

# Blattschneiderameisen Gourmets oder schlaue Gärtner?

Julia Kernbach, Noah Hohenfeld

17. Januar 2021



Jugend forscht Regionalwettbewerb Südbaden 2021

Schule: Hans-Thoma-Gymnasium (Lörrach)

phænovum Schülerforschungszentrum Lörrach-Dreiländereck

## Kurzfassung

Blattschneiderameisen weisen eine eindeutige Präferenz für Rosenblütenblätter gegenüber Laubblättern auf. Dies stellten wir in unserer ersten Arbeit fest. Zwar konnten wir eine Korrelation mit dem in den Blüten enthaltenen Zucker feststellen, aber ob diese Vorliebe einzig von den Ameisen ausgeht, oder ob diese Rücksicht auf den von ihnen kultivierten Pilz nehmen, blieb unbeantwortet. Wir haben deshalb neue Fütterungsversuche mit einer Kolonie der Art *Atta colombica* durchgeführt. Den Ameisen wurden mit verschiedenen Lösungen präparierte Liguster-Blättchen angeboten. Hierbei wurden Glukose-Blättchen am häufigsten abtransportiert. Der von uns subkultivierte Pilz der Ameisen wächst auf Medien mit Malzextrakt oder Glukose als Energiequelle besonders schnell, langsamer auf Stärke, Cellulose oder Lipiden. Die Identität des Pilzes wurde mikroskopisch und genetisch nachgewiesen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>2</b>
2.1	Die Versuchskolonie . . . . .	2
2.2	Fütterungsversuche . . . . .	3
2.2.1	Versuchsaufbau . . . . .	3
2.2.2	Auswahlversuch: Rosenblüten gegen Rosenblätter . . . . .	3
2.2.3	Fütterungsversuche mit Substratlösungen in Ligusterblättchen . . . . .	3
2.3	Kultivierung und Pilzwachstumsversuche . . . . .	5
2.3.1	Medien . . . . .	5
2.3.2	Subkultivierung . . . . .	5
2.3.3	Wachstumsversuch . . . . .	5
2.4	Genetische Charakterisierung des Pilzes . . . . .	6
2.5	Mikroskopie . . . . .	6
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>7</b>
3.1	Ameisenkolonie während der Versuche . . . . .	7
3.2	Fütterungsversuche . . . . .	7
3.2.1	Nachweis der Präferenz der Ameisen für Rosenblüten . . . . .	7
3.2.2	Glukose . . . . .	8
3.2.3	Rosenwasser . . . . .	9
3.2.4	Stärke und Lipide . . . . .	9
3.3	Pilz . . . . .	9
3.3.1	Kultivierung des Pilzes . . . . .	9
3.3.2	Genetische Charakterisierung . . . . .	11
3.4	Wachstumsversuche . . . . .	12
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>13</b>
<b>5</b>	<b>Danksagung</b>	<b>15</b>
<b>6</b>	<b>Literatur</b>	<b>15</b>

# 1 Einleitung

Nachdem wir im Naturhistorischen Museum Basel zum ersten Mal Blattschneiderameisen gesehen hatten, wollten wir mehr über diese Tiere erfahren. Im Rahmen unserer Nachforschungen haben wir die Dokumentation „Ameisen - Die heimliche Weltmacht“ auf Arte gesehen und ließen uns sofort von den im Vordergrund stehenden Blattschneiderameisen faszinieren.

Der natürliche Lebensraum von Blattschneiderameisen befindet sich in Mittel- und Südamerika. Die Nester der Blattschneiderameisen können sehr groß werden. Ein zu Untersuchungszwecken mit Zement ausgegossenes Nest hatte eine Fläche 50 qm und die Tiefe betrug 8 m. (Hölldobler, 2010). So verfügte dieses Nest (5-8 Mio. Tiere) über tausende Nestkammern, Gänge und ein Belüftungssystem.

Was Blattschneiderameisen von anderen Ameisenarten unterscheidet, ist die Tatsache, dass sie einen Pilz kultivieren und somit eine Art Landwirtschaft betreiben (Roces, 2014). Diese besonders enge Form der Symbiose von Ameisen und Pilz hat zur Folge, dass weder Ameisen und deren Bakterien ohne Pilz noch Pilz ohne Ameisen und Bakterien existieren können. Der für die Symbiose typische Pilz *Leucoagaricus gongylophorus* gehört zu den Egerlingsschirmpilzen und ist mit Champignons verwandt.

Die Ameisen schützen den Pilz nicht nur durch die Kultivierung in den unterirdischen Pilzgärten, sondern auch durch auf ihrem Brustpanzer lebende symbiotische Bakterien, die Substanzen zur Abwehr von Schadpilzen und Bakterien, die dem Pilz schaden, produzieren.

Die Pilzhyphen ("Triebe") sind vor allem Nahrung für die Larven und die Königin. Die Arbeiterinnen ernähren sich auch von dem Pflanzensaft der geernteten Blätter.

Kolonie-intern organisieren sich die Tiere mit Hilfe der Einteilung in Kasten. Deren jeweilige Aufgaben variieren von Futterbeschaffung über Pilzgärtneri bis hin zur Verteidigung von Kolonie und Königin. Die Kasten kann man anhand der Größe der Ameisen unterscheiden. Das größte Tier ist die Königin, sie kann 15 bis 20 Jahre alt werden. Die Kaste mit den größten Individuen sind die Soldatinnen. Große Arbeiterinnen, die für die Straßen und die Freihaltung derer von jeglicher Vegetation verantwortlich sind, bilden die nächste Kaste. Die nächstkleineren Arbeiterinnen schneiden und transportieren Blätter zum Bau. Diese haben kleine Helfer auf ihrem Rücken, die sie vor potenziellen Angreifern beschützen. Pilzbauern sind die kleinsten Ameisen. Diese Kaste bereitet durch Zerkauen der Blätter für den Pilz die Nahrung auf und kümmert sich um die Sauberkeit in den Pilzgärten (Abbildung 3c, 3e). Der Pilz verarbeitet dann die für die Ameisen unverdaulichen cellulosehaltigen Blätter (Roces, 2014).

Blattschneiderameisen orientieren sich in ihrer Umgebung mit Hilfe ihres Geruchssinns, mit dem sie auch untereinander kommunizieren. Dazu produzieren sie besonders leistungsstarke Pheromone, die als chemische Signale eingesetzt werden.

Darüber hinaus lernen die Tiere, welches Futter sie dem Pilz nicht bringen dürfen, da es diesem schadet ("food avoidance", Arenas Roces, 2017). Im Gegensatz dazu gibt es allerdings noch kaum Erkenntnisse dazu, ob die Ameisen positive Futterpräferenzen haben, das heißt, ob sie aus einem Futterangebot ein bestimmtes Futter aktiv auswählen.

In unserer ersten Arbeit „Gourmets auf 6 Beinen - Futterpräferenzen von Blattschneiderameisen“ hatten wir uns einen Ansatz überlegt, mit dem wir diese Frage untersuchen konnten. Wir konnten unsere Versuche mit der Blattschneiderameisenkolonie der Art *Atta cephalotes* des Naturhistorischen Museums Basel durchführen. Mit unterschiedlichen Kombinationen aus Futterangeboten konnten wir zeigen, dass die Tiere im Vergleich mit Haselnussblättern, Rosenlaubblättern und Haferflocken eine eindeutige Präferenz für Rosenblüten haben. Diese werden bevorzugt in den Pilzzylinder der Kolonie eingetragen. Eine Analyse der wichtigsten Inhaltsstoffe ließ vermuten, dass diese Vorliebe den Zucker in den Blüten als Ursache hat.

