



Micro-organismos associados às formigas cortadeiras: perfil morfológico e interações in vitro

Maria Lucidalva Ribeiro de Sousa¹, Kelly Cristina da Silva Martins², Janaina da Costa Nogueira³, Adriana Dantas Gonzaga de Freitas⁴

Resumo

As formigas cortadeiras são bastante conhecidas pelas relações de simbiose com alguns micro-organismos. Este trabalho teve por objetivo conhecer os fungos associados às formigas cortadeiras do gênero *Atta laevigata* no município de Manaus, Amazonas, e realizar o isolamento, purificação, identificação, conservação dos isolados e testar as atividades antagonistas entre os micro-organismos associados: fungo simbiote, bactérias e fungo parasita *Escovopsis* sp. Foram realizados procedimentos de assepsia do material e inoculados pequenos fragmentos da esponja de fungos e formigas em meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar). Foi utilizado para a identificação das bactérias o método de Gram, sendo alguns identificados como, bactérias Gram negativas e positivas. Através da técnica de microcultivo foi possível identificar alguns fungos como: *Chaetomium* sp., *Escovopsis* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Curvularia* sp. e *Leucoagaricus gongylophorus*. Os resultados dos bioensaios demonstraram que a bactéria Gram-positiva apresentou melhor desempenho sobre os fungos simbiotes, pois apresentou antagonismo em 30 dos 47 testes realizados, inibiu o crescimento micelial dos fungos mutualistas incluindo o fungo parasita *Escovopsis* sp. Todos os ensaios foram feitos pelo método de culturas pareadas em triplicatas. Estes resultados ressaltam a importância da interação entre esses micro-organismos, pois estudos desses mecanismos poderão servir de incentivos para o desenvolvimento de novos tratamentos antimicrobianos e demonstra o potencial como alternativa de futuros programas de controle biológico em áreas orgânicas e agroecológicas.

Palavras-chaves: Isolamentos, Antagonismos, Fungos Simbiotes, Bactérias.

Microorganisms associated with leaf-cutting ants: morphological profile and in vitro interactions. Leaf-cutting ants are well known for their symbiotic

¹ Graduanda Ciências Naturais UFAM, Manaus, AM, Brasil, dalva_1985@hotmail.com

² Graduanda Ciências Naturais UFAM, Manaus, AM, Brasil, kelly_martins44@hotmail.com

³ Doutorando Biotecnologia UFAM, Manaus, Am Brasil, jana-nogueira@hotmail.com

⁴ Docente ICB, Depto Morfologia, ICB/UFAM, Manaus, AM Brasil, adrianadantas1@gmail.com;



relationships with some microorganisms. This work aimed to know the fungi associated with leaf-cutting ants of the genus *Atta laevigata* in the municipality of Manaus, Amazonas, and to carry out the isolation, purification, identification, conservation of the isolates and to test the antagonistic activities among the associated microorganisms: symbiont fungus, bacteria and parasitic fungus *Escovopsis* sp. Asepsis procedures were performed on the material and small fragments of the fungi and ants sponge were inoculated in BDA culture medium (Potato Dextrose Agar). The Gram method was used to identify the bacteria, some of which were identified as negative and positive Gram bacteria. Through the microculture technique it was possible to identify some fungi such as: *Chaetomium* sp., *Escovopsis* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Curvularia* sp. and *Leucoagaricus gongylophorus*. The results of the bioassays showed that the Gram-positive bacteria performed better on the symbiont fungi, as it showed antagonism in 30 of the 47 tests performed, inhibited the mycelial growth of the mutualistic fungi including the parasitic fungus *Escovopsis* sp. all assays were performed by the method of cultures paired in triplicates. These results highlight the importance of the interaction between these microorganisms, as studies of these mechanisms may serve as incentives for the development of new antimicrobial treatments and, demonstrates the potential as an alternative for future biological control programs in organic and agroecological areas.

Keywords: Isolations, Antagonisms, symbiotic fungi, Bacteria.

