



Levantamento dos microrganismos isolados de formigas cortadeiras *Atta laevigata* (Smith, 1858) no município de Coari e o seu potencial enzimático

Diana da Rocha Nepomuceno¹, Janaina da Costa Nogueira², Adriana Dantas Gonzaga de Freitas³,
Cristina Sayuri Maki⁴

Submetido 08/08/2017 – Aceito 10/10/2017 – Publicado on-line 04/01/2018

Resumo

Enzimas proteolíticas produzidas pelo fungo simbiote de formigas cortadeiras são ingeridas, concentradas pelas formigas e depois excretadas através do líquido fecal para otimizar a utilização do substrato vegetal. O presente artigo investigou o potencial dos fungos associados às formigas cortadeiras *Atta laevigata*, bem como o seu potencial biotecnológico. As formigas cortadeiras foram coletadas no Bairro Vale da Benção, município de Coari/Amazonas, e os métodos de isolamento, purificação, cultivo e identificação dos microrganismos presentes nas formigas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Os fungos foram isolados e conservados através dos métodos de Castelani e do Glicerol a 15%. A associação dos microrganismos foi identificado por meio de análise molecular, como extração de DNA e a amplificação dos fragmentos ITS do rDNA dos isolados, para posterior sequenciamento e possível identificação dos gêneros obtidos. Para verificar a produção de enzima celulase foi realizado o teste de produção enzimática, Carboximetilcelulose (CMC). Os resultados não apresentaram a presença de produção de celuloses. Porém, testes para a produção de outras enzimas de interesse industrial poderão ser avaliados, como a pectinase, por exemplo.

Palavras-chaves: Saúvas, Enzimas, Biotecnologia.

Survey of the microorganisms isolated from leaf-cutting ants *Atta laevigata* (Smith, 1858) in the municipality of Coari and its enzymatic potential. Ants that grow fungi belong to the subfamily Myrmicinae, whose members are characterized as being obligatory symbionts of a fungus used as food. Some proteolytic enzymes produced by the fungus are ingested, concentrated by the ants and then excreted through the fecal fluid to optimize the use of the vegetable substrate. The present article had the objective of investigating the potential of the fungi associated to the cutter ants *Atta laevigata*, as well as its biotechnological potential. Cutting ants were collected in the Vale da Benção neighborhood, Coari / Amazonas, and methods of isolation, purification, cultivation and identification of the microorganisms present in the ants were carried out at the Microbiology Laboratory of the Federal University of Amazonas (UFAM). The fungi were isolated and preserved by the Castelani method and 15% Glycerol, and stored in a freezer. The association of the microorganisms was identified by means of molecular analysis, as DNA extraction and the amplification of the ITS fragments of the rDNA of the isolates, for later sequencing and possible identification of the genera of the obtained isolates. To verify the production of enzyme cellulase the enzymatic production test was carried out, adding to the culture medium, Carboxymethylcellulose (CMC). The results did not present the presence of cellulase production, since there was no formation of halos generated by the isolates. The article provided a promising methodology that serves as an instrument for future studies of biotechnological diagnostics, both enzymatic and molecular.

Keywords: Ants, Enzyme, Biotechnology.

¹ Graduada em Biotecnologia pela Universidade Federal do Amazonas, Estrada Coari/Mamiá, nº 305 – Bairro: Espírito Santo – CEP – 69.460-000, Coari, Amazonas, Brasil. e-mail: diana_nepomunceno@hotmail.com

² Discente do programa de Pós-graduação em Biotecnologia (Doutorado) da Universidade Federal do Amazonas. Av. General Rodrigo Octávio, 6200, Coroado I, 69077-000, Manaus, Amazonas Brasil. e-mail: jana-nogueira@hotmail.com

³ Docente da Universidade Federal do Amazonas – Campus do Instituto de Saúde e Biotecnologia – ISB/Coari, Estrada Coari Mamiá, 305, Bairro Espírito Santo, 69460-000, Coari, Amazonas Brasil. e-mail: adrianadantas1@gmail.com

⁴ *In Memoriam*

1. Introdução

Trabalhos envolvendo formigas cultivadoras de fungo, mostram que sua capacidade de promover o desenvolvimento desse fungo cultivado é muito mais abrangente do que se esperava, sendo que, em algumas espécies de Attini inferiores, a transmissão do fungo simbiote não ocorre apenas por “transmissão vertical” (intraespecífica), mas também, por “transmissão lateral” (interespecífico) (ANTUNES et al., 2005; GREEN et al., 2002; MULLER et al., 1998, 2001).

