5) de *A. coronatus* foram identificadas como *Pseudonocardia* sp. pertencentes ao Clado 3, segundo o mesmo trabalho.

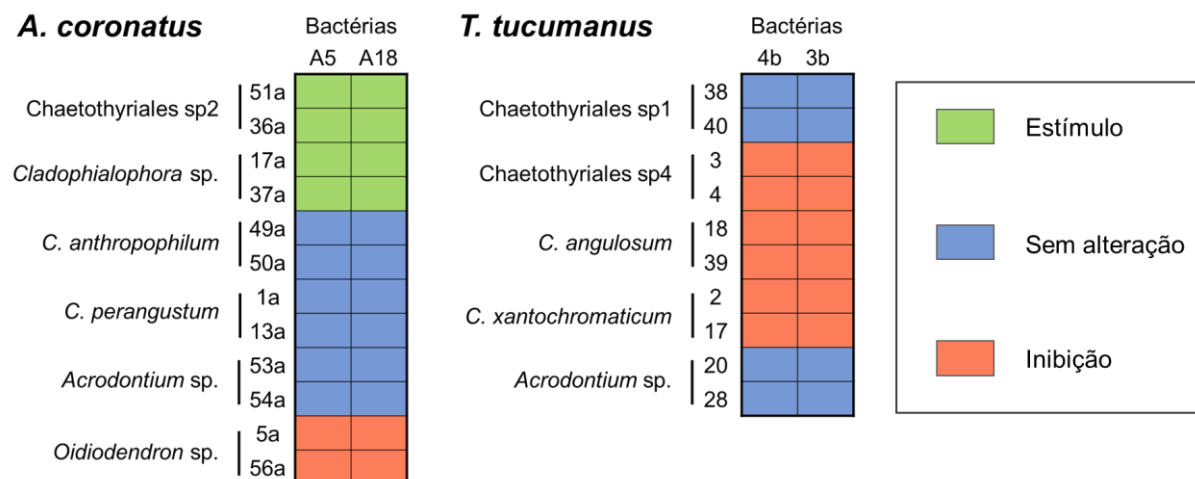
5.4 Ensaios de co-cultivo pareado

Uma variedade de interações entre os isolados de *Pseudonocardia* spp. e os isolados fúngicos provenientes da mesma espécie de formiga foi observada. No geral, das 44 combinações realizadas, apenas oito (18,2 %) resultaram em estímulo do crescimento do isolado fúngico, sendo que em 16 das 44 das interações (36,4 %) foi observada a inibição do crescimento dos fungos e em 20 das 44 combinações (45,4 %) não foram observadas diferenças significativas de crescimento do fungo em relação ao controle (Figura 5).

A presença das *Pseudonocardia* sp., isolada de *A. coronatus*, estimulou o crescimento dos isolados de Chaetothyriales, mas inibiu o crescimento de *Oidiodendron* sp. e não ocasionou diferença significativa no crescimento de *Cladosporium* spp. ou de *Acrodontium* sp. ($P < 0,05$, Figura 5, Apêndices C e D). Nos ensaios envolvendo os isolados de *Pseudonocardia* spp. de *T. tucumanus*, a presença dessas actinobactérias inibiu o crescimento dos isolados de um dos grupos de Chaetothyriales (Chaetothyriales sp4), além dos isolados de

Cladosporium spp., mas não alterou significativamente o crescimento dos isolados de um dos grupos de Chaetothyriales (*Chaetothyriales* sp1), nem os de *Acrodontium* sp. (Figura 5).

Figura 5. Heatmaps representando os resultados dos ensaios co-cultivo *in vitro* entre fungos negros e *Pseudonocardia* spp. isolados das formigas atíneas derivadas, *Acromyrmex coronatus* e *Trachymyrmex tucumanus*.



Cada quadro representa a interação entre um isolado fúngico (código especificado à esquerda do *heatmap*) e um isolado bacteriano (código especificado acima). As cores indicam o resultado obtido para cada confronto, de acordo com o quadro apresentado à direita.

Fonte: elaborado pela autora

6 DISCUSSÃO

Fungos negros da ordem Chaetothyriales estão associados às formigas atíneas (DUARTE et al., 2014; 2016a; LITTLE; CURRIE, 2007), reforçando estudos que demonstram a presença recorrente dos mesmos em várias outras formigas (KOKOLO et al., 2016; VASSE et al., 2017). As formigas estudadas no presente trabalho podem estar associadas a outros fungos da ordem Chaetothyriales, além da levedura negra filogeneticamente relacionada a *Cyphellophora* (ex-*Phialophora*), tida como simbiote do sistema das atíneas (LITTLE; CURRIE, 2008; VASSE et al., 2017). As atíneas derivadas estudadas no presente trabalho podem manter associações com outros fungos melanizados, como o gênero *Cladosporium* (Capnodiales), observado em abundância no tegumento de outras atíneas (DUARTE et al., 2016b; PAGNOCCA et al., 2008). Além disso, o tegumento desses insetos parece ser um ambiente interessante para a prospecção de novas taxa. Na tentativa de entender o papel desses fungos no sistema, foram realizados bioensaios *in vitro*, que apontaram para resultados diferentes dos encontrados na literatura, o que nos leva a crer que os fungos negros possivelmente não são apenas antagonistas, podendo desempenhar outros papéis no mutualismo das formigas atíneas com seus cultivares fúngicos.

Os fungos Chaetothyriales encontrados neste estudo se agruparam em clados contendo somente isolados de *T. tucumanus* ou de *A. coronatus*, quando analisando somente a região ITS. Apesar de ser um marcador mais geral que específico para a ordem (VASSE et al., 2017), e de a amostragem de isolados ter sido pequena no presente estudo, isto indica a possibilidade de que formigas cortadeiras e não-cortadeiras de folhas apresentem comunidades diferentes de Chaetothyriales em seus tegumentos. É sabido que essa diferença de fato existe entre a maior parte dos Chaetothyriales encontrados em formigas de domácias e às que constroem papelão (VASSE et al., 2017). É possível ainda que alguns desses isolados pertençam a espécies ainda não descritas, uma vez que há poucos estudos sobre a diversidade de fungos dessa ordem em formigas atíneas. Apenas um isolado de Chaetothyriales se mostrou próximo ao gênero *Cyphellophora*, que seria o gênero mais próximo da levedura negra considerada simbiote do sistema das atíneas (VASSE et al., 2017). Tal fato não é surpreendente, visto que, apesar de ter se mostrado muito abundante e de fácil isolamento no tegumento de *Apterostigma*, esse fungo não pôde ser isolado de atíneas derivadas, sendo obtidas apenas suas sequências do tegumento dessas formigas (LITTLE; CURRIE, 2007). Apesar disto, as duas novas espécies de *Phialophora* recuperadas do tegumento de *Atta* spp. se mostraram próximas ao gênero *Cyphellophora* (ATTILI-ANGELIS et al., 2014), o que

demonstra que, apesar de em menor quantidade em atíneas derivadas, estas leveduras negras parecem estar sempre presentes.

As diferenças entre as comunidades do tegumento de ambas as espécies de formigas não vão muito além dos Chaetothyreales. De acordo com as nossas análises, foi possível observar que a diversidade de fungos recuperada de ambas as comunidades é muito semelhante, porém o compartilhamento de espécies de fungos negros foi baixo, sendo a maior parte dos grupos de fungos isolados de somente uma das espécies de formiga. Há diversas explicações para tais diferenças. Apesar de ambas as formigas fazerem parte das atíneas derivadas, elas também fazem parte de diferentes gêneros e apresentam comportamentos de forrageio e tipos de fungicultura distintos (SCHULTZ; BRADY, 2008). Além disso, devemos lembrar que a amostragem não foi muito ampla e que o estudo não busca acessar as comunidades de micro-organismos do tegumento dessas operárias como um todo, nem mesmo as comunidades de fungos no geral, mas somente as comunidades de fungos melanizados, sendo esta apenas uma parcela dos fungos que podem ser encontrados nesses insetos (DUARTE et al., 2016b; MANTOVANI, 2013).

Cladosporium foi o gênero dominante no tegumento de ambas as espécies de formigas. O mesmo foi observado por Pagnocca et al. (2008) e Duarte et al. (2016b) no tegumento de alados de várias espécies de *Atta*. Esta prevalência do gênero também em análise independente de cultivo, descarta a possibilidade de a elevada abundância de isolados de *Cladosporium* ter sido um artefato gerado pelo método de isolamento utilizado no presente estudo, ou pelo fato de *Cladosporium* ser um fungo copiotrófico (i.e. que se aproveita da fartura de nutrientes dos meios de cultivo), e aponta para a possível existência de uma relação desses fungos com o sistema. Apesar disso, o fato de *Cladosporium* ser considerado ubíquo (BENSCH, 2015) e de os isolados terem se agrupado em clados que apresentam isolados provenientes de diversos *habitats* (Apêndice A), não sugerem relações co-evolutivas das espécies isoladas com o sistema das formigas atíneas.

Outros fungos frequentemente encontrados foram os gêneros *Acrodontium* e *Oidiodendron*. O gênero *Acrodontium* é cosmopolita e abriga patógenos oportunistas de fungos e de insetos, incluindo as formigas atíneas (HIJWEGEN; BUCHENAUER, 1984; PRABHUGAONKAR; PRATIBHA, 2017; SEN et al., 2009). O gênero *Oidiodendron*, abriga espécies que foram frequentemente encontradas no tegumento de *A. coronatus*, mas apenas um isolado foi encontrado em *T. tucumanus*. É possível que isso esteja diretamente relacionado ao modo de vida de ambas as espécies de formigas. *Trachymyrmex tucumanus* constrói ninhos subterrâneos, enquanto *A. coronatus* muitas vezes constrói seus ninhos em

cima de árvores ou embaixo de troncos, geralmente cobrindo as câmaras com folhas secas. Especulamos que esta cobertura de folhas secas seja a principal fonte dos esporos de *Oidiodendron* que acabam se depositando na superfície do corpo das formigas (e do jardim de fungo, embora não tenhamos avaliado), visto que seu habitat mais comum é a matéria vegetal em decomposição (HAMBLETON; EGGER; CURRAH, 1998).

