

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO Mestre em Ciências Biológicas  
(Biologia Celular e Molecular)**

---

**EFEITO DA SIMBIOSE COM FUNGOS SOBRE GENES DO METABOLISMO DE AMIDO  
E DE ALGUNS AMINOÁCIDOS NA FORMIGA *Mycocepurus goeldii***

**DAYANE PIRES DA SILVA**

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

**Agosto - 2016**

DAYANE PIRES DA SILVA

EFEITO DA SIMBIOSE COM FUNGOS SOBRE GENES DO METABOLISMO  
DE AMIDO E DE ALGUNS AMINOÁCIDOS NA FORMIGA *Mycocepurus goeldii*

Orientador: Prof. Dr. Maurício Bacci Junior

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

595.796 Silva, Dayane Pires da  
S586e Efeito da simbiose com fungos sobre genes do  
metabolismo de amido e de alguns aminoácidos na formiga  
*Mycocepurus goeldii* / Dayane Pires da Silva. - Rio Claro,  
2016  
34 f. : il., gráfs., tabs., fots.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Biociências de Rio Claro  
Orientador: Maurício Bacci Junior

1. Formiga. 2. Tribo Attini. 3. Sequenciamento de nova  
geração. 4. Transcriptoma. 5. Anotação. 6. Vias metabólicas.  
I. Título.

OFÍCIO DE SOLICITAÇÃO

Rio Claro, 23 de fevereiro de 2017

Eu Dayane Pires da Silva solicito que seja feita uma errata na minha página de agradecimentos na dissertação de mestrado.

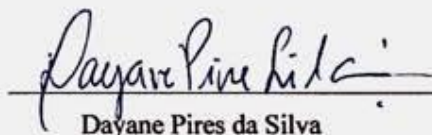
**Peço por favor, que seja retirado este parágrafo:**

“Sou grata também a CAPES e posteriormente a FAPESP pelo financiamento da minha pesquisa, por terem me concedido uma bolsa de pesquisa durante esses dois anos.”

**E seja substituído por esse:**

Sou grata também a CAPES e posteriormente a FAPESP (nº do processo 2014/15939-3) pelo financiamento do meu projeto, por terem me concedido o auxílio de bolsa de pesquisa durante esses dois anos.

Segue em anexo a versão corrigida da página de agradecimentos.

  
Dayane Pires da Silva

UNESP-IP-RIO CLARO 23-Fev-2017-15:04-001423-1/1

SEÇÃO TÉCNICA DE COMUNICAÇÕES

de acordo,

  
Dr Diogo Cavalcanti Cabral de Mello  
Coordenador

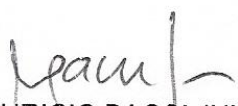
**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS E AMINOÁCIDOS NA FORMIGA *Mycocephurus goeldii*

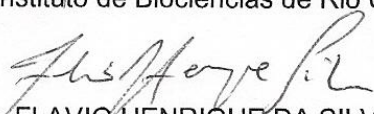
**AUTORA: DAYANE PIRES DA SILVA**

**ORIENTADOR: MAURICIO BACCI JUNIOR**

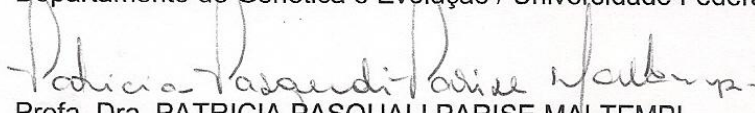
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. MAURICIO BACCI JUNIOR  
CEIS / Instituto de Biociências de Rio Claro - SP



Prof. Dr. FLAVIO HENRIQUE DA SILVA  
Departamento de Genética e Evolução / Universidade Federal de São Carlos - UFSCAR



Profa. Dra. PATRICIA PASQUALI PARISE MALTEMPI  
Departamento de Biologia / IB-Rio Claro

Rio Claro, 04 de agosto de 2016

Título alterado para: "Efeito da simbiose com fungos sobre genes do metabolismo de amido e de alguns aminoácidos na formiga *Mycocephurus goeldii*"

Dedico este trabalho ao meu avô, Ormino José da Silva, que é meu exemplo de superação. Ao Mateus, que foi o maior incentivador pra que eu chegasse até o fim deste trabalho e também que sempre acreditou na minha capacidade. Aos meus pais por me darem todo apoio e suporte em tudo na minha vida. A minha irmã que por toda companhia e atenção dedicadas a mim.