Uma grande maioria de fungos cultivados pelas formigas da tribo Attini pertencem a dois gêneros, *Leucocoprinus* e *Leucoagaricus* (tribo Leucocoprinae, Família Lepiotaceae) (ANTUNES et al., 2005), com exceção do gênero *Apterostigma*, a qual cultiva um fungo da família Tricholomataceae (SCHULTZ e BRADY, 2008).

Uma das dificuldades na identificação do fungo simbiote se deve ao fato de que a fase sexuada não é muito comum, pois as formigas limitam o seu desenvolvimento a uma fase vegetativa (JESOVNICK et al., 2016), resultando na ausência das estruturas de frutificação e dificultando sua taxonomia. No entanto, alguns casos já foram observados (BONONI et al., 1981; MUCHOVEJ et al., 1991; CRUZ; BATISTA-FILHO, 1993; PAGNOCCA et al., 2001).

Após as análises das descrições morfológicas de basidiomas fúngicos realizadas anteriormente, Singer (1986) renomeou o fungo das formigas Attini como *Leucoagaricus gongylophorus*, denominação esta, aceita atualmente. Como todas essas descrições foram baseadas em aspectos morfológicos e muitas vezes, em ninhos mortos ou em processo de regressão, a suspeita de que tais estruturas poderiam pertencer a contaminantes nunca foi completamente descartada.

No entanto, Pagnocca et al., (2012), descreveram a ocorrência da fase sexuada do fungo em um ninho natural de *Acromyrmex fallax* Santschi comprovando pela primeira vez, através de técnicas moleculares como a técnica de Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso (RAPD), tratar-se do *Leucoagaricus gongylophorus* e não de um eventual contaminante.

O fungo produz estruturas especializadas chamadas gongilídeos, as quais constituem um intumescimento da porção terminal das hifas, ricos em lipídeos e carboidratos (QUILAN; ANTUNES et al., 2000; VAN ARNOM et al.,

2016) e que são fornecidos diretamente na boca das larvas, pelas operárias que as alimentam.

As relações simbióticas nutricionais em várias ordens de insetos desenvolveram-se independentemente com diferentes tipos de microrganismos. Alguns grupos de insetos desenvolveram sistemas de cultivo onde o simbiote fúngico é mantido externamente servindo de alimento para o inseto (ectossimbiose). Outros grupos mantêm relações mais íntimas carregando os simbiossitos internamente (endossimbiose), esses simbiossitos podem ainda estar presentes no lúmen do intestino na forma livre, os extracelulares, ou dentro de células especializadas, os intracelulares.

Tendo em vista tal fato, as enzimas que são originárias de microrganismos apresentam vantagens quando comparadas com as produzidas por animais ou vegetais, pois possui um custo menor de produção, esta produção é possível em uma grande escala industrial em fermentadores e proporcionam um espectro vasto de particularidades físico-químicas. Portanto, o presente artigo investigou o potencial dos fungos associados às formigas cortadeiras *Atta laevigata*, bem como o seu potencial enzimático.

2. Material e Método

2.1 COLETA DOS INSETOS.

A coleta das formigas cortadeiras (*Atta laevigata*) foi realizada no Bairro Vale da Benção no Município de Coari-Amazonas. Inicialmente, realizou-se o reconhecimento do formigueiro e em seguida iniciou-se o processo de escavação. Posteriormente, foi realizada a coleta das formigas, foram coletadas todas as castas (rainha, soldados e operárias) e estas foram alocadas em recipientes próprios para conservação *in vivo*, encaminhadas para o Instituto de Saúde e Biotecnologia, Campus da Universidade Federal do Amazonas e conduzidas para o laboratório de microbiologia.