1. Introdução

As formigas da tribo Attini compreendem mais de 300 espécies, distribuídas em 16 gêneros (BRANDÃO e MAYHÉ-NUNES, 2001. JESOVNIK et al.; 2016). São as herbívoras predominantes na região Neotropical, entre as latitudes 12°N e 33°S, ocorrendo na região Amazônica duas espécies predominantes de Attini (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990). Durante a sua evolução, a tribo Attini divergiu em duas classes: Palleoattini e Neoattini No

Amazonas, é relatada a ocorrência Attinis cortadeiras de folhas dos gêneros *Acromyrmex* (quenquéns) e *Atta* (saúvas) (BACCARO et al., 2015).

Todas as espécies da tribo Atinni define-se por apresentarem uma relação indispensável de simbiose com fungo *Leucoagaricus gongylophorus*, o fungo cresce dentro do ninho, mais especificamente na câmara do jardim do fungo, onde é cultivado em substratos de origem vegetal, coletados pelas formigas (MIYASHIRA et al., 2012). Estes



gêneros, *Atta* e *Acromyrmex*, cortam partes vegetais e as utilizam para cultivar seu fungo. Essa é uma relação interespecífica de mutualismo, havendo grande dependência entre ambos. O fungo serve como alimento para a rainha e as larvas, e metaboliza polissacarídeos das plantas em nutrientes ingeríveis pelas formigas, em troca às formigas fornecem massa vegetal para seu desenvolvimento e defende o fungo de parasitas e possíveis competidores (MEHDIABADI e SCHULTZ, 2009). A interação simbiótica entre três mutualistas, formigas, seus cultivares de fungos (Leucocoprineae) e uma bactéria filamentosa do gênero *Pseudonocardia* (Actinomycetes) cuja característica funcional é a produção de substâncias antimicrobianas bacteriostáticas, que impedem o crescimento de micro-organismos competidores e patogênicos. Segundo TORTORA et al. (2012), um parasita evoluiu conjuntamente aos três mutualistas, um fungo do gênero *Escovopsis* (Ascomycetes), que infecta os jardins de fungos de forma similar as pragas agrícolas das plantações humanas, pelo qual é controlado em parte por antibióticos produzidos por *Pseudonocardia* (MUELLER et al., 2005; SCHULTZ; BRADY. 2008).

O interessante dessa associação é que, nem o fungo simbiote *Leucoagaricus*, nem o fungo parasita *Escovopsis* parecem ser encontrados em outros lugares que não em associação aos formigueiros de *Acromyrmex* e *Atta*. Essa peculiaridade tem chamado a atenção de pesquisadores, cujo empenho já trouxe muito conhecimento das inter-relações existentes nessa associação extremamente complexa das formigas com seus micro-organismos (aliados ou não).

Tendo em vista tal fato, o bioma amazônico e de termos poucas pesquisas envolvendo a construção e compreensão regional dessa interação complexa de formigas e fungos, o presente artigo teve como intuito obter informações morfológicas, micromorfológicas e de interações entre formigas cortadeiras *Atta laevigata* e micro-organismos associados, bem como o seu potencial antagonista estabelecendo a correlação entre eles.

2. Material e Método

2.1 Coleta de formigas e jardim de fungos

A coleta das formigas e o jardim de fungos da espécie *Atta laevigata* foi realizada nas



coordenadas Lat: 2.9712596, Long: 60.0052308, no município de Manaus-AM. O ninho foi escavado cuidadosamente com uma picareta e uma pá de jardim, de modo a minimizar o contato com partículas de solo e a desintegração das esponjas (jardim de fungos), evitando que a terra fosse depositada sobre as amostras do jardim, sendo o mesmo acomodado em um recipiente de plástico. As formigas (rainha, operárias, soldados e jardineiras) coletadas foram acondicionadas em tubo Falcon com auxílio de uma pinça e transportado para o Laboratório de pesquisa em Microbiologia no Instituto de Ciências Biológicas (ICB), da Universidade Federal do Amazonas, UFAM.