O tegumento das formigas atíneas têm se mostrado um ambiente interessante para a prospecção de novas espécies de fungos negros. Alguns trabalhos isolaram novas espécies e até um novo gênero fúngico do tegumento de formigas do gênero *Atta* (ATTILI-ANGELIS et al., 2014; DUARTE et al., 2016a). No presente estudo, isolamos alguns fungos que consideramos potenciais novas espécies. Dentre eles estão os isolados pertencentes aos grupos que denominamos: *Chaetothyriales* sp1, *Chaetothyriales* sp2, *Chaetothyriales* sp3, *Chaetothyriales* sp5 e *Ascomycota* sp1 a 5. Os isolados denominados *Ascomycota* sp1 a 5 apresentaram sequências ITS bastante distintas de quaisquer outras presentes no GenBank, mostrando similaridades apenas na região 5.8S do rDNA quando comparadas às demais. Julgamos que seria interessante realizar uma investigação taxonômica mais minuciosa desses isolados, utilizando outros marcadores, além de análises morfológicas.

Os confrontos entre *Pseudonocardia* spp. e *Chaetothyriales* resultaram no estímulo do crescimento de alguns dos isolados desses fungos negros. Este resultado não é frequentemente observado em ensaios de co-cultivo entre fungos e actinobactérias de atíneas (MEIRELLES et al., 2014; SEN et al., 2009) e até hoje só foi relatada para um fungo dentro desta ordem (LITTLE; CURRIE, 2008). Isto pode ocorrer devido à capacidade conhecida de alguns fungos ordem *Chaetothyriales* de utilizar vários metabólitos secundários como fonte de carbono (PRENAFETA-BOLDU; SUMMERBELL; HOOG, 2006). Além disso, algumas espécies de *Chaetothyriales* apresentam resistência à atividade de diversos compostos antimicrobianos (DENG et al., 2013; DUARTE et al., 2013; VERSALOVIC et al., 2011).

Apesar de haver estímulo de crescimento de *Chaetothyriales* nos confrontos com *Pseudonocardia* isoladas de *A. coronatus*, o mesmo não foi observado para os isolados desses fungos negros obtidos de *T. tucumanus*. Nos confrontos envolvendo os isolados de *T. tucumanus*, foram observadas a inibição de crescimento de um táxon de *Chaetothyriales* e nenhuma diferença significativa de crescimento para o outro. Esta variação nas interações nos leva a crer que é possível que os estímulos de crescimento de *Chaetothyriales* sejam ocasionais e dependem das combinações fungo-actinobactéria, e não provenientes de especialização dos *Chaetothyriales* ao sistema, como proposto por Little e Currie (2008). No entanto, seriam necessários mais testes com mais isolados, principalmente do gênero

Cyphelophora, para entendermos a frequência com a qual esse estímulo de crescimento ocorre e o motivo pelo qual ele é observado.

Os ensaios *in vitro* contendo isolados das espécies mais frequentes de *Cladosporium* para cada espécie de formiga, apresentaram diferentes resultados. Foram observados tanto inibição, quanto a ausência de diferença significativa no crescimento desses fungos, quando em co-cultivo com *Pseudonocardia* da mesma espécie de atínea. Como dito anteriormente, os isolados de *Cladosporium* observados neste estudo, apesar de muito abundantes no tegumento das atíneas (PAGNOCCA et al., 2008; DUARTE et al., 2016b), não parecem possuir qualquer relação evolutiva com o sistema. Sendo assim, sua relação com o sistema de fungicultura das atíneas não necessariamente segue um padrão, mas pode variar segundo cada isolado envolvido.

7 CONSIDERAÇÕES

Neste estudo, pudemos constatar a abundância de *Cladosporium* e a presença de Chaetothyriales filogeneticamente relacionados ao gênero *Cyphellophora* (ex-*Phialophora*) no tegumento das atíneas *A. coronatus* e *T. tucumanus*, assim como relatado para outras atíneas. No entanto, a presença de outros gêneros da ordem Chaetothyriales aponta para a possível existência de associações com outros fungos da mesma ordem. Adicionalmente, o tegumento das atíneas derivadas tem se mostrado um ambiente promissor para a prospecção de novas espécies.

Pudemos observar também, que as interações *Pseudonocardia*-Chaetothyriales observadas para *Apterostigma* também ocorrerem entre isolados de *Pseudonocardia* e Chaetothyriales de outras atíneas derivadas. Porém, além do antagonismo descrito anteriormente, podem existir outras relações entre os fungos Chaetothyriales e as *Pseudonocardia* encontradas no tegumento das atíneas.

As interações observadas no presente trabalho merecem mais estudos, tanto taxonômicos, quanto ecológicos. Sugerimos a exploração do tegumento das demais espécies de atíneas para a obtenção de diferentes isolados de Chaetothyriales e o desenvolvimento de métodos *in vivo* para uma avaliação ecológica que leve em consideração as demais variáveis do sistema, como a ação das formigas sobre esses micro-organismos, uma vez que nosso estudo avaliou todas essas interações em experimentos *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- ABRÀMOFF, M. D.; MAGALHÃES, P. J.; RAM, S. J. Image processing with ImageJ. **Biophotonics International**, Pittsfield, v. 11, n. 7, p. 36-42, 2004.
- ABRAMOWSKI, D.; CURRIE, C. R.; POULSEN, M. Caste specialization in behavioral defenses against fungus garden parasites in *Acromyrmex octospinosus* leaf-cutting ants. **Insectes Sociaux**, Paris, v. 58, n. 1, p. 65–75, 2011.
- ADOBE ILLUSTRATOR CC, versão 2017. California: Adobe Systems Incorporated, 2017. Disponível em < <https://www.adobe.com/br/products/illustrator.html>>. Acesso em 02 de janeiro de 2018
- ATTILI-ANGELIS, D. et al. Novel *Phialophora* species from leaf-cutting ants (tribe Attini). **Fungal Diversity**, Dordrecht, v. 65, n. 1, p. 65-75, 2014.
- ARENAS, A.; ROCES, F. Gardeners and midden workers in leaf-cutting ants learn to avoid plants unsuitable for the fungus at their worksites. **Animal Behaviour**, London, v. 115, p. 167-174, 2016.
- BENSCH, K. et al. Common but different: The expanding realm of *Cladosporium*. **Studies in Mycology**, Baarn, v. 82, p. 23-74, 2015.
- BENSCH, K. et al. *Cladosporium* species in indoor environments. **Studies in Mycology**, Baarn, v. 89, p. 177–301, 2018.
- BLAIMER, B.B. Taxonomy and natural history of the *Crematogaster* (Decacrema)-group (Hymenoptera: Formicidae) in Madagascar. **Zootaxa**, Auckland, v. 2714, p. 1-39, 2010.
- BLATRIX, R. et al., Plant-ants use symbiotic fungi as a food source: new insight into the nutritional ecology of ant–plant interactions. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, London, v. 279, n. 1744, p. 3940-3947, 2012.
- BLATRIX, R. et al. Repeated evolution of fungal cultivar specificity in independently evolved ant-plant-fungus symbioses. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 7, p. 1-9, 2013.
- BRANSTETTER, M.G. et al. Dry habitats were crucibles of domestication in the evolution of agriculture in ants. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, London, v. 284, n. 1852, p.1-10, 2017
- BRINKER, P. et al. Microbial community composition of nest-carton and adjoining soil of the ant *Lasius fuliginosus* and the role of host secretions in structuring microbial communities. **Fungal Ecology**, England, v. 38, p.44-53, 2019.
- CAFARO, M. J. et al. Specificity in the symbiotic association between fungus-growing ants and protective *Pseudonocardia* bacteria. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, London, v. 278, n. 1713, p. 1814-1822, 2011.

CAFARO, M. J.; CURRIE, C. R. Phylogenetic analysis of mutualistic filamentous bacteria associated with fungus-growing ants. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 51, n. 6, p. 441-446, 2005.

CARBONE, I.; KOHN, L. M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**, England, v. 91, n. 3, p. 553-556, 1999.

COLWELL, R. K.; EISENBERG, J. E. EstimateS turns 20: statistical estimation of species richness and shared species from samples, with non-parametric extrapolation. **Ecography**, Copenhagen, v. 37, n. 6, p. 609-613, 2014.

CURRIE, C. R. et al. Coevolved crypts and exocrine glands support mutualistic bacteria in fungus-growing ants. **Science**, New York, v. 311, n. 5757, p. 81-83, 2006.

CURRIE, C. R. et al. Experimental evidence of a tripartite mutualism: bacteria protect ant fungus gardens from specialized parasites. **Oikos**, Copenhagen, v. 101, n. 1, p. 91-102, 2003.

CURRIE, C.R. et al. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. **Nature**, England, v. 398, n. 6729, p. 701-704, 1999.

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

DEFOSSEZ, E. et al. Plant-ants feed their host plant, but above all a fungal symbiont to recycle nitrogen. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, London, v. 278, n. 1710, p. 1419-1426, 2011.

DELLA LÚCIA, T. M. C. et al. Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 70, n. 1, p. 14-23, 2014.

DELLA LÚCIA, T. M. C.; SOUZA, D. J. Importância e história de vida das formigas-cortadeiras. p. 13-26. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). **Formigas-cortadeiras: da biologia ao manejo**. Editora UFV, Viçosa: UFV, 732 p., 2011

DENG, S. et al. In vitro antifungal susceptibility of *Cladophialophora carrionii*, agent of human chromoblastomycosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 57, n. 4, p. 1974-1977, 2013

DUARTE, A. P. M. **Fungos negros presentes no integumento de formigas cortadeiras (Tribo Attini)**. 2016. Dissertação – (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro.

DUARTE, A. P. M. et al. In vitro susceptibility of environmental isolates of *Exophiala dermatitidis* to five antifungal drugs. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 175, n. 5-6, p. 455-461, 2013.

DUARTE, A.P.M. et al. Leaf-cutting ants: an unexpected microenvironment holding human opportunistic black fungi. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v.106, n.3, p.465-73, 2014.