2.2 ISOLAMENTO DOS MICROORGANISMOS.

Para o isolamento, os insetos foram postos no refrigerador por 2 min para deixá-los “adormecidos”. Em seguida, com o auxílio de um bisturi, as formigas foram divididas em cabeça, tórax e abdômen, além dos insetos completos (com todas as estruturas). Posteriormente, transferiu-se os fragmentos obtidos para placas de Petri contendo meio de cultura Batata Dextrose

Ágar (BDA). As formigas inteiras também foram colocadas em placas, porém era uma em cada placa. As culturas foram armazenadas em estufa tipo B.O. D. (*Biological Oxygen Demand*) a 28°C. Após sete dias, realizou-se a repicagem.

2.3 OBTENÇÃO DE COLÔNIAS MONOSPÓRICAS

Com a finalidade de se obter colônias de fungo puras (separadas), ou seja, colônia de um único conídio realizou-se a purificação dos isolados, e posteriormente a diluição seriada seguida de plaqueamento de acordo com o protocolo de Azevedo e Costa (1973).

2.4 CONSERVAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Os fungos foram armazenados em duplicatas, utilizando duas metodologias diferentes: método de Castellani (1939) e do método do glicerol a 15%. O mesmo foi conservado e encaminhado para a coleção de microrganismos do instituto.

2.5 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS.

Para a identificação dos isolados, realizaram-se observações macroscópicas da colônia (crescimento, coloração, textura e pigmento difuso) e observações microscópicas das estruturas vegetativas (hifas) por meio de microcultivos. Para este método, retirou-se três pequenas porções de micélio, as quais foram posicionadas com a mesma distância entre si, sobre meio BDA em placa de Petri. A seguir, uma lamínula autoclavada foi depositada e pressionada sobre cada um dos pequenos inóculos.

As placas foram vedadas com filme plástico de PVC e submetidas à incubação em estufa B.O.D. a 28 °C, até o início do crescimento e da esporulação do fungo sobre a lamínula. Após o crescimento, as lamínulas foram retiradas cuidadosamente do meio de cultura (com o auxílio de uma pinça autoclavada) e posicionadas sobre uma lâmina de microscopia contendo uma gota de corante lactofenol azul algodão (Sigma). A visualização de microestruturas (vegetativas e reprodutivas) foi realizada utilizando-se aumento total de 400X.

2.6 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS.

Os isolados foram cultivados em tubos tipo Falcon, contendo 20 mL de meio Batata-Dextrose (BD) autoclavado (2% dextrose (p/v);

q.s.p. 1000 mL de caldo de cozimento de batata inglesa) durante 3 dias, mantida em estufa B.O.D. a 28 °C. Após esse período, o micélio foi separado do meio de cultura por filtração a vácuo e lavado por três vezes com água destilada autoclavada.

A massa micelial foi triturada em cadinho de porcelana com 1mL de tampão de extração (8mL de Tris HCl 1M; 2mL de EDTA 0,5M ; 4mL SDS 10%; 2mL NaCl 5M; 24mL de água destilada autoclavada); a massa pastosa proveniente da trituração foi transferida para microtubos de 2mL, incubou-se em banho seco a 60 °C por 1h:15min, e após foram submetidos à centrifugação a 10.000 rpm durante 10 minutos.

Coletou-se o sobrenadante, transferindo-o para microtubos vazios, adicionando-se em seguida, 500µL de fenol equilibrado. Agitou-se suavemente o tubo, o qual foi submetido a nova centrifugação, nas mesmas condições já descritas. Coletou-se o sobrenadante, transferindo-o para microtubos vazios, adicionando-se em seguida, 700µL de clorofane (fenol: clorofórmio, 1:1). Agitou-se suavemente o tubo, o qual foi submetido a nova centrifugação. Coletou-se novamente o sobrenadante, transferindo-o para novos microtubos, adicionando-se em seguida, 700µL de clorofil (clorofórmio: álcool isoamílico, 24:1).