2.2 Esterilização e isolamento dos micro-organismos

Para o isolamento, os fragmentos dos jardins de fungo e formigas, foram imersos em uma sequência de soluções (água destilada autoclavada, álcool 70%, hipoclorito de sódio (NaOCl) 3%, lavagem em álcool 70% e água destilada estéril), utilizado a assepsia do material segundo a metodologia para isolamento dos micro-organismos pelo período de um minuto (ARAÚJO 2002). Após a assepsia as formigas, os fragmentos do fungo simbiote foram

transferidos para placas de Petri contendo 4 fragmentos de fungo em cada uma. Também foram inoculadas 4 formigas inteiras em uma placa. Todos os isolados foram dispostos no meio de cultura (BDA - Batata Dextrose e Ágar) e acrescido de tetraciclina (50mg). As culturas foram armazenadas em estufa tipo B.O.D. (*Biological Oxygen Demand*) a 28°C. Após sete dias, realizou-se a repicagem. A esponja de fungo restante foi mantida na mesma caixa de transporte, e foi observado o crescimento de seu fungo parasita. Ao observar o crescimento do parasita, o mesmo foi inoculado em placas de Petri contendo meio BDA acrescido de antibiótico para seu isolamento.

2.3 obtenção de colônias monospóricas

Todos os fungos isolados do formigueiro (jardim de fungos) foram submetidos aos procedimentos de cultivos com a finalidade de se obter uma população geneticamente pura e homogênea a partir de um único esporo. Para esta finalidade, utilizou-se a técnica de diluição seriada seguida de plaqueamento de acordo com o protocolo de AZEVEDO e COSTA (1973).



2.4 Conservação dos micro-organismos

Os isolados que foram utilizados no recorrente trabalho foram todos conservados em duplicatas, utilizando duas metodologias distintas: método de CASTELLANI (1939), e o método do glicerol a 15%. Os frascos foram todos vedados e mantidos à temperatura ambiente, para possíveis pesquisas futuras.

2.5 identificações dos micro-organismos

A identificação macromorfológica dos isolados obtidos foi feita com base no crescimento em meio BDA sendo avaliadas as seguintes características do verso e do reverso das colônias: velocidade de crescimento, aspecto, textura e pigmentação.

Para análise da micromorfologia foi realizada a técnica de microcultivo, para observação das estruturas vegetativas (hifas), que consiste na inoculação do fungo de interesse em um cubo de meio de cultura sobre uma lâmina de vidro, sendo uma lamínula esterilizada colocada sobre o bloco de ágar. As placas foram incubadas em estufa B.O.D. a 28°C por 7 dias ou até o crescimento da esporulação do fungo sobre a lamínula. Após o período de

incubação a lamínula foi removida e colocada sobre uma lâmina com uma gota de lactofenol. A observação das microestruturas (vegetativas e reprodutivas) foi realizada utilizando-se aumento total de 400X.

2.6 Coloração de Gram

As colônias de bactérias, após a incubação, foram repicadas em meio BDA por meio da técnica de estrias. Posteriormente realizou-se a coloração de Gram para verificar a pureza da cultura, visando analisar sua reação à coloração, bem como sua micromorfologia. Para a coloração foi utilizada, uma gota de solução salina 0,85%, onde foi transferida para a superfície de uma lâmina de microscopia, no qual uma pequena quantidade de células bacterianas foi reunida com auxílio de uma alça de platina. A lâmina foi colocada próxima a chama do Bico de Bunsen até o material fixar e seguido os seguintes passos: confeccionou o esfregaço da amostra, corou com o violeta de cristal por 60 segundos, lavou com água destilada, cobriu com Lugol por 60 segundos e em seguida lavou com água destilada, a lâmina recebeu gotejamento de álcool-acetona (1:1) por cerca de 15 segundos, seguida da lavagem em água destilada, foi corada com fucsina de Ziehl, durante 1 minuto,



lavada rapidamente com água destilada e secada à temperatura ambiente, com a lâmina disposta em posição vertical sobre papel toalha. As observações foram realizadas preferencialmente utilizando-se aumento de 1000X, para verificar se os micro-organismos são Gram-positivos, Gram-negativos ou ainda se os mesmos apresentam uma forma de bacilos, cocos ou coco-bacilos.