E a todos eles juntos por todo amor que me envolve em tudo que eu faço.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente gostaria de agradecer todo o apoio que recebi da minha família para dar continuidade à vida acadêmica após o encerramento da graduação. Agradeço também ao meu namorado Mateus, por ter me incentivado a me inscrever no processo de seleção de mestrado.

Agradeço também ao professor Maurício Bacci Junior por ter aceitado me orientar e desta forma pude dar início ao meu projeto de mestrado, além do que agradeço a ele por todo o suporte e ensinamento dado ao longo desses dois anos.

Também sou muito grata aos meus companheiros de pesquisa, Milene Ferro e Sérgio Kakazu que dividiram comigo seus conhecimentos e também por toda a colaboração que eles me deram para finalizar a minha pesquisa.

Sou grata também a CAPES e posteriormente a FAPESP (2014/15939-3) pelo financiamento da minha pesquisa, por terem me concedido uma bolsa de pesquisa durante esses dois anos.

E por fim, agradeço a todos que de certa forma contribuíram para minha formação e que me permitiram concluir mais uma etapa importante da minha vida.

## RESUMO

Relações de simbiose com micro-organismos são descritas como uma forma de inovação evolutiva que permite a alguns animais acesso aos nutrientes que de outra forma não estariam disponíveis. As formigas da tribo Attini são conhecidas pelo hábito de cultivar fungos que lhes fornecem nutrientes. Parte destes nutrientes são obtidos quando o fungo fornece enzimas que são instáveis ou mesmo ausentes nas formigas. No presente trabalho nós mostramos que as formigas Attini apresentam amilases submetidas a uma baixa pressão seletiva e grande quantidade de substituições de aminoácidos potencialmente deletérias. Esses dados reforçam a hipótese de que a função da amilase das formigas foi substituída pela amilase fúngica. Nós também demonstramos que, tal como ocorre com as Attini derivadas, a Attini basal *Mycocepurus goeldii* é deficiente em duas enzimas da via de síntese de arginina, a argininossuccinato liase e a argininossuccinato sintase. Esses dados indicam que a complementação pelo fungo de deficiências enzimáticas das formigas é um evento ancestral na história evolutiva das Attini.



## ABSTRACT

Symbiotic relationships with microorganisms are described as a form of evolutionary innovation that allows some animals access to nutrients which otherwise would not be available. The Attine ants are known for the habit of cultivating fungi which provide them with nutrients. Some of these nutrients are obtained when the fungus provides enzymes that are unstable or even absent in ants. In this work we show that the Attini ants presents amylases subjected a low selective pressure and a large amount of potentially harmful amino acid substitutions. These data corroborates the hypothesis that the function of amylase of ants was replaced by fungal amylase. We also demonstrate that, just as with derived Attine, in the basal Attine *Mycocepurus goeldii* two enzymes is deficient in arginine synthetic pathway, the argininosuccinate lyase and argininosuccinate synthase. These data indicate that supplementation of deficient enzymes in ants made by fungal is an ancient event in the evolutionary history of Attine.

## Sumário

INTRODUÇÃO.....	6
Formiga <i>Mycocephalus goeldii</i> .....	6
A Simbiose fungo-formiga .....	7
Pressão seletiva .....	7
Vias Metabólicas.....	9
OBJETIVOS.....	11
Objetivo geral.....	11
Objetivos específicos .....	11
MATERIAL E MÉTODOS.....	12
Coleta, extração e quantificação do RNA total.....	12
Construção da biblioteca transcriptômica e sequenciamento .....	12
Processamento dos dados e montagem <i>de novo</i> .....	12
Anotação funcional .....	13
Seleção de genes candidatos para análise de pressãoseletiva .....	13
Análise das vias metabólicas .....	14
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	15
Sequenciamento Illumina <i>paired-end</i> e montagem <i>de novo</i> .....	15
Anotação funcional .....	15
Seleção de genes candidatos para análise de pressãoseletiva .....	17
Análise das vias metabólicas de aminoácidos e carboidratos.....	25
CONCLUSÃO.....	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	30

## INTRODUÇÃO

### **Formiga *Mycocepurus goeldii***

As formigas apresentam grande sucesso ecológico, ocupam quase todos os habitats terrestres (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990) e apresentam 12.755 espécies descritas (BOLTON, 2013). Comportamento especializado, organização social e sucesso evolutivo as levam a ser um modelo de estudo em muitas áreas da Biologia (RABELING; BROWN; VERHAAGH, 2008).