Der Frage, was genau zur Präferenz der Ameisen für die Blüten führt, wollten wir weiter auf den Grund gehen und zusätzlich noch herausfinden, ob diese Präferenz direkt von den Ameisen ausgeht, oder ob die Ameisen "wissen", mit welchem Futter der Pilz am besten umgehen kann. Für unsere Experimente erhielten wir eine königinnenlose Blattschneiderameisenkolonie der Art *Atta colombica*, die seit 2002 von der Arbeitsgruppe Roces des Zoologischen Instituts II der Universität Würzburg kultiviert wurde und ursprünglich aus Panama kommt. Mit dieser Kolonie haben wir folgende Fragen adressiert: (1) Lässt sich die Präferenz für Rosenblüten auch bei *Atta colombica* nachweisen? (2) Können wir eine Präferenz für einen bestimmten Inhaltsstoff der Rosenblüten auch mit einem weiteren Versuchsansatz zeigen? Dazu haben wir Ligusterblattscheiben mit verschiedenen Inhaltsstoffen präpariert und das Transportverhalten der Ameisen untersucht. (3) Können wir den Pilz der Ameisen *Leucoagaricus gongylophorus* subkultivieren und dann das Wachstum des Pilzes auf verschiedenen Kohlenhydraten bzw. Kohlenstoffquellen untersuchen?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Die Versuchskolonie

Die Kolonie, die wir für unsere Versuche nutzten, ist eine Blattschneiderameisenkolonie der Art *Atta colombica*. Zur Verfügung gestellt wurde sie uns von der Arbeitsgruppe Roces der Universität Würzburg. Ursprünglich stammt die Kolonie aus Panama und ist seit 2002 an der Universität kultiviert worden. Der künstliche Bau der Ameisen ist in Abbildung 1 dargestellt. Während die erste Kammer (K1) zur regulären Fütterung der Ameisen dient, werden die Kammern K2 bis K4 von den Ameisen zum Kultivieren des für sie lebenswichtigen Pilzes genutzt. Die fünfte Kammer (K5) fungiert als Mülllager für die Kolonie.

Außerhalb von Versuchen erhalten die Ameisen täglich, beziehungsweise später jeden zweiten Tag frische Brombeerblätter, sowie Wasser und Honigwasser (Abbildung 3d). Es handelt sich bei dieser Kolonie um eine Restkolonie. Das heißt: Die Königin und damit die einzige Reproduktionseinheit der Kolonie ist zum Zeitpunkt unserer Versuche bereits tot. Die Kolonie kann so lange weiterleben, wie noch Puppen im Pilzgarten vorhanden sind, aus denen Arbeiterinnen schlüpfen können. Die Ameisenkolonie wird idealerweise bei 25°C und 50% relativer Luftfeuchtigkeit gehalten. Dazu wurde den Raum, in dem die Kolonie stand, mit einer Temperatursonde und einer Sonde zur Messung der relativen Luftfeuchtigkeit (Vernier, Labquest als Datenlogger) konstant überwacht.

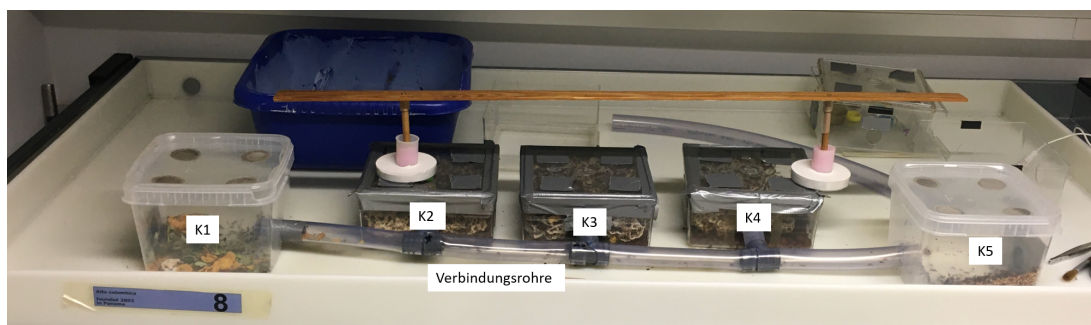


Abbildung 1: Bau der Ameisenkolonie; K1: Futterkammer; K2-K4: Pilzkammern; K5: Abfallkammer; Standort: Konstantraum der Universität Würzburg.

## 2.2 Fütterungsversuche

### 2.2.1 Versuchsaufbau

Der Deckel von Kammer 1 wurde geöffnet, um eine Brücke mit Rampen an beiden Enden hineinzustellen. Die Brücke führte zu einer zusätzlichen Kammer. In diese Kammer wurden Brombeerblätter als Lockmittel für die Ameisen gelegt. Sobald ein stetiger Strom von Ameisen die Brücke überquerte, wurde mit dem Versuch begonnen. Dazu wurden eine bzw. zwei Fütterungsplattformen etwa in der Mitte der Brücke seitlich angestellt. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 2 abgebildet.

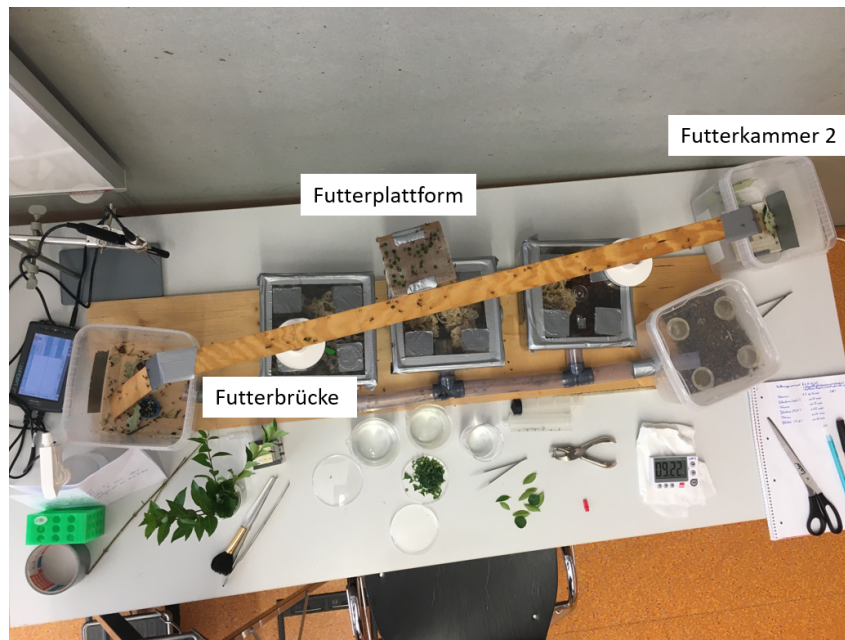


Abbildung 2: Aufbau der Futterbrücke

### 2.2.2 Auswahlversuch: Rosenblüten gegen Rosenblätter

Es wurden zwei Plattformen an gegenüberliegende Seiten etwa in der Mitte der Brücke gestellt. Auf diesen Plattformen wurden den Ameisen Rosenblütenblätter (leicht kleingezupft) und Rosenlaubblätter (ausgestanzte Scheibchen mit 6 mm Durchmesser) für jeweils 10min angeboten (Abbildung 3f). Beide Futterarten waren in jedem 10min-Lauf für die Ameisen gleichzeitig erreichbar, wobei die Plattformen, auf denen sie präsentiert wurden, regelmässig abgewechselt wurden. Es fanden zwischen drei und sechs Wiederholungen pro Versuch statt.

### 2.2.3 Fütterungsversuche mit Substratlösungen in Ligusterblättchen

Getestet wurden Glukoselösungen (2%, 3,95%, 7,9%, 12%, 15,8%), eine Stärkelösung (2%) Rosenwasserlösungen (100%, 50%, 25%) und eine Lipidemulsion (5%).

Ligusterlaubblätter enthalten viel eingeschlossene Luft, die sich durch wässrige Lösungen ersetzen lässt. Dazu wurden Spitze und Ende der Blätter abgeschnitten und sie wurden in eine Spritze mit der jeweiligen Lösung gegeben. Durch das abwechselnde Erzeugen von Unter- und Überdruck in der Spritze wird die Luft der Blätter nach und nach durch die Lösung ersetzt.