2.7 Atividade antagonista in vitro

2.7.1 Fungo parasita x fungo simbiote

O antagonismo foi aplicado pelo método de cultura pareada, ou simplesmente pareamento, que consistiu no confronto direto do antagonista (fungo parasita *Escovopsis* sp.) e do fungo simbiote, ambos associados a formiga cortadeira.

O fungo simbiote foi inoculado na placa Petri contendo meio BDA. Um disco de micélio do fungo parasita foi inoculado a 0,5 cm da borda da placa, e oposta à cultura do fungo parasita foi inoculado um disco de fungo simbiote, posteriormente as placas foram mantidas em estufa BOD a 28°C, e analisadas diariamente quanto ao crescimento das colônias. O crescimento fúngico foi avaliado macroscopicamente com base no diâmetro da colônia, em

centímetros, visando estabelecer diferenças de resposta no teste, tais como estabelecimento de possível antibiose. Os testes foram realizados em triplicata e foi utilizado como controle placas contendo somente o fungo parasita e somente o fungo simbiote.

2.7.2 Bactérias x fungos

Nos testes de pareamento com bactérias x fungos foram utilizados 47 isolados de fungos simbiotes, entre eles o fungo oportunista *Escovopsis* sp., sendo que os mesmos isolados de fungos foram utilizados para a bactéria Gram-positiva e Gram-negativa. Foram utilizadas duas cepas bacterianas sendo uma Gram-positiva e outra Gram-negativa.

Como apresenta crescimento lento, o fungo simbiote foi inoculado com antecedência de 5 dias em placa de Petri contendo BDA, e após esse período as bactérias Gram-negativa/positiva foram inoculadas na placa a 0,5cm da borda, em posições diametralmente opostas do fungo simbiote. As placas foram mantidas em estufa BOD a 28°C. Entre o 5º e o 10º dia, foi observado e medido o tamanho do crescimento do fungo em relação as bactérias, visando analisar uma possível antibiose entre os micro-organismos.



Para o fungo parasita foi realizado o mesmo procedimento, sem a necessidade de crescimento prévio, visto que o fungo tem desenvolvimento rápido. Nos controles, tanto o fungo parasita, fungos simbiotes, quanto as bactérias Gram-negativa/positiva foram confrontados individualmente em placas de Petri, visando analisar possível inibição ou crescimento do fungo parasita e dos fungos simbiotes em relação às bactérias.

3. Resultados e Discussões

3.1 Isolamentos dos fungos e bactérias

Do material coletado do jardim de fungos, associados às formigas cortadeiras, foram identificados: fungos simbiotes, parasitas e bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, sendo esses últimos isolados do exoesqueleto das formigas que cresceram mesmo na presença de antibióticos. Neste estudo, 106 isolados do ninho *Atta laevigata* foram analisadas, considerando parâmetros microscópicos e macroscópicos. Foram observados fungos com colorações esverdeadas, amareladas, marrons, pretas e brancas, alguns com textura viscosa, cotonosa e outros esporulentos. Observou-se ainda presença de hifas, de conidióforo sem os

conídios, e conídios de forma dispersa. Através da micromorfologia identificou-se os fungos *Leucoagaricus gongylophorus*, *Chaetomium* sp., *Curvularia* sp., *Penicillium* sp. e *Escovopsis* sp.