Agitou-se suavemente, centrifugou-se, coletou-se o sobrenadante, transferindo-o novamente para um novo microtubo, ao qual adicionou-se 50µL de NaCl 3M e 700µL de álcool etílico absoluto a -20°C. Inverteu-se o tubo várias vezes, até a observação da precipitação dos ácidos nucléicos. Centrifugou-se o tubo mais uma vez, descartando-se, em seguida, o sobrenadante. Ao *pellet*, adicionou-se 500µL de álcool etílico a 70%, descartando-o em seguida. Adicionou-se álcool etílico absoluto (-20°C), descartando-o em seguida. Os tubos foram invertidos sobre papel absorvente, durante aproximadamente 1h. Ao *pellet*, foram adicionados 200µL de tampão TE (10mM Tris HCl; 1mM EDTA). Os tubos foram agitados para solubilização dos ácidos nucléicos e em seguida, transferidos para a geladeira (4°C), onde foram mantidos até a quantificação do DNA.

O DNA foi quantificado utilizando 10µL da solução tampão TE, 5 µL do corante dye e 5 µL de DNA extraído, no qual foram pipetados em gel de agarose-TAE (1%) corado com brometo de etídeo, juntamente com o marcador de 50pb (LGC). O gel foi submetido a uma corrente 12 de 100V e após a corrida, as bandas foram

visualizadas em transiluminador UV, sendo o gel fotodocumentado.

Após a quantificação foram feitas diluições das amostras de DNA, utilizadas nas reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para a amplificação dos fragmentos de ITS do rDNA. As amostras foram diluídas de 50ng/μL para a proporção de 1:3 DNA:água MiliQ, ou seja, utilizou-se 30 μL de DNA e 60 μL de água MiliQ totalizando um volume de 90 μL; e de 100ng/μL para a proporção de 1:5 DNA:água MiliQ, ou seja, 20 μL de DNA e 80 μL de água MiliQ ficando um volume total de 100 μL água MiliQ. Preparou-se o Mix, ou seja, a solução contendo os dNTPs, nas seguintes concentrações: Tabela 1.

Tabela 1 - Componentes utilizados para preparação do mix, juntamente com suas concentrações.

Componentes	Volume para 1 reação (50μL)	Mix (29 reações)
Água MilliQ	27,2	788,8
Tampão da reação	5	145
dNTP	5	145
Primer ITS 1	2,5	72,5
Primer ITS 4	2,5	72,5
MgCl ₂	3	87
Taq polimerase	0,8	23,2
Vol. total do mix	46μL	1.334μL
DNA/água	4	4
Vol. total da reação	50μL	---

Após a preparação do mix, pipetou-se 46 μL do mesmo em tubos de PCR e adicionou-se mais 4 μL de DNA diluído e homogeneizou-o gentilmente. Em seguida, as amostras foram encaminhadas para um termociclador.

2.7 AMPLIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS REGIÕES ITS DO rDNA

A amplificação do ITS1-5.8S-ITS2 rDNA foi realizada por meio da técnica de PCR (FUNGARO, 1998), onde foram utilizados os primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). As reações apresentaram um volume final de 50μL (40ng de DNA molde; 0,4M de cada primer; 0,2mM de cada dNTP; 7,4mM de MgCl₂; 2U da enzima Taq DNA polimerase e 1X tampão da enzima). O volume foi completado com água ultrapura autoclavada e em todas as reações, foi utilizado um controle negativo com água, em substituição ao DNA molde.

Os microtubos (volume total de 0,2mL) foram submetidos ao termociclador (Applied Biosystems), em uma sequência composta pelas seguintes etapas: desnaturação inicial (94°C por 5 minutos), seguida de 25 ciclos compostos por uma etapa de desnaturação (94°C durante 30 segundos), uma etapa de anelamento (55°C durante 30 segundos) e uma etapa de extensão (72°C durante 30 segundos), seguida de uma etapa final de 72°C durante 7 minutos e por fim 4 °C *overnight*.