- DUARTE, A. P. M. et al. Riding with the ants. **Persoonia**, Leiden, v. 38, n. 1 p. 81-99, 2016a.
- DUARTE, A. P. M. et al. Prevalence of the genus *Cladosporium* on the integument of leaf-cutting ants characterized by 454 pyrosequencing. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 109, n. 9, p. 1235-1243, 2016b.
- EISENMAN, H.C.; CASADEVALL, A. Synthesis and assembly of fungal melanin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 93, n. 3, p. 931-940, 2012.
- FINE LICHT, H. H.; BOOMSMA, J. J. Forage collection, substrate preparation, and diet composition in fungus-growing ants. **Ecological Entomology**, Oxford, v. 35, n. 3, p. 259-269, 2010.
- GARCIA-RIVERA, J.; CASADEVALL, A. Melanization of *Cryptococcus neoformans* reduces its susceptibility to the antimicrobial effects of silver nitrate. **Medical Mycology**, England, v. 39, n. 4, p. 353-357, 2001.
- GIBERNAU, M.; DEJEAN, A. Ant protection of a Heteropteran trophobiont against a parasitoid wasp. **Oecologia**, Berlin, v. 126, n. 1, p. 53-57, 2001.
- GIBBS, A. G. Water-proofing properties of cuticular lipids. **American Zoologist**, United States of America, v. 38, n. 3, p. 471-482, 1998.
- GOSTINCAR, C. et al. Fungi between extremotolerance and opportunistic pathogenicity on humans. **Fungal Diversity**, Dordrecht, v. 93, n. 1, p. 195-213, 2018.
- GROENEWALD, M. et al. Distinct species exist within the *Cercospora apii* morphotype. **Phytopathology**, St. Paul, v. 95, n. 8, p. 951-959, 2005.
- GUEDES, F. L. A.; ATTILI-ANGELIS, D.; PAGNOCCA, F. C. Selective isolation of dematiaceous fungi from the workers of *Atta laevigata* (Formicidae: Attini). **Folia Microbiologica**, New York, v. 57, n. 1, p. 21-26, 2012.
- HALL, T. A. et al. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: **Nucleic Acids Symposium Series**. London: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000., 1999. p. 95-98.
- HAMBLETON, S.; EGGER, K. N.; CURRAH, R. S. The genus *Oidiodendron*: species delimitation and phylogenetic relationships based on nuclear ribosomal DNA analysis. **Mycologia**, England, v. 90, n. 5 p. 854-868, 1998.
- HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, United States of America, v. 4, n. 1., p. 1-9, 2001
- HEIL, M.; MCKEY, D. Protective ant-plant interactions as model systems in ecological and evolutionary research. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, United States, v. 34, n. 1, p. 425-553, 2003.

- HIJWEGEN, T.; BUCHENAUER, H. Isolation and identification of hyperparasitic fungi associated with Erysiphaceae. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v. 90, n. 2, p. 79-83, 1984.
- HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The ants**. Berlin; Heidelberg: Springer Verlag, 732 p., 1990.
- IWATSU, T.; MIYAJI, M; OKAMOTO, S. Isolation of *Phialophora verrucosa* and *Fonsecaea pedrosoi* from nature in Japan. **Mycopathologia**, Netherlands, v. 75, n. 3, p. 149-58, 1981.
- JEŠOVNIK, A.; CHAUL, J.; SCHULTZ, T. Natural history and nest architecture of the fungus-farming ant genus *Sericomyrmex* (Hymenoptera: Formicidae). **Myrmecological News**, Austria, v. 26, p. 65-80, 2018.
- KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.30, p.772–780, 2013.
- KOKOLO, B. et al. Pattern of specificity in the tripartite symbiosis between barteria plants, ants and Chaetothyriales fungi. **Symbiosis**, Philadelphia, v. 69, n. 3, p. 169-174, 2016.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, New York, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.
- LANE, D. J. 16S/23S RNAr sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, G. (Eds.) **Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic**. New York: John Willey, 1991. p.115–175.
- LI, H. et al. Convergent evolution of complex structures for ant–bacterial defensive symbiosis in fungus-farming ants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 115, n. 42, p. 10720-10725, 2018.
- LITTLE, A. E. F. et al. Defending against parasites: fungus-growing ants combine specialized behaviours and microbial symbionts to protect their fungus gardens. **Biology Letters**, London, v. 2, n. 1, p. 12-16, 2006.
- LITTLE, A. E. F.; CURRIE, C. R. Symbiotic complexity: discovery of a fifth symbiont in the attine ant–microbe symbiosis. **Biology Letters**, London, v. 3, n. 5, 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**, Washington, v. 89, n. 5, p. 1216-1222, 2008.
- LIU, X. Y. et al. Backbone tree for Chaetothyriales with four new species of *Minimelanolocus* from aquatic habitats. **Fungal Biology**, Amsterdam, v. 119, n. 11, p. 1046–1062, 2015.

MANTOVANI, J. D. **Descrição da diversidade de fungos associados a formigas Attini por método independente de cultivo**. 2013. Dissertação – (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro.

MATTOSO, T. C.; et al. Symbiotic bacteria on the cuticle of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus* protect workers from attack by entomopathogenic fungi. **Biology Letters**, London, v. 8, n. 3, p. 461-464, 2012.

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

MAYER, V.E.; VOGLMAYR, H. Mycelial carton galleries of *Azteca brevis* (Formicidae) as a multi-species network. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, London, p. 3265-3273, 2009.

MAYER, V. E. et al. Current issues in the evolutionary ecology of ant–plant symbioses. **New Phytologist**, Oxford, v. 202, n. 3, p. 749-764, 2014

MAYER, V. E. et al. Transmission of fungal partners to incipient *Cecropia*-tree ant colonies. **PloS One**, San Francisco, v. 13, n. 2, p. 1-17, 2018.

MEHDIABADI, NJ; SCHULTZ, TR. Natural history and phylogeny of the fungus-farming ants (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae: Attini). **Myrmecological News**, Wien, v. 13, p. 37-55, 2010

MEIRELLES, L. A. et al. Broad *Escovopsis*-inhibition activity of *Pseudonocardia* associated with *Trachymyrmex* ants. **Environmental Microbiology Reports**, Hoboken, v. 6, n. 4, p. 339-345, 2014.

MOUILLOT, D.; LEPRETRE, A. A comparison of species diversity estimators. **Researches on Population Ecology**, Kyoto, v. 41, n. 2, p. 203-215, 1999.

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

MUELLER, U. G. et al., Placement of attine ant-associated *Pseudonocardia* in a global *Pseudonocardia* phylogeny (Pseudonocardiaceae, Actinomycetales): a test of two symbiont-association models. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 98, n. 2, p. 195-212, 2010.

NEPEL, M. et al. High diversity and low specificity of Chaetothyrialean fungi in carton galleries in a Neotropical ant–plant association. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 11, p. 1-10, 2014.

NYGAARD, S. et al., Reciprocal genomic evolution in the ant–fungal agricultural symbiosis. **Nature Communications**, England, v. 7, p. 1-9, 2016.

PAGNOCCA, F.C. et al. Yeasts and filamentous fungi carried by the gynes of leaf-cutting ants. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 94, n. 4, p. 517-526, 2008.

- PAGNOCCA, F. C. et al., Micro-organismos associados as formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T.M.C. **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa, MG: Editora UFV, p. 262-283, 2011.
- POULSEN, M. et al. Specificity of the mutualistic association between actinomycete bacteria and two sympatric species of *Acromyrmex* leaf-cutting ants. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 14, n. 11, p. 3597-3604, 2005.
- POULSEN, M.; CURRIE, C. R. Complexity of insect–fungal associations: exploring the influence of microorganisms on attine the ant–fungus symbiosis. In: BOURTZIS, K; MILLER, T. A. **Insect Symbiosis**, Volume 2, Boca Raton: CRC Press, 1st ed., p. 79-100, 2006.
- PRABHUGAONKAR, A.; PRATIBHA, J. Isolation of *Acrodontium crateriforme* as a pitcher trap inquiline. **Current Research in Environmental and Applied Mycology**, Thailand, v. 7, n. 3, p. 203-207, 2017.
- PRENAFETA-BOLDU, F. X.; SUMMERBELL, R.; HOOG, S. G. Fungi growing on aromatic hydrocarbons: biotechnology's unexpected encounter with biohazard? **FEMS Microbiology Reviews**, England, v. 30, n. 1, p. 109-130, 2006.
- QUINLAN, R. J.; CHERRETT, J. M. The role of fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.). **Ecological Entomology**, Oxford, v. 4, n. 2, p. 151-160, 1979.
- RODRIGUES, A. et al. Leaf-cutting ant faecal fluid and mandibular gland secretion: effects on microfungi spore germination. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 1, p. 64-67, 2008.
- RODRIGUES, A. et al. Antagonistic interactions between garden yeasts and microfungal garden pathogens of leaf-cutting ants. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 96, n. 3, p. 331-342, 2009.
- RODRIGUES, A. et al. Ecology of microfungal communities in gardens of fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae): a year-long survey of three species of attine ants in Central Texas. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 78, n. 2, p. 244-255, 2011.
- ROSUMEK, F. B. et al. Ants on plants: a meta-analysis of the role of ants as plant biotic defenses. **Oecologia**, Berlin, v. 160, n. 3, p. 537-549, 2009.
- RUSSELL, J. A.; SANDERS, J. G.; MOREAU, C. S. Hotspots for symbiosis: Function, evolution, and specificity of ant-microbe associations from trunk to tips of the ant phylogeny (Hymenoptera: Formicidae). **Myrmecological News**, Wien, v. 24, p. 43-69, 2017.
- SATOW, M. M. et al. Selective factors involved in oil flotation isolation of black yeasts from the environment. **Studies in Mycology**, Baarn, v. 61, p. 157-163, 2008.
- SCHEURING, I.; YU, D. W. How to assemble a beneficial microbiome in three easy steps. **Ecology Letters**, Oxford, v. 15, n. 11, p. 1300-1307, 2012.

SCHMIDT, M.; DEJEAN, A. A dolichoderine ant that constructs traps to ambush prey collectively: convergent evolution with a myrmicine genus. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 124, n. 1, p. 41-46, 2018.

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

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 Academy of Sciences USA**, Washington, v. 106, n. 42, p. 17805-17810, 2009.