A partir do presente trabalho pode-se destacar que, ao menos para as espécies dos gêneros considerados mais evoluídos (*Atta* e *Acromyrmex*), há o cultivo da mesma espécie de fungo, sendo que a literatura sugere que a maioria dos fungos filamentosos provenientes dos jardins das Attini tem origem endofítica, encontrados também no material vegetal coletado pelas próprias operárias (GUEDES et al. 2012). Ao analisar fungos associados ao exoesqueleto de *Atta laevigata*, foram constatados que alguns isolados estavam associados a plantas como: *Alternaria arborescens*, *Bipolaris sorokiniana* e *Bipolaris eleusines*.

3.2 Caracterização microscópica das bactérias isoladas

As bactérias foram identificadas quanto à forma como cocos e bastonetes. Para a identificação foi utilizada a coloração de Gram Kopff-Beerman, sendo as Gram-positivas com maior frequência entre os isolados (21 bactérias) e sem aparência de actinomicetos. Foram avaliados 29 culturas ao todo, conforme os



metabólitos produzidos pelas bactérias mutualistas, sendo consideradas antimicrobianos ativos contra diversos patógenos generalistas que são ameaças para os jardins de fungos e também para as operárias que são as que mais tem contato com o meio externo da colônia (SCOTT et al., 2010).

3.3 Atividade antagonista

3.3.1 Fungo simbiote x fungo parasita

Após a avaliação o fungo de gênero *Escovopsis* sp. e os fungos simbiotes, os mesmos foram confrontados pelo teste de Antagonismo. Após observação por um período de sete dias, verificou-se que os valores obtidos nos testes realizados com 76 amostras de fungos simbiote contra o fungo *Escovopsis* sp., 47 apresentaram resultados positivos de antagonismo (antibiose), e 29 obtiveram resultado negativo (parasitismo) sob o fungo parasita *Escovopsis* sp., mesmo com o crescimento de micélio lento de alguns fungos simbiotes, foi visível a inibição.

Sabe-se que as relações de simbiose e parasitismo entre os insetos sociais apresentam uma relação com algumas espécies de fungos, seja ela relacionada com a nutrição, ou utilizando-os para prover nutrientes e enzimas para os

indivíduos da colônia, para degradar a matéria alimentar (o que aumenta também sua competitividade), ou até para construção de estruturas do ninho (AANEN et al., 2007; VINHA, 2007; ATTILIANGELIS et al., 2014; VASSE et al., 2017).

3.3.2 Bactérias x Fungos

O antagonismo foi ensaiado pelo método de cultura pareada, onde consistiu no confronto direto do antagonista (bactérias Gram Positivas e Negativas) e dos fungos simbiotes associados a formiga *Atta laevigata*. Os resultados encontrados confirmam a presença de fungos predominantes nos ninhos de *Atta* e descreve a presença de outros micro-organismos que vivem em associação simbiótica com essas formigas cortadeiras. Conforme CHIN et al. (2003), há uma competição no ninho das formigas cortadeiras quase sempre é hostil por esses micro-organismos, produzir e liberar no meio substâncias antibacterianas, e eventualmente, até mesmo por predação e levar a morte.

Foram obtidos 47 isolados de fungos simbiotes incluindo o fungo oportunista *Escovopsis* sp., onde foram utilizadas as bactérias Gram-negativa e positiva do ninho da Formiga cortadeira *Atta laevigata*. Sendo que 30 isolados apresentaram resultado positivo e 17 negativo para

a bactéria positiva, já para a bactéria negativa foram 23 de resultado positivo e 24 de resultado negativo.

Além disso, nestes testes, medimos o espaçamento da área onde estava inoculado o fungo com relação as bactérias, conforme podemos observar nas Figuras 1 e 2, onde apresentaram diferenças do 5º dia ao 10º dia, quando foi medido o

tamanho do fungo e calculada a média. Neste sentido, podemos verificar que a bactéria Gram-positiva se mostrou com maior vantagem entre os fungos na inibição e a bactéria Gram-negativa, quando comparada, teve o crescimento dos fungos mais acelerados, sendo alguns tomados por completo.