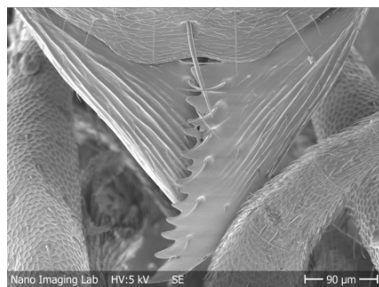
Aus den vollgesogenen Blättern wurden Scheibchen mit 6mm Durchmesser ausgestanzt und den Ameisen für jeweils 10min auf nur einer Plattform am Rand etwa in der Mitte der Brücke angeboten. Nach einem Durchlauf mit einer Lösung wurde stets eine ebenfalls 10minütige Kontrolle mit Wasser-Ligusterblättchen durchgeführt, bevor die Lösung erneut angeboten wurde. Dieser Vorgang wurde pro Versuchstag drei bis sechs mal wiederholt. Diese Art, die Versuche mit Liguster durchzuführen, basiert auf Erfahrungen der AG Roces in Würzburg. Zur Ermittlung der Ameisenanzahl wurde die Gesamtanzahl der pro Versuch abtransportierten Blättchen in einer Woche betrachtet. Mit dieser konnte ein Wochendurchschnitt an abtransportierten Blättchen errechnet werden, durch den sich Rückschlüsse auf die ungefähre Ameisenanzahl während der jeweiligen Woche machen lassen. Das Abtransportieren der Liguster-Blättchen ist in Abbildung 3b dargestellt.



a



b



c



d



e



f

Abbildung 3: a: Pilzkammer der Ameisenkolonie b: Träger-Ameisen auf der Futterbrücke c: REM-Bild der Mandibeln einer Gärtner-Ameise d: Blick in die Futterkammer e: REM-Bild einer Gärtner-Ameise f: Futterplattformen mit Rosenblüten und Rosenblättern

## 2.3 Kultivierung und Pilzwachstumsversuche

### 2.3.1 Medien

Als Grundmedium sowohl für die Subkultivierung als auch für den Wachstumsversuch wurde MEA-LP (Miyashira et al, 2010) verwendet. Es setzt sich aus 20g Malzextrakt, 5g Bactopepton, 2g Hefeextrakt und 20g Agar pro Liter zusammen. Alle Bestandteile wurden von der Firma C. Roth, Karlsruhe, bezogen. Statt Malzextrakt wurde für andere Wachstumsmedien die entsprechende Menge Glukose (Müllers Mühle), lösliche Stärke (Merck), Cellulose (Merck) oder Salatöl (Livio) verwendet. Die Medien wurden bei 121°C und 2 bar für 20 min autoklaviert (dampfsterilisiert). Nach dem Autoklavieren wurde Chloramphenicol in einer Endkonzentration von 30 µg/ml hinzugegeben und die Medien in sterile Petrischalen gegossen (etwa 25 ml/Schale).

### 2.3.2 Subkultivierung

Der Pilz wurde zunächst auf Malzextraktplatten subkultiviert, indem kleine Stücke des Pilzes der Kolonie (Abbildung 3a) entnommen und jeweils in die Mitte einer Platte gesetzt wurden. Die Platten befanden sich danach in einem infors Ecotron Brutschrank bei 25°C. Nach einem Zeitraum von mindestens drei bis maximal sechs Wochen wurde der Pilz auf frische Medien umgesetzt.

### 2.3.3 Wachstumsversuch

Um das Pilzwachstum auf verschiedenen Substraten zu ermitteln, wurden etwa 1mg schwere Stücke des subkultivierten Pilzes auf je 9-10 Platten der unterschiedlichen Medien umgesetzt. Der Mittelpunkt der Platten wurde auf der Unterseite der Platte markiert. In wöchentlichem Abstand wurde dann die Fläche des Pilzes anhand des Radius ermittelt. Mit Hilfe einer Schablone (Abbildung 4 war es möglich vom Mittelpunkt der Platte aus sechs mal den Radius zu messen um einen durchschnittlichen Radius  $r$  zu errechnen. Durch ihn wurde die Fläche des Pilzes mit  $A = \pi \cdot r^2$  ermittelt.

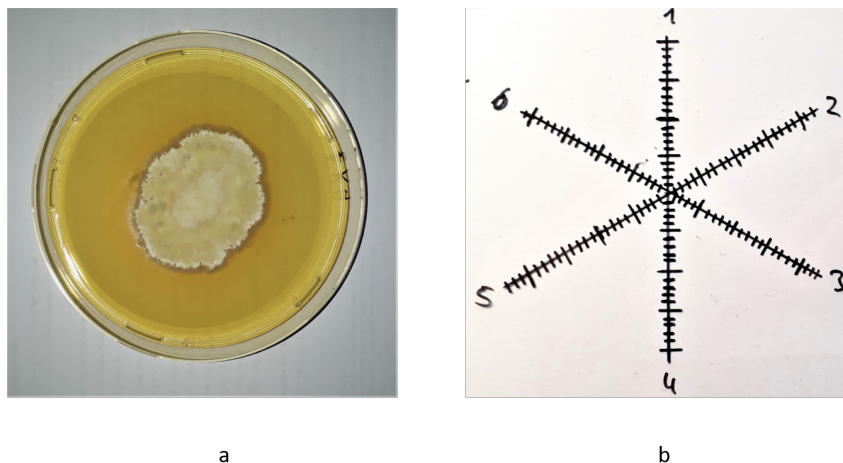


Abbildung 4: (b) Schablone die für die Ausmessung des Flächeninhaltes des kultivierten Pilzes (a) benutzt wurde. Um den Radius, aus dem der Flächeninhalt ermittelt wurde, abzulesen wurde diese über die Platte gelegt.



## 2.4 Genetische Charakterisierung des Pilzes

Zur genetischen Charakterisierung des kultivierten Pilzes wurde außerdem eine genetische Untersuchung mit Hilfe der ITS-Sequenzen (ITS = Internal Transcribed Spacer der rRNA-Gene) durchgeführt. Hierfür wurde zunächst die DNA des Pilzes extrahiert. Es wurden zwei verschiedene Verfahren angewandt, erstens: die NaOH Methode nach Osmundson et al, 2012, zweitens die Mikrowellen-Methode nach Izumitsu et al, 2012. Nach der DNA-Extraktion wurden die ITS-Sequenzen mithilfe der Polymerase Chain Reaction (PCR) vervielfältigt. Hierfür wurden folgende Primer nach White et al, 1990 verwendet:

ITS1 F-(5' -TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' ) und

ITS4 R-(5' -TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' )

Die PCR ist ein Verfahren zur spezifischen Vervielfältigung von DNA-Fragmenten, die durch die Lage der Primer definiert werden, und läuft in drei immer wieder hintereinander stattfindenden Schritten (Denaturierung, Annealing, Elongation) ab. Mit jedem Zyklus werden die ITS-Sequenzen verdoppelt. Zur PCR wurde der Q5 Hot Start High Fidelity Master Mix von New England Biolabs nach Herstellerangaben verwendet. Die Primer wurden in einer Endkonzentration von 1 µmol/l, mit je 10µl DNA-Extrakt eingesetzt.

Die Amplifikation erfolgte in einem Techne 3G Cyclyer mit folgendem Programm:

Initial Denaturation: 98°C 30s, 30 Zyklen: 98°C 30s, 68°C 30s, 72°C 1min, Final Extension: 72°C 5min. Der erste Denaturierungsschritt bzw. der letzte Kettenverlängerungsschritt werden länger gestaltet, da man sicher gehen will, dass die DNA im ersten Schritt komplett denaturiert und das Enzym aktiviert wird bzw. am Schluss alle Prozesse der DNA-Vervielfältigung beendet sind. Im Anschluss an die PCR wurde ein Teil des Ansatzes einer DNA-Restriktionsanalyse unterzogen mit den Enzymen EcoRI und NsPI, jeweils nach Angaben des Herstellers (New England Biolabs). Die PCR-Produkte bzw. die Produkte der DNA-Restriktionsansätze wurden gelelektrophoretisch analysiert: Zur Gelelektrophorese, einem Verfahren, in dem verschieden lange DNA-Fragmente getrennt werden, wurde ein Gel aus in TRIS-Acetat-EDTA-Puffer(als 10 xTAE bezogen von C.Roth) gelöster Agarose (1%) und 3µl Gelred/50ml Puffer hergestellt und in eine Elektrophoresekammer (Rotiphorese Professional II) gegeben. GelRed ist ein in die DNA intercalierender Farbstoff, der unter UV-Licht (302nm) fluoresziert und somit zum Nachweis von DNA dient.

Mit einer Pipette wurden die einzelnen DNA-Proben in die "Taschen"des Gels gegeben. Es wurde außerdem ein DNA-Größenmarker (100 bp DNA ladder, NEB) in zwei Taschen gegeben. Im Vorfeld wurden die Proben mit einem Loading Dye versetzt, dessen Ficoll-Anteil die Proben am Hinausdiffundieren hindert. Beim Anlegen einer Spannung von 120V wandern die negativ geladenen DNA-Moleküle zur Anode, wobei gilt: je kleiner das Molekül, desto schneller wandert es durch die Gel-Poren. Dadurch wurden die Banden ihrer Größe nach aufgeteilt.

## 2.5 Mikroskopie

Zur lichtmikroskopischen Analyse des Ameisenpilzes wurde ein ZEISS Primostar-Lichtmikroskop genutzt, das mit einer axiocam ER5-Kamera ausgestattet war. Der Kultur bzw. der Kolonie wurde dazu ein kleines Stückchen des Pilzes entnommen und ein Lebendpräparat mit Wasser angefertigt, das mit verschiedenen Vergrößerungsstufen analysiert wurde.