Após a reação de PCR, 5μL da reação foram pipetados em tubos de PCR contendo 5μL de corante, em seguida as amostras foram aplicadas em gel de agarose-TAE (1,2%) corado com brometo de etídeo, tendo como marcador, o ladder 1Kb (LGC). Após a corrida, as bandas foram visualizadas em transiluminador de luz UV e o gel foi fotodocumentado. Os fragmentos de ITS obtidos na amplificação foram purificados utilizando-se o kit GFX PCR Purification (Qiagen).

2.8 PRODUÇÃO DE ENZIMAS: MEIO PARA O CRESCIMENTO FÚNGICO E INDUÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para o crescimento fúngico e indução da atividade enzimática, foi utilizado o meio de cultura contendo Carboximetilcelulose (CMC). O meio de cultura mínimo sólido CMC foi preparado com a seguinte composição: Carbonato de Potássio (KCO₂) – 3,75 g; Nitrato de Sódio (NaNO₂)- 4,5 g; CMC-7,5g; Sulfato de Magnésio (MgSO₄) 7H₂O – 0,375 g; -Ágar – 11,25 g; Sulfato de Zinco (ZnSO₄) - 0,0075g; Água destilada - 750 mL; Fosfato de Potássio (KH₂ PO₄) - 1,125g; Fosfato de Ferro (FeSO₄)- 0,0075g.

Para o preparo do meio, os reagentes foram diluídos em água destilada e para indução da enzima de interesse do estudo, foi adicionado o substrato Carboximetilcelulose – CMC. O pH para detecção de celulase foi de 5,0. Após a solução foi levada para autoclave por 15min a 120°C. Percorrido o tempo determinado verteu o meio em placas de Petri e estas foram acondicionadas na geladeira.

2.9 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Os cultivos foram realizados de acordo com a técnica descrita por HANKIN e ANAGNOSTAKIS (1975), na qual se retirou três discos de BDA com micélio, de cerca de 10mm, e

transferiu-se para uma placa com meio de cultura contendo CMC de forma que cada disco ficou equidistante um do outro. Transferiram-se as culturas para estufa e aguardou-se seu crescimento por três dias.

2.10 DETERMINAÇÃO ENZIMÁTICA QUALITATIVA

Decorrido o período de incubação (3 dias), a superfície do ágar foi borrifada com solução reveladora, para a determinação da atividade enzimática. A solução reveladora utilizada foi à solução de vermelho Congo a 0,1 % (celulases). Após 15 minutos, a solução reveladora foi descartada, e uma solução de NaCl foi adicionada sobre a superfície do ágar, para descoloração e assim visualização de formação de halos e de micélio, sendo o diâmetro destes, medidos e comparados.

3. Resultados e Discussão

3.1 ISOLAMENTO DOS FUNGOS

Obteve-se como resultado, aproximadamente 100 isolados fúngicos associados a formigas cortadeiras, *Atta laevigata*, oriundos de seus fragmentos e do inseto completo, porém apenas 12 destes isolados foram utilizados, pois foi feito um teste enzimático prévio para produção de celulase e estes doze isolados demonstraram possível capacidade de produzir tal enzima. Estes fungos foram considerados morfologicamente iguais, mesmo sendo originários de partes diferentes das formigas como cabeça, tórax e abdômen, além do inseto com todas as suas estruturas. As condições empregadas para o isolamento tais como: meio de cultura (BDA), temperatura (28°C), entre outros, foram favoráveis igualmente para todos os microrganismos que cresceram com velocidade rápida, ou seja, menos de uma semana.