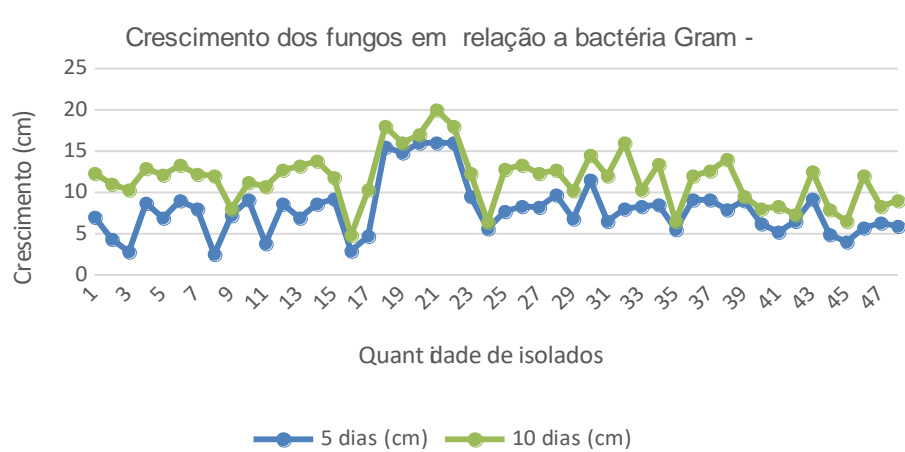


Figura 1- Médias do crescimento dos fungos relacionados entre o 5º e 10º dia, confrontado pela bactéria Gram-negativa.

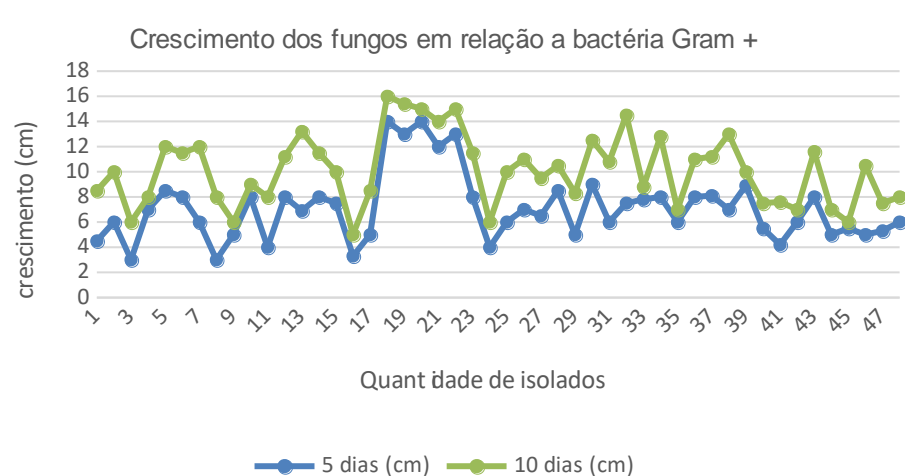


Figura 2- Médias do crescimento dos fungos em relação ao 5º e 10º dia, em confronto com a bactéria Gram-positiva.



As cepas bacterianas, como produtoras em termo de ambiente, conseguem vantagem superior em termos de sobrevivências e competição perante aquelas que são incapazes de sintetizá-las, de acordo com RILEY (1998), quando os micro-organismos tendem a ser aproximados, tendem a possuir potencial bioquímico e fisiológico semelhantes, para disputarem nichos ecológicos no ambiente em que vivem, sendo assim considerado uma “vantagem competitiva”.

O desempenho da Gram-positiva sobre o fungo parasita *Escovopsis* sp., apresentou uma inibição relevante, em comparação a Gram-negativa, uma vez que foi parcialmente coberta por alguns fungos simbiotes. Porém, as bactérias isoladas do jardim de fungos apresentaram grande atividade sobre o crescimento de *Escovopsis* sp., maior atividade se comparada com as cepas de *Pseudonocardia* spp. e foi observada também que foram inibidos o crescimento dos fungos *Fusarium solani*, *Mucor* sp. e *Trichoderma spirale*, sugerindo que estas bactérias, além de controlarem o crescimento do *Escovopsis* sp. também podem atuar na defesa do ninho contra outros fungos. Ao que tudo indica, muitas bactérias contribuem para a não

contaminação dos ninhos de Attini produzindo compostos antimicrobianos.