Die Ameisen wurden zur Darstellung mit dem Raster-Elektronenmikroskop zunächst im Nano Imaging Lab der Universität Basel mit Gold bedampft. Danach wurden die Präparate mit einem Rasterelektronenmikroskop (Phillips XL 30 FEG) mit verschiedenen Vergrößerungen analysiert.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Ameisenkolonie während der Versuche

Wir haben die Ameisenkolonie während des Versuchszeitraums regelmässig beobachtet, weil zu erwarten war, dass ohne Königin die Zahl der Puppen, aus denen neue Arbeiterinnen schlüpfen können, konstant abnehmen würde. Anhand der Abbildung 5a, die die wöchentlichen Durchschnitte an abtransportierten Blättchen in absoluten Zahlen zeigt, sieht man deutlich, wie die Zahl der abtransportierten Blättchen mit zunehmender Zeit stark abnimmt. Dies deutet klar darauf hin, dass sich die Kolonie tatsächlich im Endstadium befindet.

Wir haben beobachtet, dass die Ameisen im Lauf der Zeit immer weniger Blätter geschnitten haben. Vorgeschnittene Blattstücke wurden aber regelmässig in den Pilzgarten transportiert. Eine Analyse der Mundwerkzeuge mit dem Raster-Elektronenmikroskop gegen Ende des Versuchszeitraums zeigte, dass die Mandibeln (Mundwerkzeuge) der Blatt-Trägerinnen stumpf und abgenutzt waren (vgl. Abbildung 5b). Daran ist zu erkennen, dass wohl - wenn überhaupt - kaum noch neue Ameisen aus den noch im Pilzgarten vorhandenen Puppen schlüpften, die noch Blätter schneiden konnten.

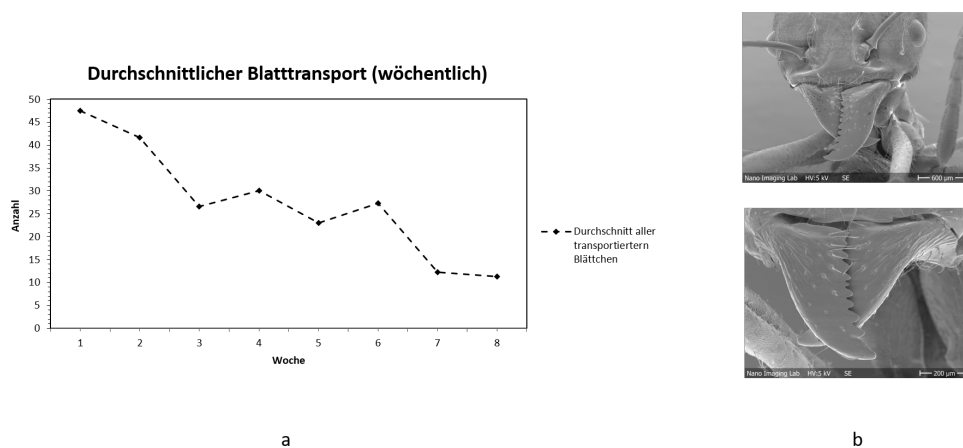


Abbildung 5: Wöchentlicher Blatt-Transport: a: Dargestellt ist die durchschnittliche Anzahl der transportierenden Ameisen während der Versuche; b: Ameisen unter dem Raster-Elektronenmikroskop. Zu sehen sind die abgenutzten Mandibeln zweier Ameisen.

### 3.2 Fütterungsversuche

#### 3.2.1 Nachweis der Präferenz der Ameisen für Rosenblüten

Um nachzuprüfen, ob sich die Ergebnisse der letzten Arbeit auch auf die neue Kolonie übertragen lassen, wurden vier Versuchsreihen durchgeführt. Zunächst wurden Rosenblüten und Rosenblätter auf zwei Plattformen gleichzeitig angeboten.

Sieht man sich die Mittelwerte in Prozent (die Zahl der transportierten Rosenlaubblätter wurde hier als 100% festgelegt) der Versuchsreihen an (Abbildung 6) so erkennt man, dass die Anzahl der abtransportierten Rosenblüten in der ersten Versuchsreihe etwas höher ist als die der Rosenblätter. Auch in den verbleibenden Versuchsreihen kann man eine deutliche Präferenz für die Rosenblüten feststellen. Besonders gut ist dies in der letzten Versuchsreihe zu sehen. In dieser wurden den Ameisen beide Futterarten auf derselben Plattform angeboten.

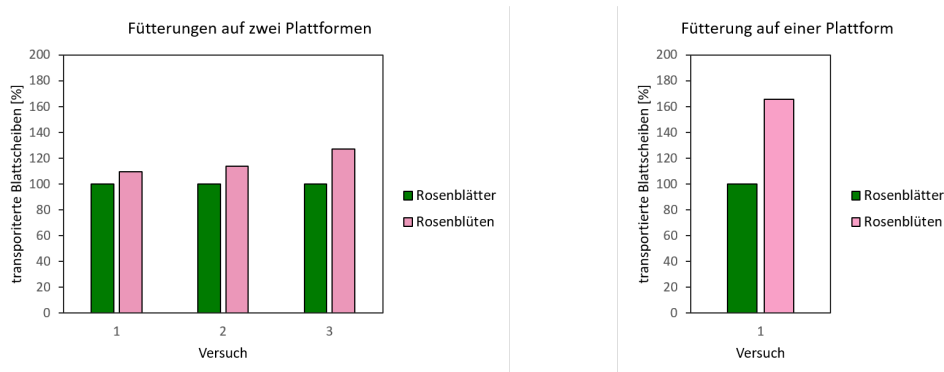


Abbildung 6: Fütterungsversuch: Rosenblüten gegen Rosenblätter: Dargestellt sind die Mittelwerte aus vier oder mehr Durchläufen pro Versuchstag. Die Wasserkontrolle entspricht jeweils 100%

### 3.2.2 Glukose

Die vorangegangenen Versuche zeigen, dass die Rosenblüten wie in den Versuchen der letzten Arbeit von den Ameisen klar präferiert wurden. Als mögliche Ursache dafür wurde der Glukosegehalt in den Blütenblättern vermutet. Dies wurde in insgesamt 17 Versuchsreihen mit fünf unterschiedlichen Glukosekonzentrationen untersucht. Den Ameisen wurden in diesem Versuch abwechselnd mit Glukose bzw. Wasser präparierte Liguster-Blattscheiben auf einer Futter-Plattform angeboten. Für jeweils 10 min wurde gezählt, wie viele Blattscheiben von der Plattform transportiert wurden. Die Mittelwerte aus verschiedenen Versuchsreihen wurden verglichen, indem jeweils die Zahl der wasserpräparierten Blattscheiben gleich 100% gesetzt wurde. In Abbildung 7 wurden die Ergebnisse aller Versuche in Prozent dargestellt.

Bei einer Glukose-Konzentration in den Blattscheiben von 4% und 7,9% ist deutlich zu sehen, dass etwa 30% mehr Blattscheiben von den Ameisen abtransportiert werden als bei der Wasserkontrolle, bei 12% Zucker immerhin noch etwa 15%. Hingegen ist bei 2% Zuckergehalt nicht deutlich sichtbar, dass die Glukose-präparierten Blattscheiben bevorzugt werden. Im Vergleich mit einer Glukose-Konzentration von 15,8% werden die wasserpräparierten Blattscheiben bevorzugt. Die Ameisen können also den Zuckergehalt der Blattscheiben wahrnehmen und transportieren Blätter mit einer Zuckerkonzentration zwischen mindestens 4 und 10% stärker ab.