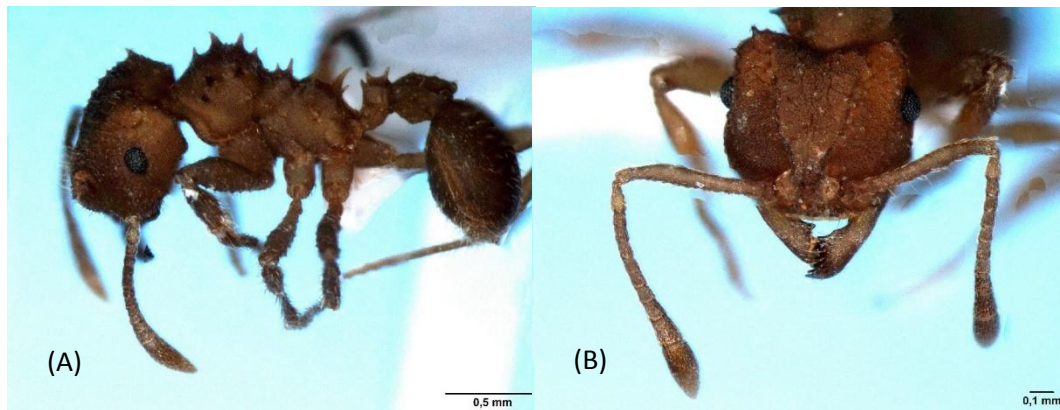
As formigas da tribo Attini (subfamília Myrmicinae, família Formicidae, ordem Hymenoptera) apresentam distribuição geográfica restrita ao continente americano com a maioria das espécies na região neotropical (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990). São conhecidas pelo hábito de cultivar fungos mutualistas em câmaras presentes nos ninhos, fungos que são fundamentais para sua alimentação (WEBER, 1972). Compreendem um grupo monofilético (SCHULTZ & MEIER, 1995) com mais de 230 espécies já descritas, todas dependentes obrigatórias do cultivo do fungo mutualista, comportamento que teve sua origem entre 45 a 65 milhões de anos atrás (WEBER, 1972; MUELLER *et al.*, 2001). Dentre essas formigas, faz parte o gênero *Mycocepurus*, que atualmente inclui cinco espécies válidas (KEMPF, 1963; MACKAY, 1998; FERNANDEZ, 2003), que foram até recentemente pouco estudadas, provavelmente devido à dificuldade de escavação dos ninhos (RABELING *et al.* 2007, 2009). Este gênero é facilmente caracterizado morfológicamente entre as formigas devido à presença de inúmeros espinhos na superfície corporal, além de ser o único gênero presente no Novo Mundo que possui uma coroa de espinhos na região do tórax, (MAYHÉ-NUNES & MENEGUETE, 2000; MACKAY *et al.*, 2004). Operárias de espécies do gênero apresentam de 4 a 5 mm de comprimento (PACHECO & BERTI, 1987).

A maioria dos estudos evolutivos feitos para tribo Attini está relacionada com gêneros que são mais derivados (MEHDIABADI & SCHULTZ, 2009) e, portanto, menos informativos para a elucidação dos fatos relacionados com os primeiros passos da evolução dentro do grupo (RABELING *et al.*, 2007).

*Mycocepurus goeldii* é uma espécie basal que pode ser encontrada desde o norte da Argentina até a Guiana (KEMPF 1963; MACKAY, 2004). Existe uma interação entre essa espécie com uma árvore da espécie *Hymenaea courbaril* L. (Fabaceae: Caesalpinioideae). Tem sido relatado que quando parte do fruto é removida por predação das formigas, diminui a contaminação por fungos nas sementes, aumentando assim a germinação (OLIVEIRA *et al.*, 1995). Outra contribuição de *M. goeldii*, é que elas são capazes de acumular nutrientes em

baixas camadas do solo, que podem ser utilizados por plantas, quando as formigas deixam as câmaras do ninho (RABELING *et al.*, 2007, 2009), pois estas espécies coleta detritos orgânicos oriundos da serapilheira (WEBER, 1972), que é formada majoritariamente por folhas, para nutrir seus cultivares fúngicos.