Esta associação simbiótica entre as bactérias, que foram objetos deste estudo, juntamente com os fungos que são cultivados no ninho da *Atta laevigata*, é considerada uma das razões de seu sucesso evolutivo e interação ecológica na natureza.

4. Conclusão

As observações deste trabalho mostraram que, os fungos simbiotes são capazes de antagonizar o parasita *Escovopsis* sp. com isso demonstram mecanismos de resistência ao principal fungo parasita dos jardins das formigas *Atta laevigata*. Portanto alguns micro-organismos fúngicos já desenvolveram estratégias de defesa, como metabólitos secundários e/ou reconhecimento visando anular ou diminuir os efeitos, quando ambos estão em contato.

Os resultados dos bioensaios demonstraram que a bactéria Gram-positiva se destacou, pois apresentou antagonismo em 30 dos 47 testes realizados, inibindo o crescimento micelial dos fungos mutualistas incluindo o fungo parasita *Escovopsis* sp. em relação a bactéria Gram-negativa, onde o



resultado foi equilibrado, sendo assim um teste inédito contendo as bactérias do solo em interação com as formigas cortadeiras, com resultados positivos para amplos estudos.

Considerando-se a complexidade do ambiente em estudo, seria imaturo tirar conclusões precipitadas sobre a eficiência, *in vitro*, da ação das bactérias antagonistas contra os fungos simbiotes que se relacionam com o jardim de fungos das formigas cortadeiras, pois essa interação, diante as estratégias utilizadas nesta pesquisa, é uma provável explicação para o não crescimento micelial de alguns fungos simbiotes, sendo o fato das bactérias, produzirem substâncias antimicrobianas, como antibióticos e compostos voláteis tóxicos ou como competição por nutrientes e por nichos ecológicos. Novos ensaios serão necessários em um estudo mais amplo no aspecto relações parasitismo x antibiose, envolvendo maior diversidade desses micro-organismos, visto que, são importantes para futuros estudos na área biotecnológica, podendo ser utilizados para possíveis controles biológicos.

Agradecimentos

A minha orientadora a Prof^a Dra. Adriana Dantas Gonzaga de Freitas

e minha coorientadora Prof^a. MSc. Janaina da Costa Nogueira por todo apoio e paciência ao longo da elaboração deste trabalho. Também gostaria de deixar um agradecimento especial ao meu noivo Antônio Joel Marinho de Sousa por nunca me deixar desanimar da caminhada que é árdua, aos amigos que compõe o laboratório de microbiologia em especial a Kelly, e a instituição de pesquisa UFAM por possibilitar a bolsa e a execução deste trabalho científico, e acima de tudo Deus, por me dar forças a que eu preciso todos os dias.

Divulgação

Este artigo é inédito e não está sendo considerado para qualquer outra publicação. O(s) autor(es) e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico.

Referências

AANEN, D. K. et al. Patterns of interaction specificity of fungus-growing termites and *Termitomyces* symbionts in South Africa. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, p. 115, 2007. doi:10.1186/1471-2148-7-115.