Outro evento observado foi à obtenção de colônias puras oriundas de um único conídio (colônia monospórica), obtendo assim, colônias morfologicamente semelhantes. Contudo, considera-se que, embora a eficiência de isolamento dos fungos ter sido elevada, o mesmo não se aplica à diversidade, que foi considerada baixa ao analisar as culturas de forma macroscópica (crescimento, coloração, textura e pigmento difuso).

3.2 CARACTERIZAÇÃO MACRO E MICROSCÓPICA DOS FUNGOS ISOLADOS

Os fungos foram analisados por meio das características macroscópicas e microscópicas, no qual o aspecto macromorfológico das colônias dos isolados foi examinado a olho nu, com atenção especial ao crescimento micelial, à textura e à coloração da colônia. Todos os isolados apresentaram crescimento micelial rápido, coloração branca, textura veludada e aspecto pegajoso. O aspecto micromorfológico das estruturas vegetativas e reprodutivas foi examinado sob microscopia de luz, em aumento total de 400X e foi observada presença de hifas, de conidióforo sem os conídios, e conídios de forma dispersa.

3.3 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS E AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS DO rDNA

Todas as amostras de DNA quantificadas dos isolados apresentaram integridade no DNA nas condições empregadas, tendo sido utilizados nas reações de amplificação, com procedimentos de diluição para ajuste de concentração, a qual foi utilizada para que todas as amostras atingissem a concentração de 20ng/μL à 40ng/μL de DNA total.

3.4 DETERMINAÇÃO ENZIMÁTICA

Os resultados para reações enzimáticas positivas foram identificados por meio da formação de um halo translúcido, ao redor de cada disco. Dos 12 isolados analisados para a produção da enzima celulase, apenas o isolado D9 apresentou formação do halo. O teste incide na hidrólise da celulose presente no meio de cultura, a hidrólise é visualizada por meio da formação de halo com coloração “amarela” envolta do isolado produtor de celulase (KIM, et al.,2000; TEATHER e WOOD,1982). Porém, com os cálculos realizados para determinar a média do diâmetro micelial e do halo formado, observou-se que o fungo D9 degradou celulose só para seu crescimento, pois a média do halo que foi de 14 mm foi inferior à média da colônia 39,83 mm.

É importante destacar que embora não tenha sido detectada atividade enzimática para os fungos isolados, não se deve rejeitar por completo a sua ausência, pois são vários os fatores que podem vir contribuir para a ativação do sistema lignocelulolítico como condições nutricionais, substrato metabolizável e várias outras condições de cultivo (REGINA et al, 2009).



4. Conclusão

Foi possível realizar o isolamento dos fungos associados às formigas cortadeiras. Utilizando os fragmentos do DNA fúngico amplificados, será possível dar procedimento ao sequenciamento, que permitirá a identificação dos isolados, em nível de gênero e espécie.

O teste enzimático não foi satisfatório, pois os fungos degradaram celulose apenas para seu crescimento e não para produção da enzima celulase. Apenas um isolado produziu celulase, mas a média do halo formado foi inferior à média do micélio. Porém, testes para a produção de outras enzimas de interesse industrial poderão ser avaliados, como a pectinase, por exemplo. Sendo assim, concluiu-se que temos uma metodologia promissora que serve de instrumento para futuros estudos de diagnósticos biotecnológicos, tanto enzimáticos, como moleculares.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, por ter-me concedido a graça de realizar mais essa etapa de minha vida. Aos meus pais que não mediram esforços para que eu realizasse esse sonho e conquista. Aos meus irmãos, pelo carinho e apoio em todos os âmbitos de minha vida acadêmica. A Profa. Dra. Adriana Dantas Gonzaga de Freitas pela orientação, e oportunidade de realizar trabalhos científicos e pelo otimismo. A Profa. Dra. Cristina Maki e a Msc. Janaína Nogueira, pela disponibilidade, ensinamentos e paciência para que a conclusão desse trabalho fosse realizada. As colegas do "LabMicro" pela ajuda no início deste trabalho, em especial a Josy Aparício que esteve comigo em todas etapas do trabalho.