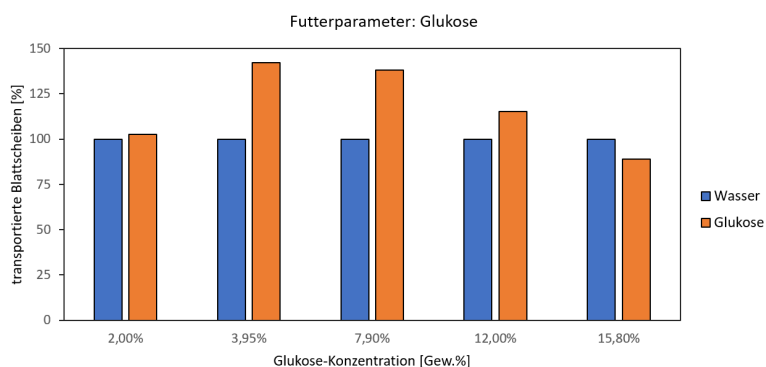


Abbildung 7: Fütterung der Ameisen mit Glukose-präparierten Liguster-Blattscheiben. Dargestellt sind die Durchschnittswerte aus zwei bis drei unabhängigen Versuchen mit vier oder mehr Durchläufen pro Versuchstag. Die Wasserkontrolle entspricht jeweils 100%

### 3.2.3 Rosenwasser

Eine weitere Vermutung für die mögliche Ursache der Präferenz der Ameisen für die Rosenblüten war der starke Geruch oder die übrigen in Wasser löslichen Bestandteile der Blüten. So wurde in den folgenden sechs Versuchsreihen mit drei Konzentrationen eine Vorliebe für Rosenwasser überprüft (Abbildung 8). Bei einer Konzentration von 100% wurde das Rosenwasser kaum bevorzugt. Auch bei einer Rosenwasser-Wasser Lösung von 50% ist der Unterschied zwischen den Mengen an abtransportierten Wasser- und Rosenwasser-Blattscheiben zu gering um eine deutliche Aussage zu formulieren. Das gleiche gilt auch für 25%. Eine Vorliebe für das Rosenwasser ist somit nicht klar nachweisbar.

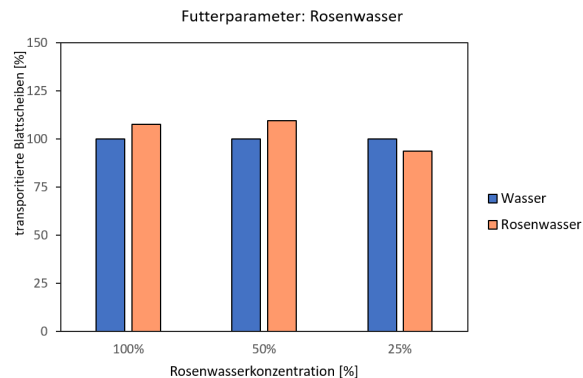


Abbildung 8: Fütterung der Ameisen mit Rosenwasser-präparierten Liguster-Blattscheiben. Dargestellt sind die Durchschnittswerte aus zwei unabhängigen Versuchen mit mind. drei Durchläufen. Die Wasser Kontrolle entspricht jeweils 100%

### 3.2.4 Stärke und Lipide

In der ersten Arbeit mit der Ameisenkolonie aus dem Naturhistorischen Museum Basel konnten wir beobachten, dass die Ameisen (*Atta cephalotes*) stärkehaltige Haferflocken im Beobachtungszeitraum kaum abtransportierten und in den Pilz eintrugen. Um zu untersuchen, ob tatsächlich die Stärke als Grund für diese Abneigung zu nennen ist, wurden zwei weitere Versuchsreihen durchgeführt. Die Ergebnisse in Abbildung 9a zeigen, dass die mit Stärke-Lösung präparierten Blattscheiben deutlich seltener von der Plattform geholt werden als die Kontrollscheiben mit Wasser. Eine Präferenz für Stärke ist auch in diesem Versuchsansatz nicht sichtbar.

Das in den Rosenblüten enthaltene Öl wurde auch als ein möglicher Grund für die Präferenz der Ameisen für die Rosenblüten angenommen. In zwei Versuchsreihen wurde dies mit einer Pflanzenöl-Emulsion überprüft. In Abbildung 9b kann man sehen, dass die Ameisen eine klare Abneigung gegen die Öl-präparierten Liguster-Blattscheiben haben. So bleiben die Scheiben mit Öl liegen und wurden teilweise gar nicht abtransportiert. Es ist also eine eindeutige Abneigung gegenüber dem Öl feststellbar.

## 3.3 Pilz

### 3.3.1 Kultivierung des Pilzes

Der aus der Pilzkammer entnommene Pilz wurde auf einem Malzextrakt-Medium kultiviert. Um nachzuweisen, dass der auf den Platten gewachsene Pilz auch der *Leucoagaricus gongylophorus*

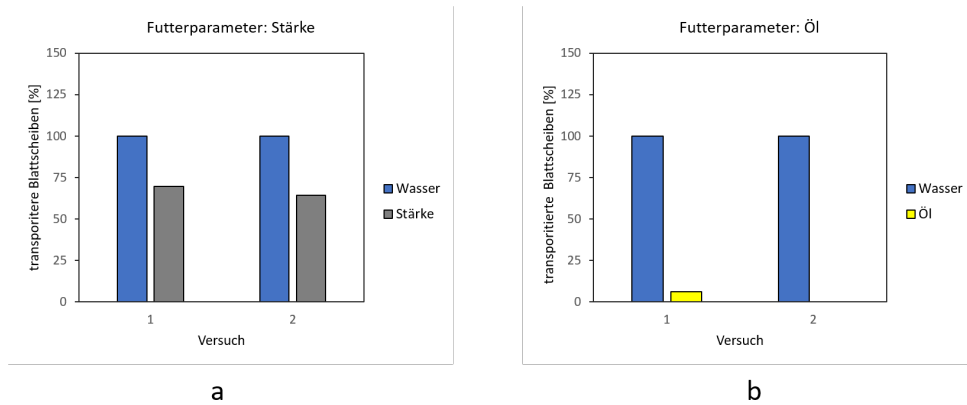


Abbildung 9: Fütterung der Ameisen mit (a) Stärke- und (b) Öl-präparierten Liguster-Blattscheiben. Dargestellt sind die Durchschnittswerte aus zwei Versuchen mit mind. drei Durchläufen. Die Wasserkontrolle entspricht jeweils 100%

von der Ameisenkolonie ist, wurde er mit einem Lichtmikroskop angeschaut. In Abbildung 10d sieht man, dass der kultivierte Pilz die gleichen - für den *Leucoagaricus* charakteristischen - apikalen Strukturen, nämlich kugelförmig verdickte Hyphenenden (Gongylidia) aufweist, wie der ursprüngliche Pilz (Abb. 10b). Auch der leichte Geruch nach Champignons, der für den *Leucoagaricus gongylophorus* typisch ist, weil er mit Champignons verwandt ist, konnte stets festgestellt werden (Geruch nach 1-Octen-3-ol). Sowohl die mikroskopischen Bilder als auch der Geruch des subkultivierten Pilzes sprechen also eindeutig dafür, dass der richtige Pilz - *Leucoagaricus gongylophorus* - kultiviert wurde.

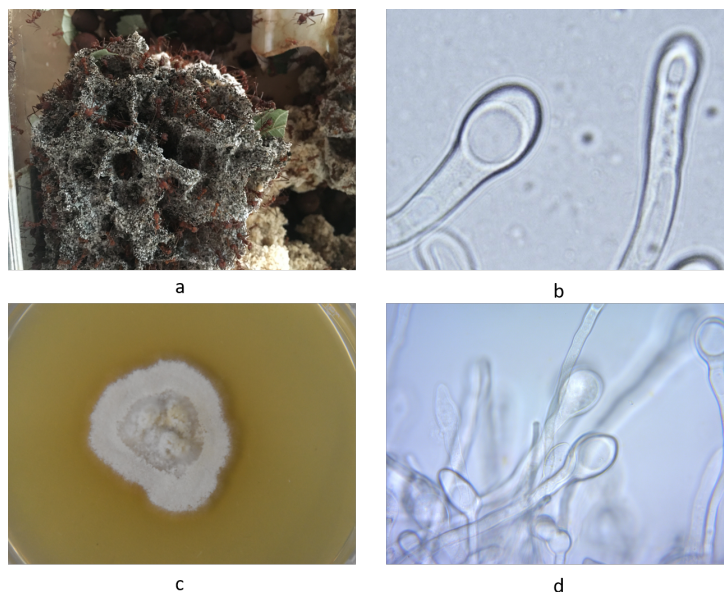


Abbildung 10: Charakterisierung des Pilzes *Leucoagaricus gongylophorus*. a: Pilz der Ameisenkolonie, b: Lichtmikroskop. Aufnahme der Hyphen mit Gongylidien, c: auf Malzextraktmedium subkultivierter Pilz, d: Lichtmikroskop. Aufnahme der Hyphen mit Gongylidien

### 3.3.2 Genetische Charakterisierung

Der genetische Nachweis für den Ameisenpilz basiert auf den DNA-Sequenzen für die Gene der ribosomalen RNAs, also den DNA-Abschnitten, die für die ribosomalen RNAs codieren. Diese werden wiederum in die Ribosomen eingebaut. Jede rDNA-Einheit besteht aus drei Genen für die drei ribosomalen RNAs, diese sind jeweils durch spacer (ITS, Internal transcribed spacer) getrennt. Die rRNAs werden mit 18S, 5, 8S- und 28S bezeichnet (das bezieht sich auf ihre Grösse). Die ITS-Sequenzen sind die Sequenzen, die beim Prozessieren („Reifen“) der RNAs herausgeschnitten werden. Weil aber die Spacer-Sequenzen für die Funktion der ribosomalen RNAs bzw. der Ribosomen nicht wichtig sind, sind hier mehr Mutationen zu finden als in den Sequenzen für die rRNAs selbst. In diesen ITS-Bereichen sind deswegen auch eher Unterschiede zwischen verschiedenen Pilzen zu erwarten. Deshalb sind diese ITS-Bereiche für den genetischen Nachweis einer Pilzart gut geeignet.