SILVA, A. et al., Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. **Journal of Insect Physiology**, Oxford v. 49, n. 4, p. 307-313, 2003.

SOSA-CALVO, J. et al. Evolution, systematics, and natural history of a new genus of cryptobiotic fungus-growing ants. **Systematic Entomology**, Oxford, v. 43, n. 3, p. 549-567, 2018.

SOUSA-SOUTO, L. et al. Increased CO₂ emission and organic matter decomposition by leaf-cutting ant nests in a coastal environment. **Soil Biology and Biochemistry**, England, v. 44, n. 1, p. 21-25, 2012.

TEIXEIRA, M. M. et al. Exploring the genomic diversity of black yeasts and relatives (Chaetothyriales, Ascomycota). **Studies in Mycology**, Baarn, v. 8, p. 1-28, 2017

THANH, V. N. *Lipomyces orientalis* sp. nov., a yeast species isolated from soil in Vietnam. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 56, n. 8, p. 2009-2013, 2006.

TOLEDO, A.V. et al. Melanins in fungi: Types, localization and putative biological roles. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 99, p. 2-6, 2017.

VASSE, M. et al. A phylogenetic perspective on the association between ants (Hymenoptera: Formicidae) and black yeasts (Ascomycota: Chaetothyriales). **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, London, v. 284, n. 1850, p. 20162519, 2017.

VANDER MEER, R. K.; MOREL, L. Nestmate recognition in ants. In: VANDER MEER et al., **Pheromone communication in social insects**. Boulder: Westview Press, p. 79-103, 1998

VERSALOVIC, J. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 10 ed. Washington: ASM Press, 2011.

VITTECOQ, M. et al. The Evolution of Communication in Two Ant-Plant Mutualisms. **Evolutionary Biology**, United States of America, v. 38, n. 3, p. 360-369, 2011

VOGLMAYR, H. et al. The diversity of ant-associated black yeasts: insights into a newly discovered world of symbiotic interactions. **Fungal Biology**, Amsterdam, v. 115, n. 10, p. 1077-1091, 2011.

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

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A. et al. **PCR protocols: a guide to methods and applications**, v. 18, n. 1, p. 315-322, 1990.

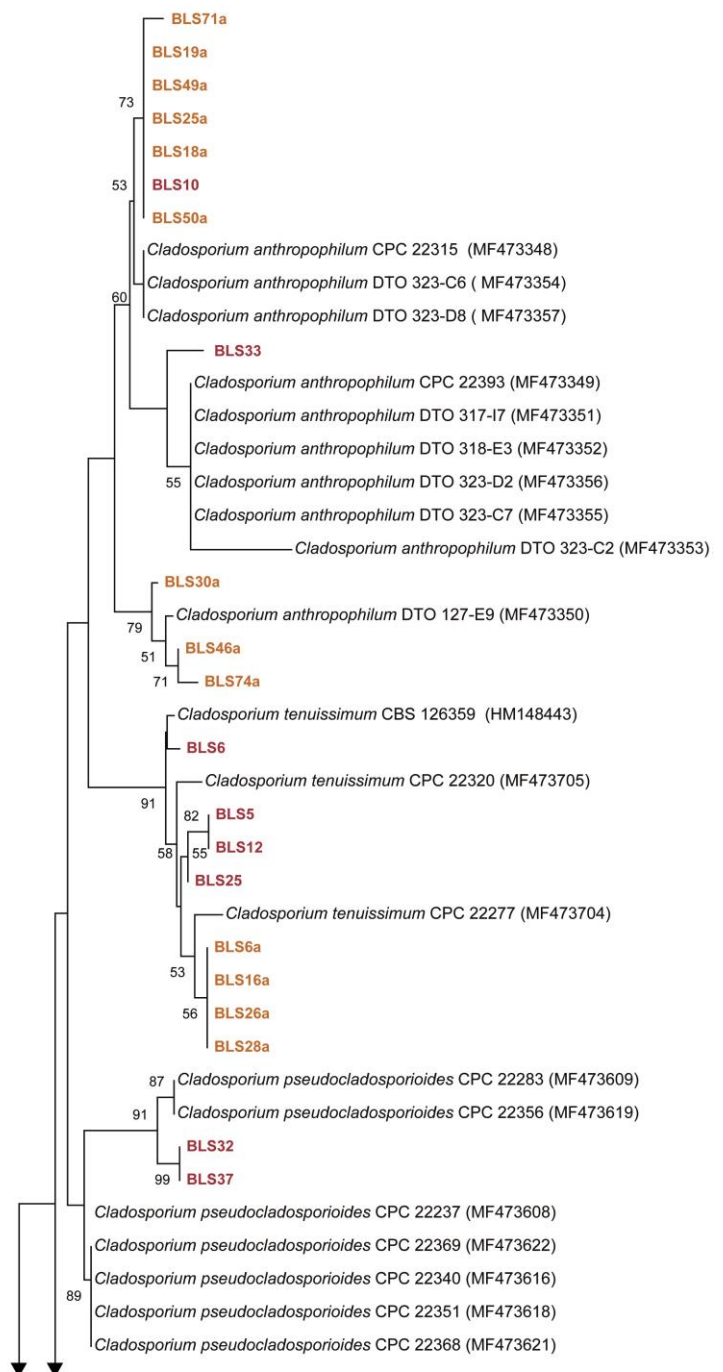
WILD, A. ***Acromyrmex coronatus*, cutting through a leaf**. Panama, 2007. Disponível em: <https://www.alexanderwild.com/Ants/Making-a-Living/The-Farming-Ants-Leafcutters/i-Hp77Vvx>. Acesso em: 18 mar. 2019.

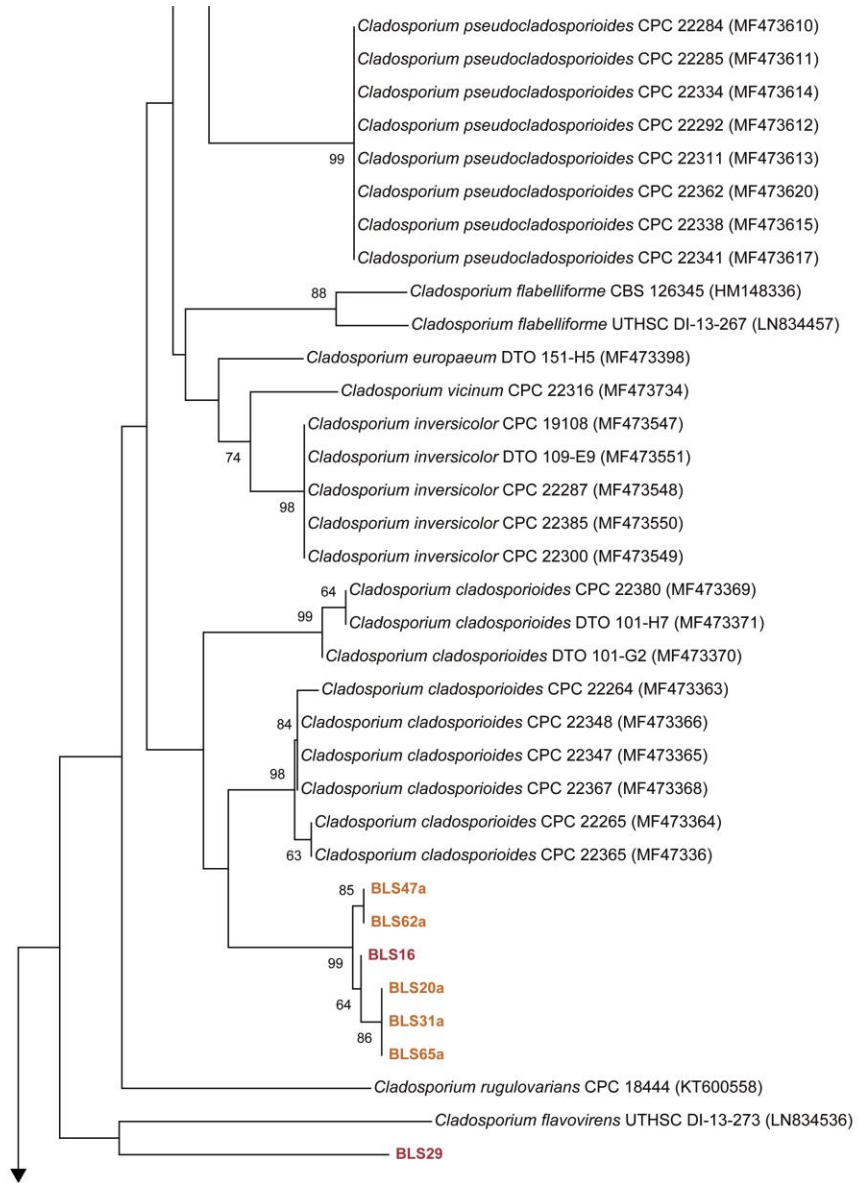
WILD, A. ***Crematogaster castanea tricolor***. South Africa, 2008. Disponível em: <https://www.alexanderwild.com/Ants/Making-a-Living/Arboreal-Ants/i-Qk4S6Ts/A>. Acesso em: 18 mar. 2019.