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

- ANTUNES, E. C.; Guedes, R. N. C.; DELLA LUCIA, T. M. C.; SERRÃO, J. E. Abamectin-driven alterations on queen ovarios of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, 45: 163-172. 2005.
- AZEVEDO, J. L.; COSTA, S. O. P. Exercícios práticos de Genética. São Paulo: **Nacional**, 1973.
- BONONI, V.L.R.; TRUFEM, S.F.B.; GRANDI, R.A.P. Fungos macroscópicos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, depositados no Herbário do Instituto de Botânica. **Rickia** 9: 37-53. 1981.
- CASTELLANI, A. The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. **J. Tropical Medicine**. Hyg. 42: 225-226. 1939.
- CHAPELA, I. H.; REHNER, S. A.; SCHULTZ, T. R.; MUELLER, U. G. Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi. **Science**, 266: 1691-1694. 1994.
- CRUZ, B. P. B.; BATISTA FILHO, A. Manifestação da forma perfeita de *Leucoprinus gongylophorus* (Moller) Heim em saubeiro artificial de *Atta sexdens rubropilosa* Forel. **Arq. Inst. Biol.** 60(1): 66-69. 1993.
- GREEN, A. M.; MUELLER, U. G.; ADAMS, R. M. M. Extensive exchange of fungal cultivars between sympatric species of fungus-growing ants. **Molecular Ecology**. Oxford, v.11, n. 2. 191-195 p. 2002.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid medi for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, Lawrence, v.67, p.597-607, 1975.
- JESOVNIK, A.; GONZÁLEZ, V. L.; SCHULTZ, T.R. Phylogenomics and Divergence Dating of Fungus-Farming Ants (Hymenoptera: Formicidae) of the Genera *Sericomyrmex* and *Apterostigma*. **Plos One**, 2016.
- KIM, Y.S.; JUNG, H. C. Bacterial cell surface display of an enzyme library for selective screening of improved cellulose variants. **Environmental Microbiology**, v.66 (2), p. 788-793, 2000.
- MUCHOVEJ, J. J.; DELLA LUCIA, T. M.; MUCHOVEJ, R. M. C. *Leucoagaricus weberi* sp. nov. from a live nest of leaf-cutting ants. **Mycol. Res.**, 95 (11): 1308-1311. 1991.
- MUELLER, U. G.; REHNER, A.; SCHULTZ, T. R. The evolution of agriculture ants. **Science**, 281: 2034-2038. 1998.



MUELLER, U. G.; SCHULTZ, T. R.; CURRIE, C. R.; ADAMS, R. M. M.; MALLOCH, D. The origin of the attine ant-fungus symbiosis. **Quarterly Review Biol.**, 76: 169-197. 2001.

PAGNOCCA, F. C. et al. RAPD analysis of the sexual state and sterile mycelium of the fungus cultivated by the leaf-cutting ant *Acromyrmex hispidus fallax*. **Mycological research**. Cambridge. V. 105. n. 2. 173-176 p. 2001.

PAGNOCCA, F.C. et al. Specialized Fungal Parasites and Opportunistic Fungi in Gardens of Attine Ants. **Psyche**, v.2012.

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

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

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

SILVA, A. Participação do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* na produção de enzimas intestinais da formiga *Atta sexdens*. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada), **Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista**. 2000.

SINGER, R. The Agaricales in modern taxonomy. In: Fisher, P. J.; Stradling, D. J.; Pegler, D. N. (1994) Leaf cutting ants, their fungus gardens and the formation of basidiomata o *Leucoagaricus gongylophorus*. **Mycologist**, 8 (3): 541-546. 1986.

TEATHER, R. M.; WOOD, P. J. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterizations of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Environmental Microbiology**, v.43 (4), p. 777-780,1982.

VAN ARNAM, E.B., RUZZINI, A.C., SIT, C.S., HORN, H., PINTO-TOMÁS, A.A., CURRIE, C.R., CLARDY, J. Selvamycin, na atypical antifungal polyene from two alternative genomic contexts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.113, p.12940-12945, 2016.