Für den Nachweis verschiedener Pilzarten durch PCR der ITS-Sequenzen im allgemeinen und den Nachweis von *Leucoagaricus* im Besonderen gibt es mehrere charakterisierte Primerpaare (White et al, 1990, Silva-Pinhati et al, 2004, Bich et al, 2017 und Espinoza et al, 2017). Wir haben die Primer ITS-1 (forward) und ITS-4 (reverse) verwendet.

Für diese Analyse wurde DNA sowohl aus dem Pilz der Ameisenkolonie als auch dem von uns kultivierten Pilz sowie aus Bäckerhefe isoliert und anschliessend die ITS-Sequenzen mit PCR (Polymerase chain reaction) spezifisch amplifiziert. Im zweiten Schritt wurden die erhaltenen PCR-Produkte mit den Restriktionsenzymen EcoRI und NspI geschnitten. Diese Schnittstellen erfassen die Sequenzunterschiede zwischen *Leucoagaricus gongylophorus* und anderen Pilzen (hier Bäckerhefe) und können uns daher als schneller Nachweis anstelle einer DNA-Sequenzierung der PCR-Produkte dienen. In Abbildung 11 ist die Strategie der genetischen Charakterisierung des Pilzes dargestellt.

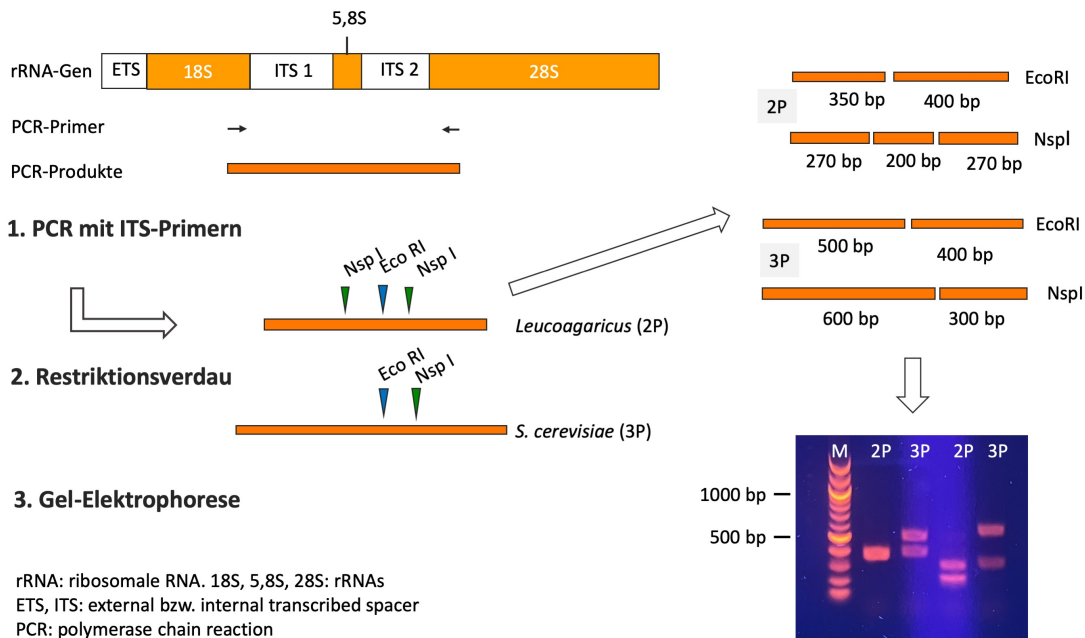


Abbildung 11: Strategie für die genet. Charakterisierung Pilzes der Kolonie und des kultivierten Pilzes

In Abbildung 12 sind die Ergebnisse der Gelelektrophorese dargestellt. In Abbildung 12a als Beispiel für die PCR aus vielen DNA-Proben sind Banden bei etwa 750 bp bzw. 850 bp in den Spuren 1P und 2P bzw. 3P zu sehen, diese entsprechen dem Originalpilz (1P) und dem kultivierten Pilz (2P) sowie der Bäckerhefe (3P). Mit beiden Methoden ließ sich DNA extrahieren. Die PCR-Produkte liegen in der nach Sequenzdaten (White et al, 1990) erwarteten Grössenordnung. Das Schnittmuster der Proben 2P (kultivierter Pilz) und 3P (Hefe) mit EcoRI und NspI (Abbildung 12) zeigen ebenfalls DNA-Fragmente in der erwarteten Grössenordnung. Die Probe 2P (kultivierter Pilz) wird durch EcoRI in zwei Fragmente mit etwa 400 und 350 bp geschnitten, die auf dem Gel als eine unscharfe Bande zu erkennen sind. Für Nsp I werden in diesem PCR-Produkt zwei Schnittstellen erwartet, zu sehen sind zwei Banden in der erwarteten Größe von etwa 200 und 270 bp (dahinter verstecken sich zwei Fragmente). Die Probe 3P (Hefe) wird durch Eco RI in zwei Fragmente von etwa 400 und etwa 500 bp geschnitten, durch NspI in zwei Fragmente mit etwa 600 bzw. 300 bp Länge. Die Schnittmuster sind also deutlich verschieden und entsprechen im Gelbild den nach Sequenzanalyse erwarteten Banden. Dies zeigt, dass *Leucoagaricus gongylophorus* auf den Platten kultiviert wurde. Dieser Versuch konnte aufgrund der Corona-Ausgangsbeschränkungen während der Weihnachtsferien nicht mehr wiederholt und mit weiteren Proben durchgeführt und abgesichert werden.

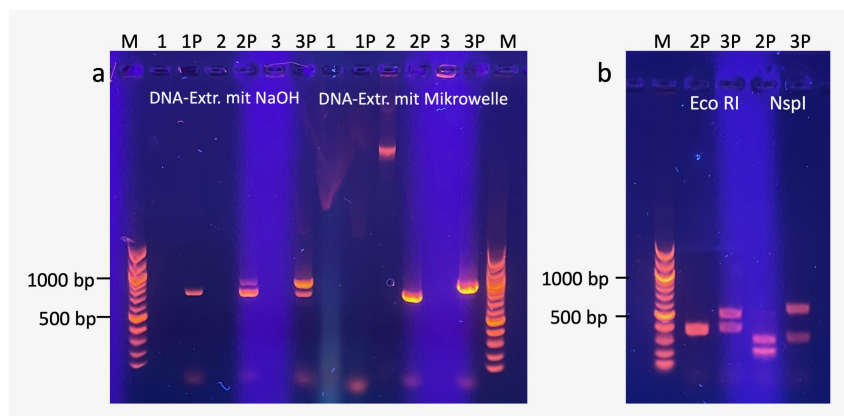


Abbildung 12: Genet. Charakterisierung des Pilzes *Leucoagaricus gongylophorus*. a: PCR: 1 Pilz aus der Kolonie, 2 kultivierter Pilz, 3 Hefe; 1P, 2P, 3P das jeweilige PCR Produkt. M 100pb DNA-Leiter, b: Restriktionsverdau

### 3.4 Wachstumsversuche

Die Frage, ob sich die Ameisen beim Abtransportieren des Futters nach ihrem eigenem Geschmack richten oder Rücksicht auf den Pilz nehmen, wurde als nächstes untersucht. So wurde überprüft, ob der Pilz eine bestimmte Kohlenhydratquelle bevorzugt. Hierfür wurde er auf Medien, die unterschiedliche Kohlenhydrate beinhalten, kultiviert. In Abbildung 13a sieht man die Ergebnisse der ersten Versuchsreihe, die denen der zweiten sehr ähneln (Abbildung 13b). Hierbei erkennt man, dass schon nach kurzer Zeit die Glukose- und Malzextrakt-Medien ein deutlich schnelleres Wachstum aufweisen, wobei der Pilz auf Glukose im späteren Verlauf kurzzeitig eine geringere Wachstumsgeschwindigkeit hat. Die Stärke-, Lipid- und Cellulose-Medien wurden dagegen langsamer bewachsen. Auf Cellulose wuchs der *Leucoagaricus gongylophorus* am langsamsten.