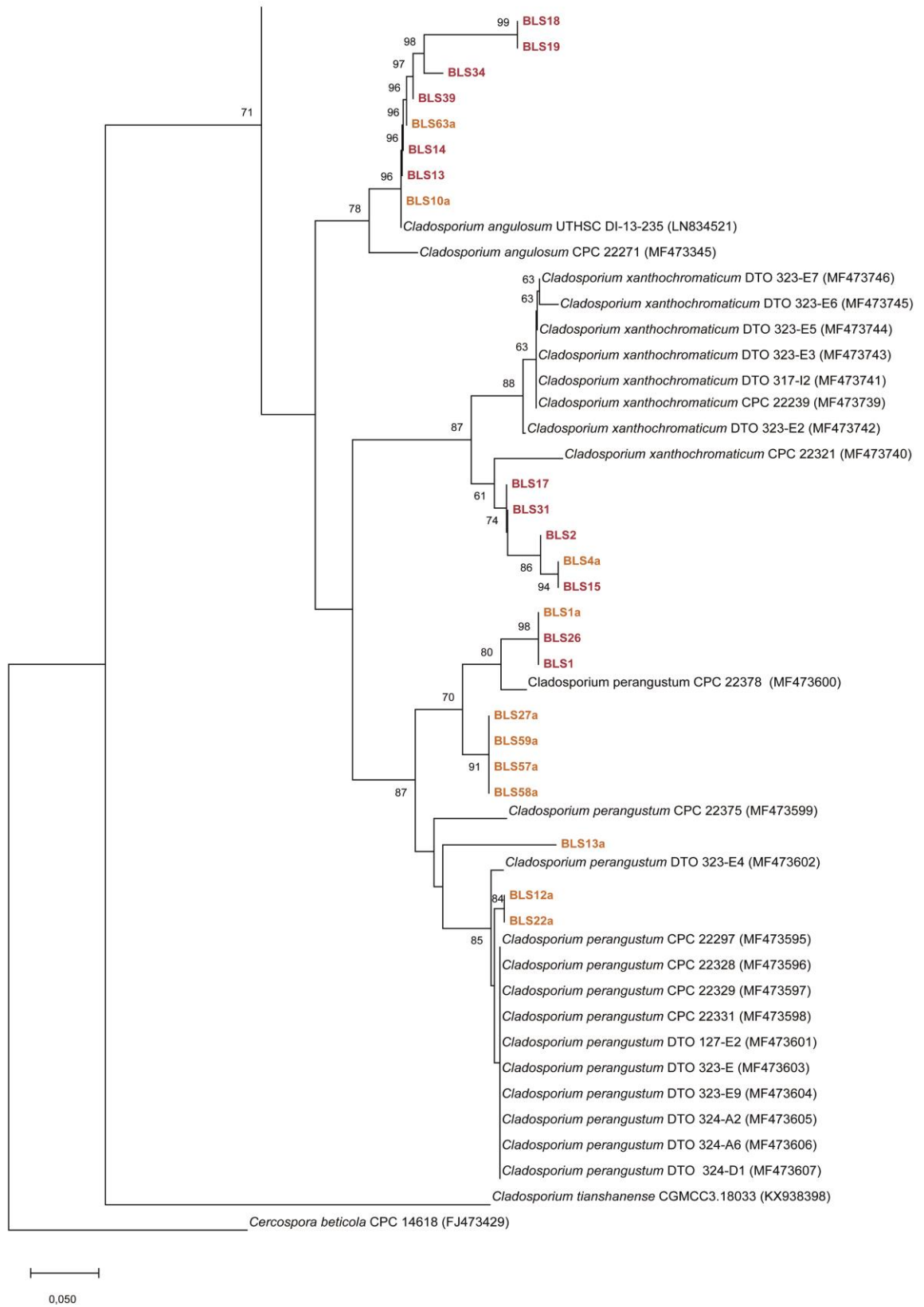
WILD, A. ***Trachymyrmex tucumanus***. Argentina, 2009. Disponível em: <https://www.alexanderwild.com/Ants/Taxonomic-List-of-Ant-Genera/Trachymyrmex/i-7LsPh5n>. Acesso em: 18 mar. 2019.

APÊNDICE A – Análise filogenética de *Cladosporium* spp.

Árvore filogenética representando a diversidade de fungos do gênero *Cladosporium* e demais fungos negros não identificados obtidos no presente estudo (códigos BLS). A única sequência de *Capronia beticola* representa o *outgroup*. A árvore filogenética foi estimada por *neighbor joining*, utilizando o marcador *tef1* parcial (127 sequências no total, com alinhamento de tamanho final de 357 pb). Conjunto de dados baseado em Bensch et al. (2015, 2018). Nomes dos taxa precedem os códigos da coleção de cultura. Códigos grafados em amarelo representam isolados do tegumento de *Acromyrmex coronatus*, enquanto os grafados em vermelho, representam os de *Trachymyrmex tucumanus*. Valores nos ramos indicam porcentagem de suporte calculada por *bootstrap*.

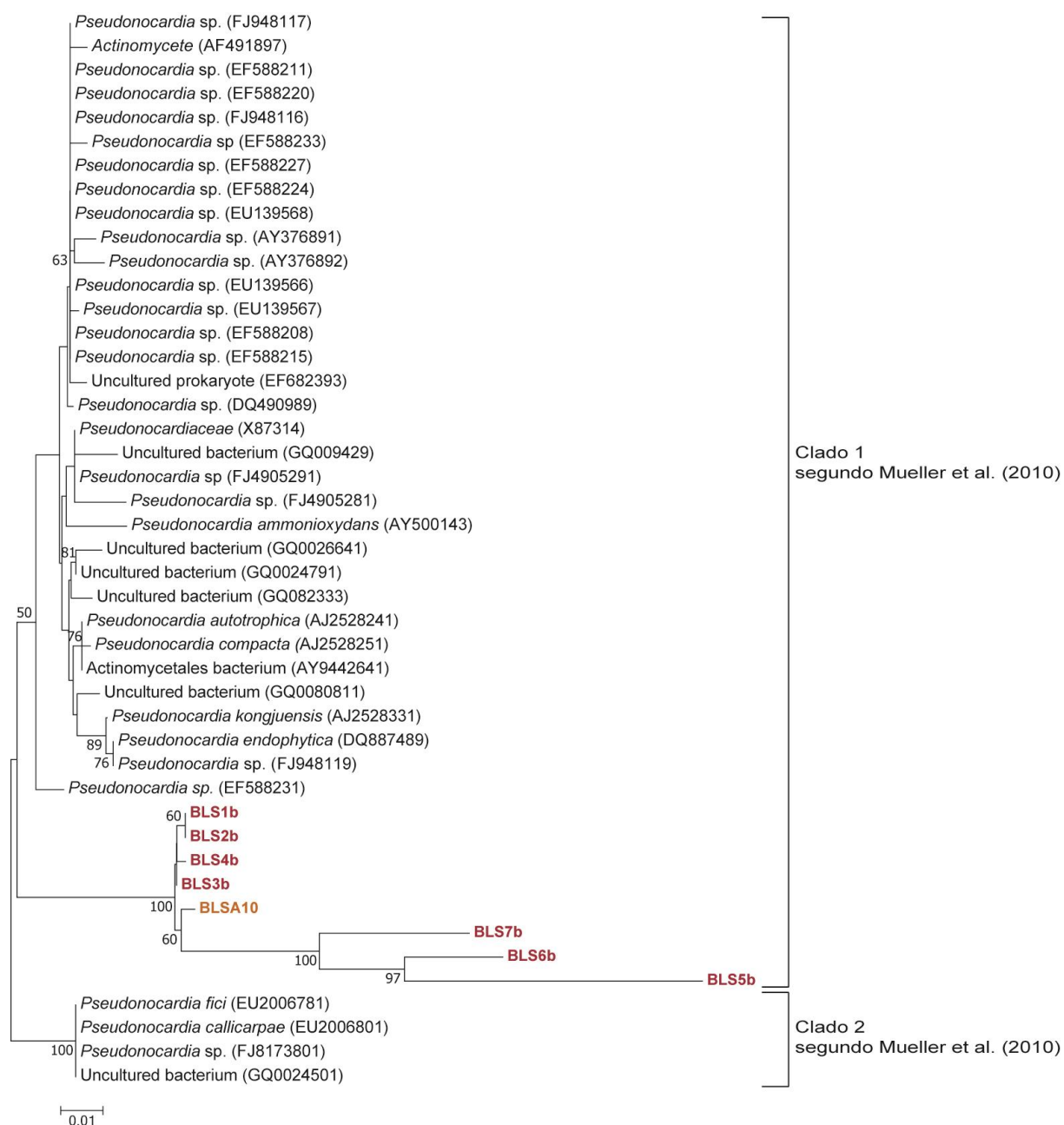


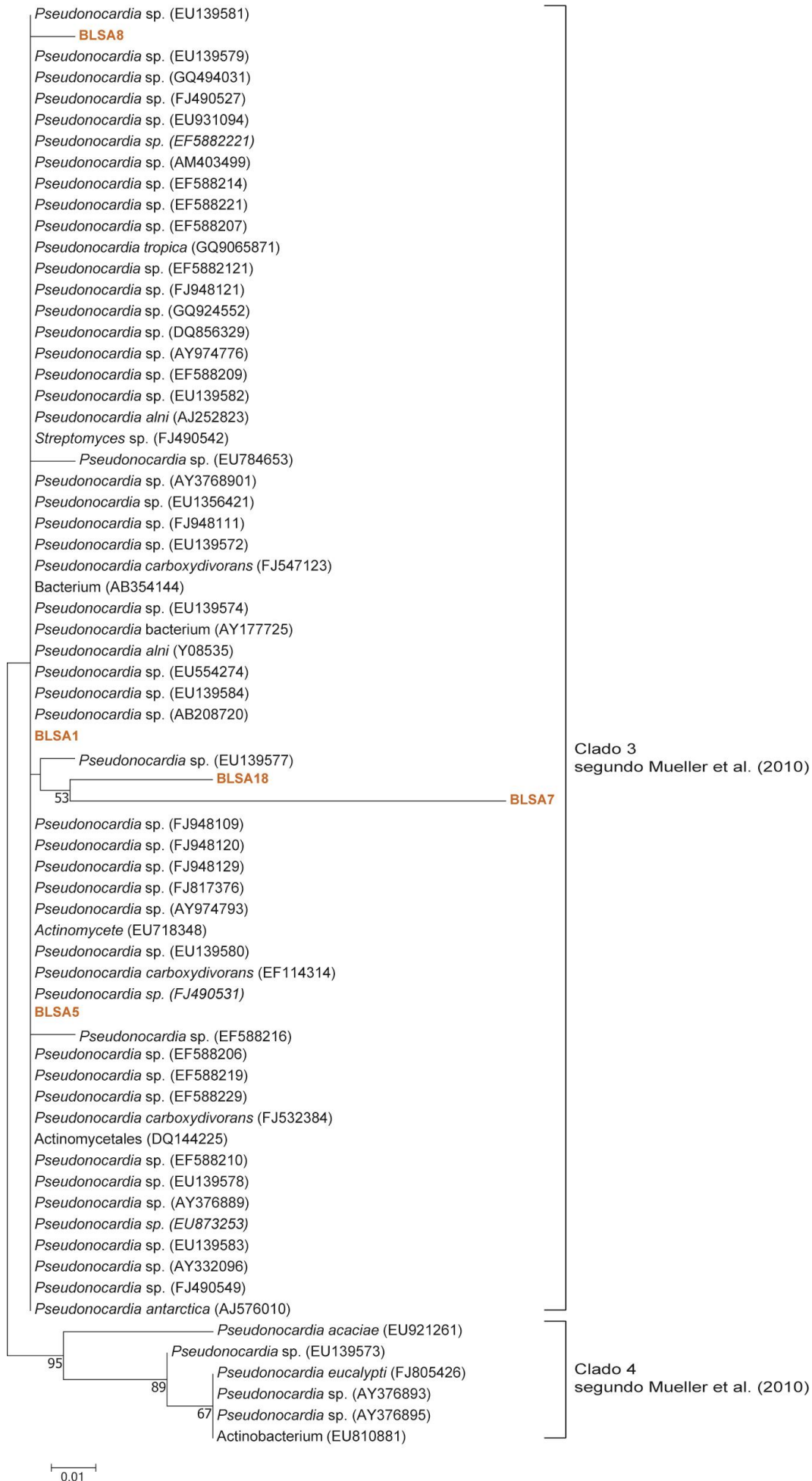




APÊNDICE B – Análises filogenéticas de *Pseudonocardia* spp.