- ARAÚJO, I.C. 1991. Aspectos técnicos da implantação da cultura da pupunheira para produção de palmito. In. Sec. Est. Produção Rural e Abastecimento (SEPROR), Manaus, AM. pp. 1-38.
- ATTILI-ANGELIS, D. et al. Novel *Phialophora* species from leaf-cutting ants (tribe Attini). *Fungal Diversity*, v. 65, p. 65-75, 2014.
- AZEVEDO, J.L.; COSTA, S.O.P. 1973. **Exercícios práticos de genética**, São Paulo: EDUSP, 288p.
- BACCARO, F. B.; FEITOSA, F. M.; FERNANDEZ, F.; FERNANDES, I. O.; IZZO, T.J.; SOUZA, J. L. P.; SOLAR, R. **Guia para os gêneros de formigas do Brasil**. Manaus: Editora INPA, 388p. 2015.
- BRANDÃO, C. R. F.; MAYHÉ-NUNES, A. J. A new fungus-growing ant genus, *Mycetagroicus* gen. n., with the description of three new species and comments on the monophyly of the Attini (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**. 38: 639-665. 2001.
- CASTELLANI, A. 1939. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, v.24, p.270-276.
- CHIN, J.W., CROPP, T.A., ANDERSON, J.C., MUKHERJI, M., ZHANG, Z., SCHULTZ, P.G. 2003. An expanded eukaryotic genetic code. **Science** 301: 964-967 p.
- FALEIRO, José. H. et al. Estudo químico de *Eugenia dysenterica* DC.(Myrtaceae) em associação ao controle de formigas cortadeiras *Atta laevigata* e efeito alelopático. 2017.
- GUEDES, F. L. A; ATTILI- ANGELIS, D. PAGNOCCA, F. C. Seletive isolation of dematiaceous fungi from the workers of *Atta laevigata* (Formicidae: Attini). *Folia microbiológica*, 57(1): 21- 6. 2012.
- HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. **Theants**. Cambridge: Harvard University Press. 746p. 1990.
- JESOVNIK, A.; GONZALEZ, V. L.; SHULTZ, T. R. Phylogenetic and Divergence Dating of Fungus Farming Ants (Hymenoptera: Formicidae) of the Genera *Sericomyrmex* and *Apterostigma*. **Plos One**, DOI: 10.1371/journal. Pone. 0151059, 2016.
- MEHDIABADI, N.J. & SCHULTZ, T.R. "Natural history and phylogeny of the fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicina: Attini)". *Myrmecol. News*, 13: 37-55, 2009.
- MENDES, T. D. 2010. **Atividade antimicrobiana de actinobactérias isoladas de formigas Attini (Hymenoptera: Formicidae)**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) Instituto de Biociências, UNESP Rio Claro, 94 p.
- MIYASHIRA, C.H.; TANIGUSHI, D.G.; GUGLIOTTA, A.M.; SANTOS, D.Y.A.C. "Influence of caffeine on the survival of leaf-cutting ants *Atta sexdens rubropilosa* and in vitro growth of their mutualistic fungus". *Pest. Manag. Sci.*, 68: 935-940, 2012.
- MUELLER, U. G. Ant versus fungus versus mutualism: Ant-cultivar conflict and the deconstruction of the attine ant-fungus symbiosis. **American Naturalist**, 160: S67-S98 p. 2002.
- MUELLER, U. G.; et al. the Evolution of Agriculture in insects. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, v. 36, n. 1, p. 563-595, 2005.



Biotechnology

Scientia Amazonia, v. 9, n. 2, B1-B13, 2020

Revista on-line <http://www.scientia-amazonia.org>

ISSN:2238.1910

RILEY, M. A. 1998. Molecular mechanisms of bacteriocin evolution.

Annual Review of Genetic, 32: 255-278 p.

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

SCOTT JJ, BUDSBERG KJ, SUEN G, et al (2010) Microbial community structure of leafcutter ant fungus gardens and refuse dumps. PLoS One 5:e9922.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10ed. Porto Alegre: Artmed. 967 p. 2012.

VASSE, M. et al. A phylogenetic perspective on the association between ants (Hymenoptera Formicidae) and black yeasts (Ascomycota: Chaetothyriales). **Proc. R. Soc. B**, v. 284: 20162519, 2017.

VINHA, G. G. SISTEMÁTICA MOLECULAR de *Atta laevigata* (Smith 1858) e *Acromyrmex balzani* (Emery 1890). Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – 49 Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2007.