Auf schnell zugänglichen Kohlehydraten wächst der *Leucoagaricus gongylophorus* also besonders gut. Das Wachstum auf den Stärke-Medien hat ein mittleres Tempo. Auf Cellulose oder Öl ist

das Wachstum jedoch sehr langsam.

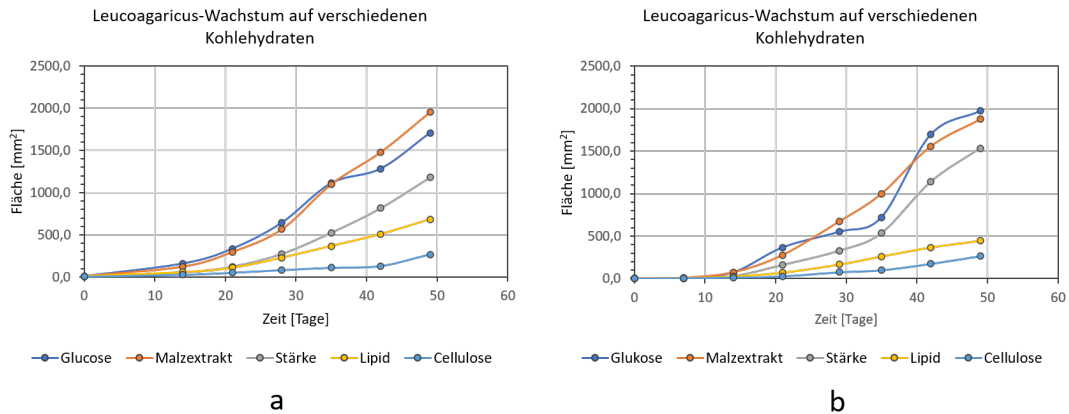


Abbildung 13: Wachstumsversuche in vitro auf verschiedenen Kohlehydraten. Dargestellt ist die durchschnittliche Fläche des *Leucoagaricus gongylophorus* auf den jeweiligen Kohlenhydrat-Platten. a: Erste Versuchsreihe b: Zweite Versuchsreihe

## 4 Diskussion

Um an die Ergebnisse unserer ersten Arbeit im Naturhistorischen Museum Basel anzuschließen, haben wir zunächst eine Versuchsserie mit Rosenblüten und Rosenblättern durchgeführt, um zu überprüfen, ob sich die bei *Atta cephalotes* beobachtete Präferenz für Rosenblütenblätter auch bei der Art *Atta colombica* nachweisen lässt. Dabei wurden den Ameisen Rosenblüten und Rosenlaubblätter zeitgleich auf zwei Futterplattformen zur Auswahl angeboten, in einem Fall auch auf einer Plattform gleichzeitig. Diese Versuche zeigen, dass auch die neue Kolonie (*Atta colombica*) eine Vorliebe für Rosenblütenblätter hat. Weil wir aus Würzburg nur eine Fütterungsplattform erhalten hatten, nutzten wir eine zweite ähnliche, jedoch aus Legesteinen gebaute Plattform. Diese wurde von den Ameisen schlechter angenommen, vermutlich weil sie vor allem zu Beginn der Versuche noch keine Pheromonspuren trug. Um dies auszugleichen, wurde das auf den Platten präsentierte Futter durchweg abgewechselt. Weitere Versuche könnten zur statistischen Absicherung beitragen.

Im Folgenden testeten wir mit einem neuen Ansatz verschiedene Inhaltsstoffe der Rosenblütenblätter auf ihre Wirkung auf die Ameisen. Dazu wurden Ligusterblattscheiben mit verschiedenen Lösungen (Glukose, Rosenwasser, Stärke, Lipide) präpariert und den Ameisen zeitlich abwechselnd mit wasserpräparierten Ligusterblattscheiben angeboten. Während Rosenwasser, Stärke und Lipide in den Ligusterblattscheiben keine stärkere Wirkung als die Kontrollscheiben mit Wasser auf das Transportverhalten der Ameisen hatten (mit Öl getränkte Blattscheiben wurden sogar deutlich abgelehnt), konnten wir für Glukose eine positive Wirkung beobachten. Es lässt sich zusammenfassend sagen, dass die Ameisen eine Glukoselösung mit einer Konzentration zwischen 4% und 8% gegenüber allen anderen getesteten Glukosekonzentrationen klar bevorzugen (siehe Abbildung 7). Es wären jedoch weitere Versuche nötig, um die optimale Glukose-Konzentration noch genauer eingrenzen zu können. Unsere Vermutung aus der ersten Arbeit für die Ursache der Präferenz der Ameisen für Rosenblüten ist damit bestätigt. Tatsächlich ist in unseren Versuchen die Glukose der ausschlaggebende Faktor, nach dem die Ameisen das Futter wählen, welches sie zur Kolonie und zum Pilz transportieren wollen. Die Ameisen müssen die Glukosekonzentration



der Nahrung also genau wahrnehmen können, da das Transportverhalten sogar einer Optimumskurve für die Glukosekonzentration folgt (Abbildung 7).

Unterstützt wird dieses Ergebnis auch durch eine Studie (Meyer et al, 2006) zur Futterpräferenz der Ameisenart *Atta colombica*, in der eine Vorliebe für Blätter mit Trockenstress beobachtet wurde, die in der Studie auch auf den erhöhten Zuckergehalt zurückgeführt wurde.

Unsere Vermutung, es würde in der Kolonie mit zunehmender Zeit keinen Nachwuchs mehr geben, lässt sich bestätigen. Tatsächlich nahm die Anzahl an Ameisen in der Kolonie nach und nach ab und auch die Mandibeln der Ameisen waren häufig abgenutzt, was auf ein hohes Alter dieser Tiere schließen lässt (Abb. 5). Dass abgenutzte Mundwerkzeuge bei Blattschneiderameisen ein Anzeichen für das Alter der jeweiligen Tiere sind, wurde bereits von Schofield et al, 2011 erforscht.

Entgegen dem Rat der Ameisenexperten aus Basel und Würzburg haben wir versucht, den Pilz der Kolonie zu kultivieren, weil wir nur mit dem Pilz den zweiten Teil unserer Fragestellung angehen konnten. Das Ergebnis: wir schafften es, den *Leucoagaricus gongylophorus* auf verschiedenen Medien außerhalb der Kolonie zu subkultivieren. Der Nachweis für den Erfolg wurde einerseits lichtmikroskopisch durchgeführt. Sowohl der Pilz der Kolonie als auch der subkultivierte Pilz weisen die typischen Strukturen für den *Leucoagaricus gongylophorus*, die Gongylidien (kugelförmig verdickte Enden der Hyphen) auf, wie auch von Miyashira et al (2010) und Espinoza et al (2017) beschrieben. Auch auf den Agarplatten hatte der Pilz noch einen champignonähnlichen Geruch. Andererseits konnten wir auch mit einem genetischen Nachweis zeigen, dass der Pilz der Kolonie und der Pilz, den wir subkultiviert haben, mit großer Wahrscheinlichkeit identisch sind. Pilze verschiedener Arten können mit Hilfe der ITS-Sequenzen durch PCR und anschließende Sequenzierung phylogenetisch charakterisiert werden. Diese Methode wurde auch schon zur Charakterisierung von *Leucoagaricus gongylophorus* herangezogen (Silva-Pinhati et al, 2004, Bich et al, 2017, Espinoza et al, 2017). Anstatt unsere Proben sequenzieren zu lassen, wurde ein Test mit Hilfe zweier Restriktionsenzyme (Eco RI und NspI) entwickelt, mit denen die PCR-Produkte von *Leucoagaricus*-Proben einerseits und Bäckerhefe als nicht direkt verwandtem Pilz andererseits unterschieden werden konnten. Das ist kein eindeutiger Nachweis, aber ein guter Hinweis darauf, dass der richtige Pilz kultiviert wurde.