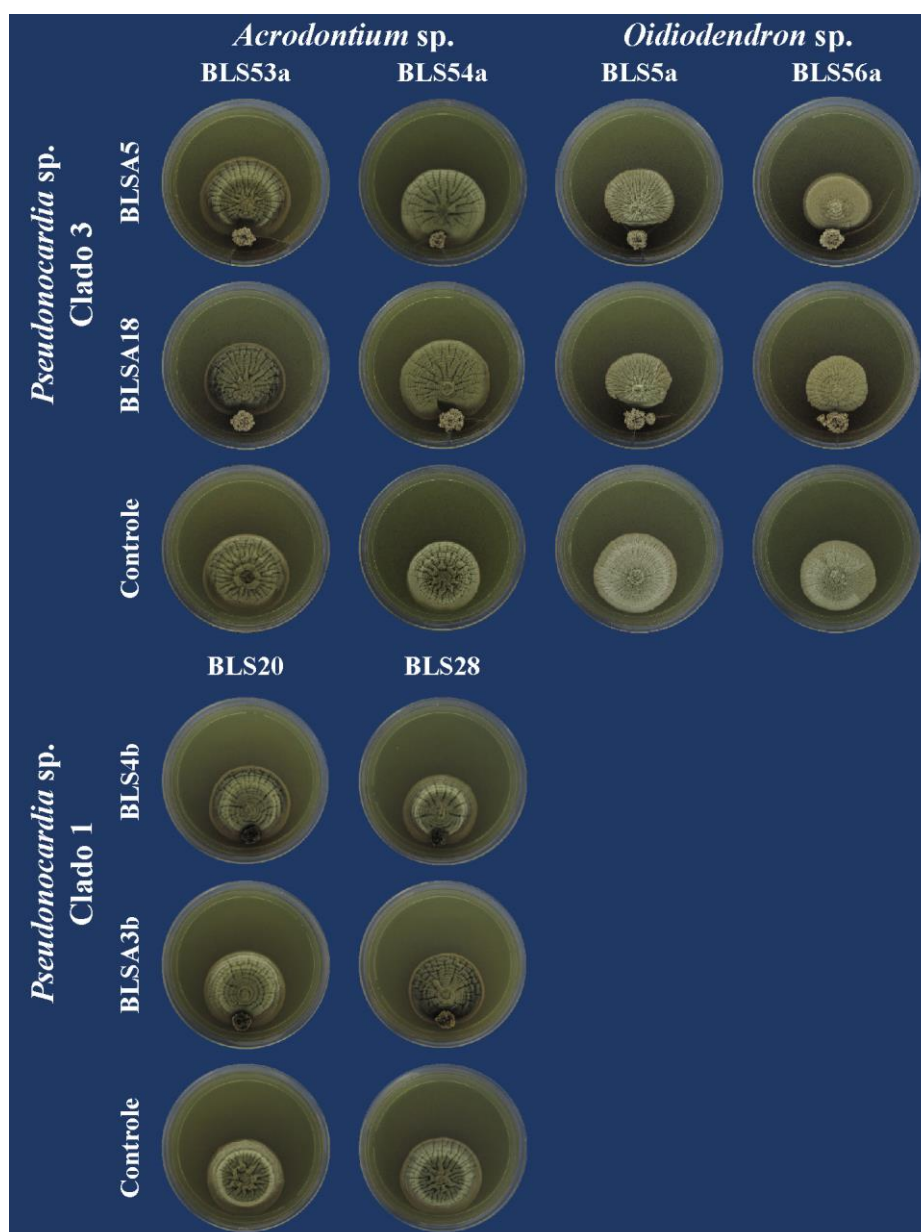
Árvores filogenéticas representando a diversidade de bactérias do gênero *Pseudonocardia* obtidas no presente estudo (códigos BLS). A árvore filogenética foi estimada por *neighbor joining*, utilizando o marcador 16S (para a primeira árvore: 45 sequências no total, com alinhamento de tamanho final de 1276 pb; para a segunda árvore: 68 sequências no total, com alinhamento de tamanho final de 1222 pb). Conjuntos de dados baseados em Mueller et al. (2010). Nomes dos taxa precedem os códigos da coleção de cultura. Códigos grafados em amarelo representam isolados do tegumento de *Acromyrmex coronatus*, enquanto os grafados em vermelho, representam os de *Trachymyrmex tucumanus*. Valores nos ramos indicam porcentagem de suporte calculada por *bootstrap*. Somente valores acima de 50 % são mostrados.



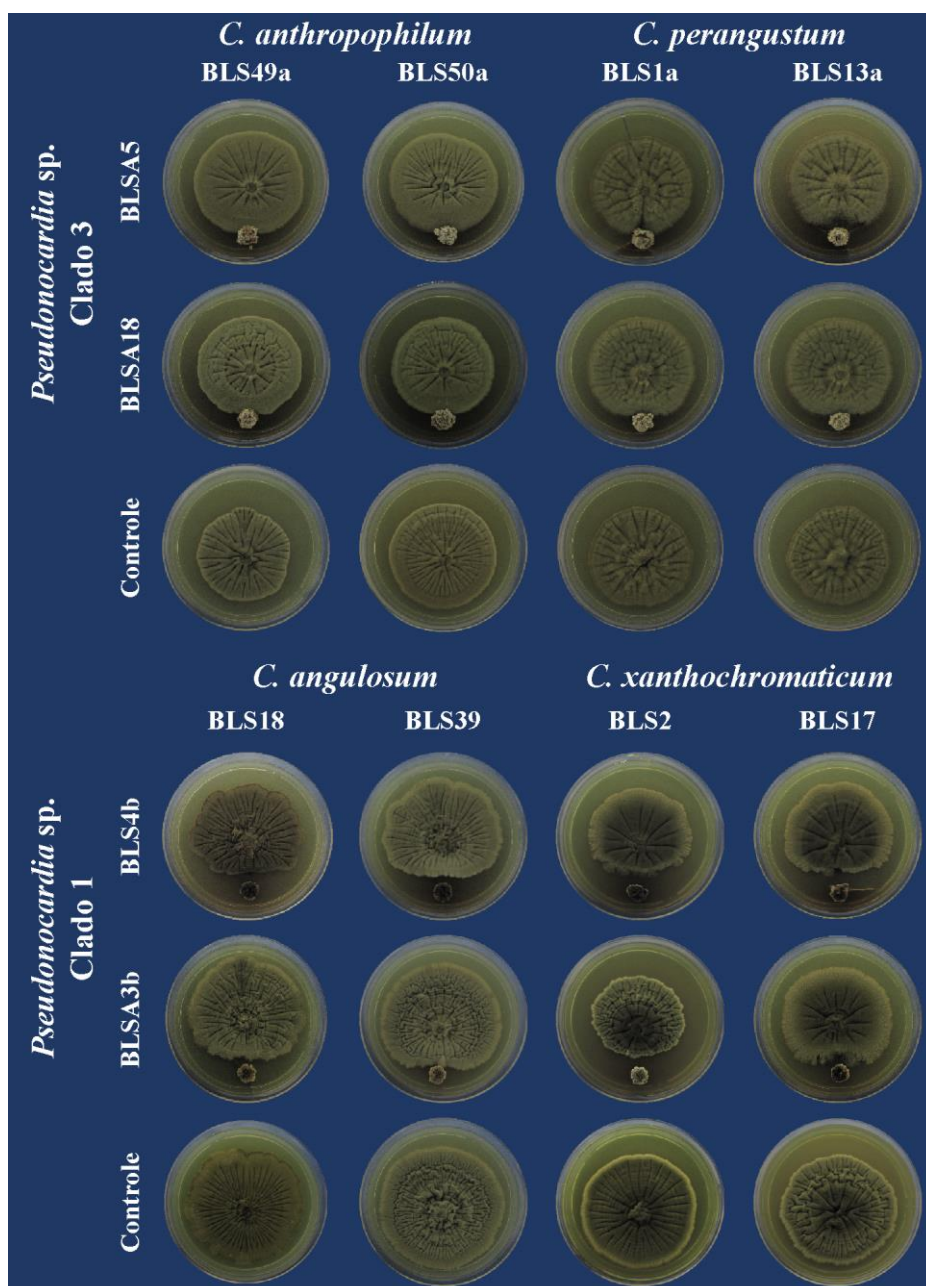


APÊNDICE C – Fotos dos ensaios de co-cultivo

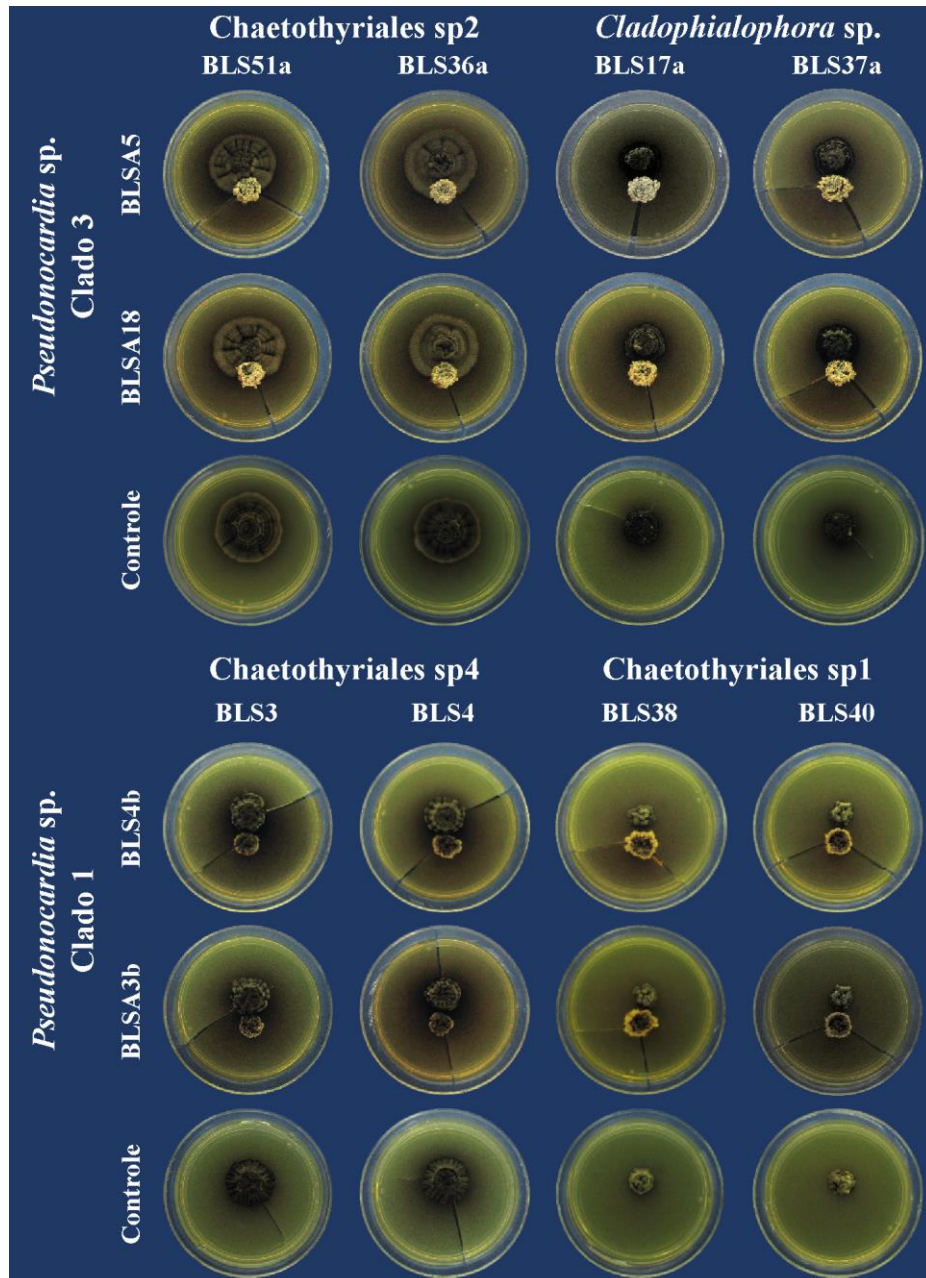
Fotos representativas dos resultados observados para os confrontos *Pseudonocardia*-*Acrodontium* e *Pseudonocardia*-*Oidiodendron*. Códigos iniciados com BLS indicam os isolados utilizados. Os isolados pertencentes aos grupos *Oidiodendron* sp. e *Pseudonocardia* sp. Clado 3 e os isolados de *Acrodontium* sp. BLS53a e BLS 54a, são provenientes do tegumento de *Acromyrmex coronatus*, enquanto os isolados de *Pseudonocardia* sp. Clado 1 e os isolados de *Acrodontium* sp. BLS20 e BLS 28 são provenientes do tegumento de *Trachymyrmex tucumanus*.



Fotos representativas dos resultados observados para os confrontos *Pseudonocardia*-*Cladosporium*. Códigos iniciados com BLS indicam os isolados utilizados. Os isolados pertencentes aos grupos *C. anthropophilum*, *C. perangustum* e *Pseudonocardia* sp. Clado 3 são provenientes do tegumento de *Acromyrmex coronatus*, enquanto os isolados dos grupos *C. xanthochromaticum*, *C. angulosum* e *Pseudonocardia* sp. Clado 1 são provenientes do tegumento de *Trachymyrmex tucumanus*.



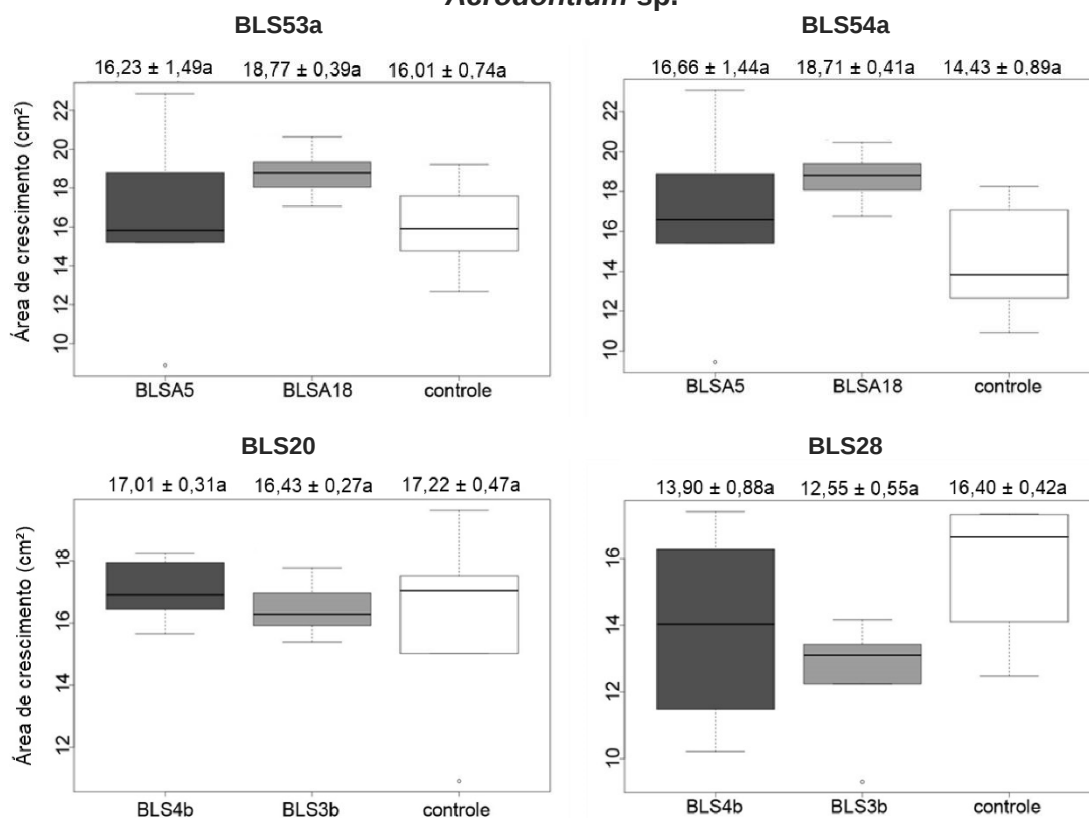
Fotos representativas dos resultados observados para os confrontos *Pseudonocardia*-Chaetothyriales. Códigos iniciados com BLS indicam os isolados utilizados. Os isolados pertencentes aos grupos Chaetothyriales sp2, *Cladophialophora* sp. e *Pseudonocardia* sp. Clado 3 são provenientes do tegumento de *Acromyrmex coronatus*, enquanto os isolados dos grupos Chaetothyriales sp4, Chaetothyriales sp1 e *Pseudonocardia* sp. Clado 1 são provenientes do tegumento de *Trachymyrmex tucumanus*.



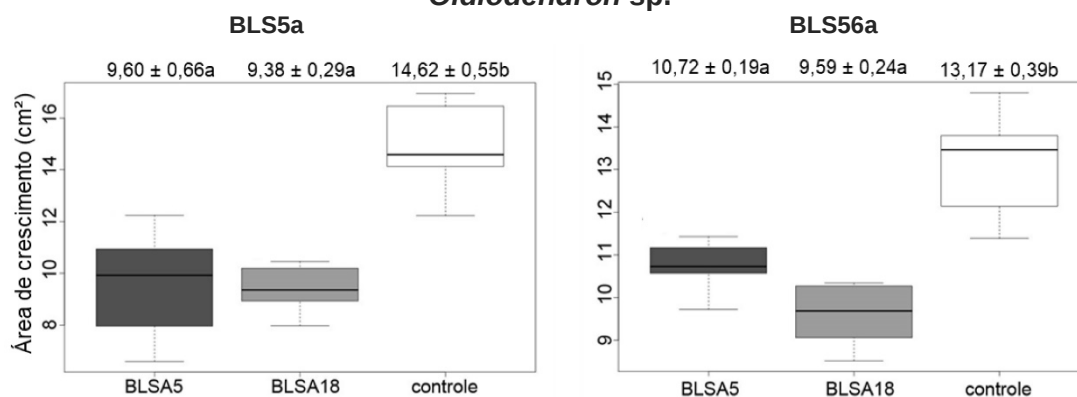
APÊNDICE D – Boxplots dos ensaios de co-cultivo