Mit dem subkultivierten Pilz konnte dann im nächsten Schritt untersucht werden, ob der Pilz auf verschiedenen Kohlenhydraten bzw. Substraten wächst bzw. unterschiedlich schnell wächst. Mit diesem Ansatz sollte die Frage beantwortet werden, ob die Ameisen instinktiv „wissen“, was sie dem Pilz bringen müssen, damit er besonders gut wächst. Das Ergebnis dieser Versuche ist eindeutig: Auf den Medien mit Malzextrakt bzw. Glukose wächst der Pilz deutlich schneller als auf Stärke, Cellulose oder Öl. Dieses Ergebnis deckt sich somit mit der nachgewiesenen Vorliebe der Ameisen für Glukose beim Blättchentransport. Die Vermutung liegt daher nahe, dass die Ameisen tatsächlich „schlaue Gärtner“ sind und die Bedürfnisse des Pilzes bei der Nahrungsbeschaffung berücksichtigen. Mit Sicherheit lässt dies jedoch nicht bestätigen. Denn die Möglichkeit besteht, dass der Pilz auf einfachen Kohlenhydraten wie Glukose oder Maltose (Malzextrakt) einfach schneller wachsen kann, weil die Energie schneller zur Verfügung steht und nicht erst Enzyme zum Abbau längerer Kohlenhydrate produziert werden müssen. In der Natur wird im Pilzgarten vor allem cellulosehaltige Nahrung – Blätter - abgebaut. Dies entspricht sicher auch dem biologischen Sinn der Symbiose – den Ameisen Nahrungsquellen zur Verfügung zu stellen, auf die sie alleine keinen Zugriff hätten. Es ist bekannt, dass *Leucoagaricus gongylophorus* Cellulasen produziert (Aylward et al, 2013), vielleicht ist die mikrokristalline Cellulose, die wir im Wachstumsversuch verwendet haben, nicht zugänglich für den Pilz.

In weiterführenden Versuchen könnte man das Transportverhalten der Ameisen bei Ligusterblättchen untersuchen, die mit einer Malzextraktlösung präpariert wurden. Sollte hier auch eine

Präferenz beobachtet werden können, liegt die Vermutung, dass die Ameisen den Pilz berücksichtigen noch näher. Ist das nicht der Fall, kann davon ausgegangen werden, dass die Ameisen die Blütenblätter bevorzugt abtransportieren, weil sie selbst den Zucker der Blätter „mögen“ und nicht, weil sie instinktiv „wissen“, dass der von ihnen kultivierte Pilz auf diesem Substrat besonders gut wächst.

Wir haben uns in unserer Arbeit auf die Frage konzentriert, warum die Ameisen der Kolonien in Basel und der aus Würzburg bevorzugt Rosenblütenblätter in den Pilz transportieren. Anhand unserer Ergebnisse ist diese Präferenz klar auf die in den Blüten enthaltene Glukose zurückzuführen. Diese Beobachtung korreliert gut damit, dass der *Leucoagaricus gongylophorus* derselben Kolonie *in vitro* besonders gut auf einem glukosehaltigen Medium wächst.

## 5 Danksagung

Für außerordentliche Hilfe beim Erarbeiten des Projektes möchten wir uns gerne bedanken bei:  
- dem phaenovum Schülerforschungszentrum Lörrach für das grundsätzliche Ermöglichen unseres Projekts, sowie für das Bereitstellen des Labors und der damit verbundenen Laborgeräte und Chemikalien, als auch für dessen generelle finanzielle Unterstützung.

- den MitarbeiterInnen des phaenovums, besonders bei Frau Christiane Talke-Messerer und Frau Ulla Plappert für das Betreuen unseres Projekts.

- den stets hilfsbereiten Experten der Universität Würzburg (Institut für Zoologie II, Biozentrum): Herrn Flavio Roces, der das Projekt durch das Bereitstellen der Versuchskolonie ermöglichte; Herrn Oliver Geissler, der uns bereits während des ersten Projektes mit seinem Fachwissen zur Seite stand und uns über den genauen Umgang mit der Kolonie in Kenntnis setzte; und Frau Daniela Römer, die uns ebenfalls über den Umgang mit der Kolonie unterrichtete.

- Herrn Thilo Glatzel (Departement Physik Universität Basel), Frau Monica Schönenberger und Frau Susanne Erpel vom Nano Imaging Lab der Universität Basel für das Erstellen der aufwändigen REM-Bilder unter Ausgangsbeschränkungen.

- der Firma biomers.net (Reutlingen) dafür, dass uns die forward- und reverse-primer für die genetische Analyse ohne Rechnung zur Verfügung gestellt wurden.

## 6 Literatur

Arenas, A., Roces, F. (2017). Avoidance of plants unsuitable for the symbiotic fungus in leaf-cutting ants: Learning can take place entirely at the colony dump. PLOS ONE 12(3): e0171388. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171388>

Aylward, F.O., Burnum-Johnson, K.E., Tringe, S.G., Teiling, C., Tremmel, D.M., Moeller, J.A., Scott, J.J., Barry, KW, Piehowski, PD, Nicora, CD, Malfatti, SA, Monroe, ME, Purvine, SO, Goodwin, LA, Smith, RD, Weinstock, GM, Gerardo, NM, Suen, G, Lipton, MS, Currie, C.R. (2013). *Leucoagaricus gongylophorus* produces diverse enzymes for the degradation of recalcitrant plant polymers in leaf-cutter ant fungus gardens. Appl Environ Microbiol. 79, 3770-3778.

Bich, G.A., Castrillo, M.L., Villalba, L.L., Zapata, P.D. (2017). Isolation of the symbiotic fungus of *Acromyrmex pubescens* and phylogeny of *Leucoagaricus gongylophorus* from leaf-cutting ants, Saudi J of Biolog Sciences vol 24, 851-856

Espinoza, C., Izquierdo, I.Z., Couttolenc, A., Landa-Cadena, G., Valenzuela, J. Trigos, A. (2017). In vitro isolation and identification of *Leucoagaricus gongylophorus* from *Atta mexicana*

(Hymenoptera: Formicidae) fungal gardens. *Rev. Mex. Mic* vol.46  
(<http://www.scielo.org.mx/pdf/rmm/v46/0187-3180-rmm-46-3.pdf>)

Hölldobler, B. (2010). Der Superorganismus der Blattschneiderameisen. *Jahrbuch der Akademie der Wissenschaften zu Göttingen* 2010, S.99-112, 2011

Izumitsu, K., Hatoh, K., Sumita, T., Kitade, Y., Morita, A., Tanaka, C., Gafur, A., Ohta, A., Kawai, M., Yamanaka, T., Neda, H., Ota, Y. (2012). Rapid and simple preparation of mushroom DNA directly from colonies and fruiting bodies for PCR. *Mycoscience* vol 53, 396-401

Meyer, S.T., Roces, F., Wirth, R. (2006). Selecting the drought stressed: effects of plant stress on intraspecific and within-plant herbivory patterns of the leaf-cutting ant *Atta colombica*. *Functional Ecology* 2006, 973-981

Miyashira, C. H., Tanigushi, D. G., Gugliotta, A. M., and Santos, D. Y. (2010). Comparison of radial growth rate of the mutualistic fungus of *Atta sexdens rubropilosa* forel in two culture media. *Brazilian Journal of Microbiology* 41(2), 506–511

Osmundson, T.W., Eyre, C.A., Hayden, K.M., Dhillon, J., Garbelotto, M.M. (2012). Back to basics: an evaluation of NaOH and alternative rapid DNA extraction protocols for DNA barcoding, genotyping, and disease diagnostics from fungal and oomycete samples. *Mol Ecol Res* vol 13, 66-74

Robert M. S. Schofield, Kristen D. Emmett, Jack C. Niedbala, Michael H. Nesson (2011), Leaf-cutter ants with worn mandibles cut half as fast, spend twice the energy, and tend to carry instead of cut. *Behav Ecol Sociobiol* 65:969–982

Roces, F. (2014). Unterirdische Landwirtschaft bei Blattschneiderameisen. In: *Soziale Insekten in einer sich wandelnden Welt. Rundgespräche Forum Ökologie* 43 (Rundgespräch am 14. März 2014 in München), November 2014

Silva-Pinhati, A.C.O., Bacci Jr., M., Hinkle, G. Sogin, M.L., Pagnocca, F.C., Martins, V.G., Bueno, O.C., Hebling, M.J.A. (2004). Low variation in ribosomal DNA and internal transcribed spacers of the symbiotic fungi of leaf-cutting ants (Attini: Formicidae). *Braz J Med Biol Res* vol 37, 1463-1472.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990). Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press 1990