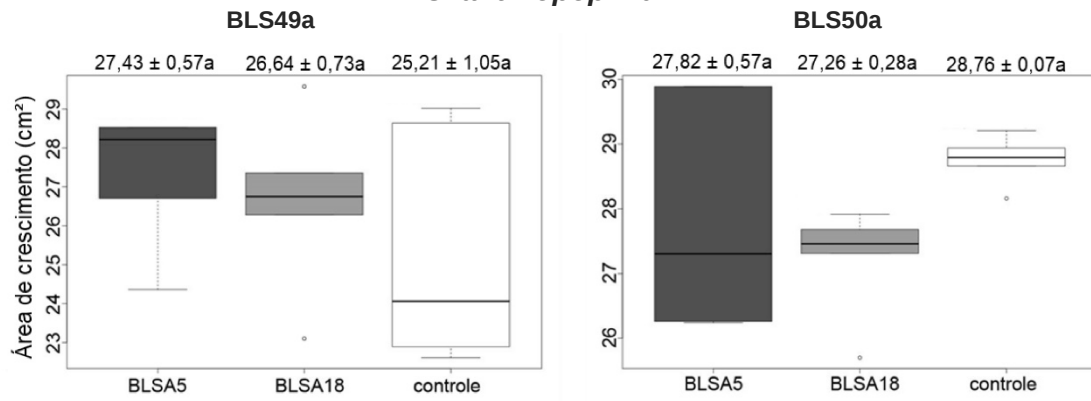
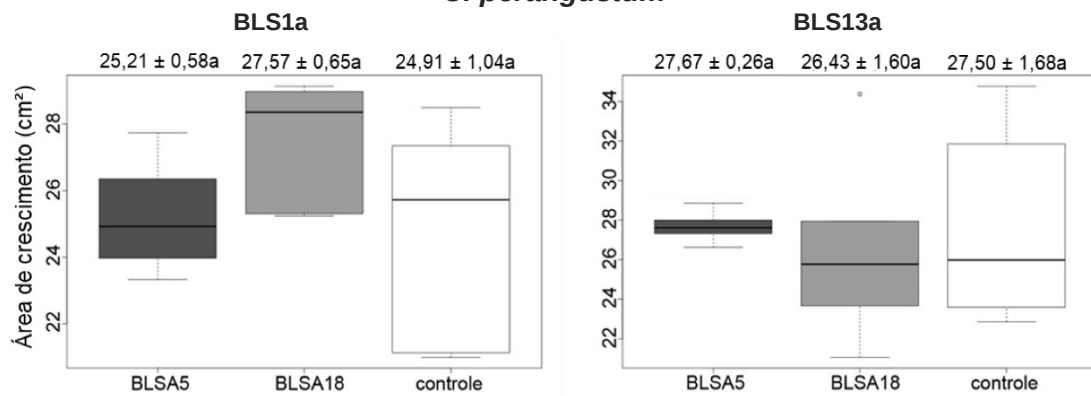
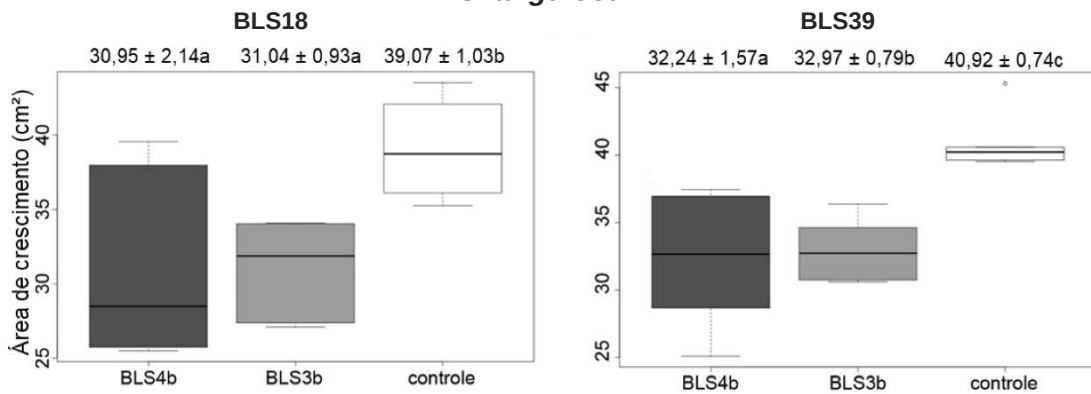
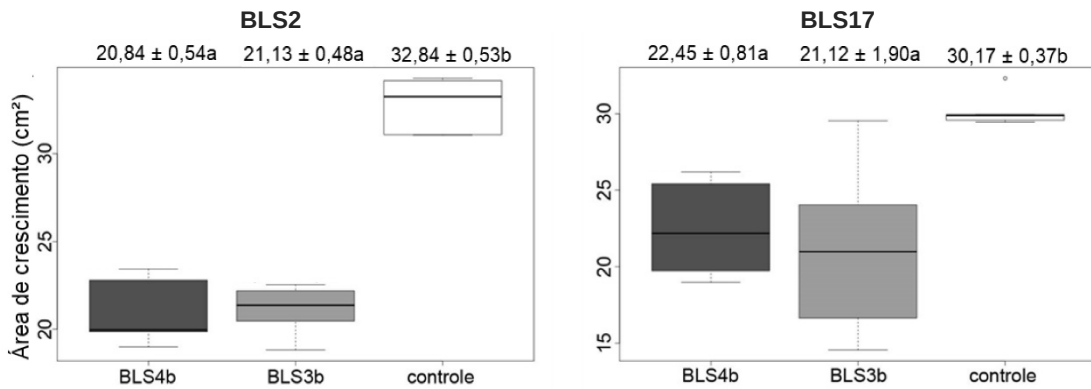
Boxplots dos resultados obtidos para os confrontos *Pseudonocardia*-fungos negros. Acima dos quadros se encontram as informações sobre os isolados fúngicos (código do isolado e grupo ao qual pertence). Códigos abaixo dos boxplots representam os isolados de *Pseudonocardia* utilizados em cada pareamento (BLSA5 e BLSA18 pertencem ao Clado 3 segundo Mueller et al. (2010); BLS 4b e BLS3b pertencem ao clado 1). Números acima de cada caixa representam a média e o erro padrão.

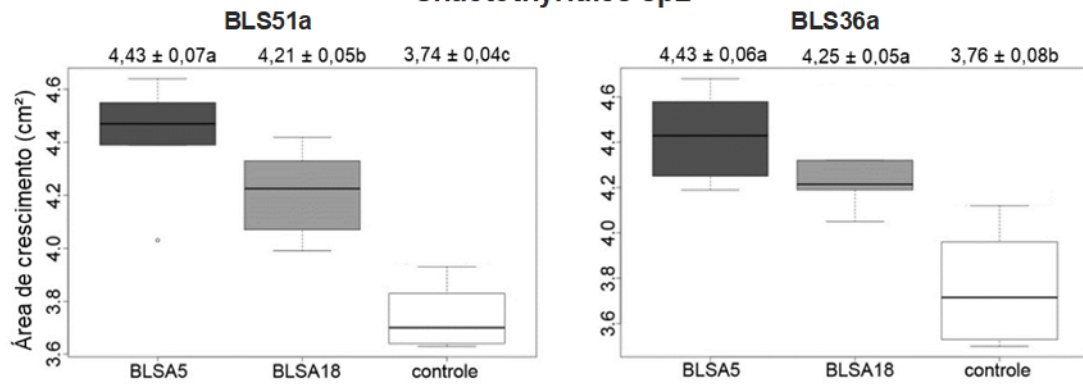
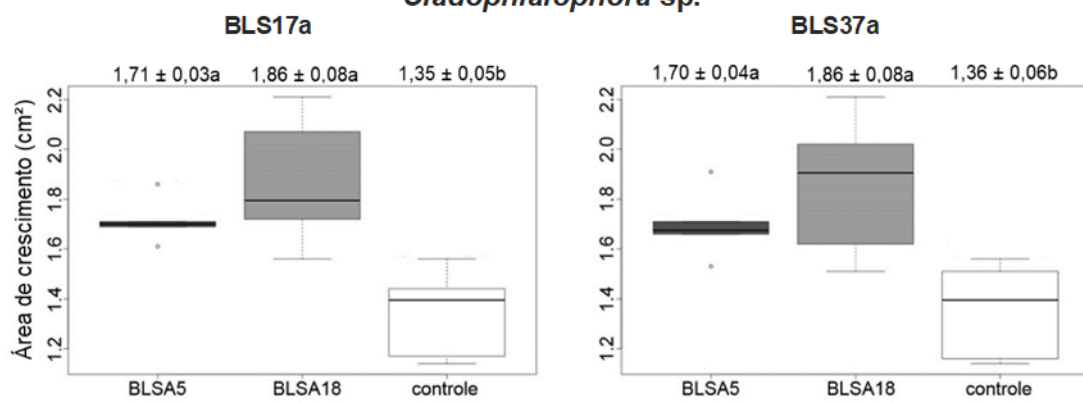
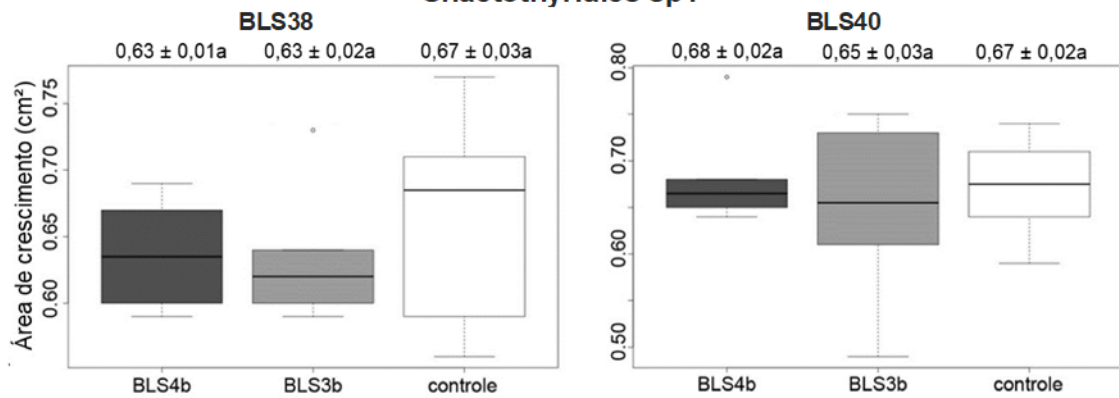
Acrodontium sp.



Oidiiodendron sp.



C. anthropophilum*C. perangustum**C. angulosum**C. xanthochromaticum*

Chaetothyriales sp2**Cladophialophora sp.****Chaetothyriales sp1****Chaetothyriales sp4**