**Figura 1:** Operária da espécie *Mycocepurus goeldii* lateral (A) e cabeça (B).



### **A Simbiose fungo-formiga**

Relações de simbiose com micro-organismos são descritas como uma forma de inovação evolutiva que permite a alguns animais a ocupação de nichos ecológicos até então indisponíveis (ZILBER-ROSENBERG e ROSENBERG, 2008; DOUGLAS, 2010). A habilidade dos animais para ganhar acesso aos nutrientes da biomassa vegetal (fonte de energia abundante em ecossistemas terrestres) é facilitada pela simbiose com os micro-organismos (DOUGLAS, 2009).

As atíneas utilizam os jardins de fungos como fonte de nutrientes e enzimas (SIQUEIRA *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 2003; WEBER, 1972). Em associações mutualísticas entre insetos e fungos, ocorrem adaptações que facilitam a perpetuação desta associação e promovem relações de interdependência. Se os insetos se beneficiam pela aquisição de alimento (micofagia) e enzimas digestivas, os fungos recebem um ambiente adequado para o seu desenvolvimento, com recursos disponíveis, umidade e redução de competidores, além de deixarem sua propagação a cargo dos insetos (MARTIN, 1992).

### **Pressão seletiva**

A mutação dos genes é um dos fatores que contribuem para a evolução. Uma variante gênica originada por uma substituição nucleotídica, recombinação ou inserção/deleção, pode se propagar em uma população por deriva genética e/ou por seleção natural, podendo então ser fixado em uma espécie (SCHERER, 2002). A seleção natural atua na variação genética de

uma população existente, através da eliminação de mutações deletérias (seleção negativa) ou através da proliferação de mutações favoráveis (seleção positiva), maximizando assim a adaptabilidade da espécie (ORR, 2009).

Uma mutação na proteína ocorre quando há uma mutação na sequência de nucleotídeos, ocasionando a substituição de um códon por outro não sinônimo, isto é, quando o “novo” códon não codifica para o mesmo aminoácido que o códon preexistente. Esta mutação, denominada não sinônima, é alvo da seleção natural, por influenciar na estrutura da proteína, inclusive por vezes alterando drasticamente o seu funcionamento. Já as mutações sinônimas, que ocorrem quando as substituições nucleotídicas não causam alteração na sequência de aminoácidos da proteína codificada, são consideradas livres de pressão seletiva em nível proteico.

Como indicado acima, as mutações não sinônimas estão sujeitas a forte pressão seletiva, por exemplo, uma seleção negativa (seleção purificadora), agindo sobre as mutações deletérias, eliminando-as rapidamente. Mas podem também em alguns casos conferir um aumento na eficiência ou uma nova função à proteína, ou seja aumentando o valor adaptativo, resultado da ação da seleção positiva.

Forças seletivas operando em nível de sequências de aminoácidos têm sido detectadas por comparação da taxa de substituições nucleotídicas não sinônimas (dN) com a taxa de substituições sinônimas (dS) (HUGHES & NEI, 1988, 1989). A partir dessas taxas de substituições nucleotídicas, é possível inferir a qual processo de pressão seletiva uma sequência está sendo submetida, calculando-se a razão ômega ( $\omega = dN/dS$ ) (GOLDMAN & YANG, 1994). Quando o resultado for  $\omega > 1$ , indica seleção positiva,  $\omega < 1$  indica seleção purificadora e  $\omega = 1$  seleção neutra, ou seja, as substituições ocorridas não alteram a adaptabilidade.

O mutualismo entre as formigas da tribo Attini e fungos basidiomicetos é um assunto que tem sido há muito tempo investigado, tanto do ponto de vista evolutivo, quanto metabólico ou comportamental. Nestas formigas é proposto que a excreção de enzimas digestiva no material fecal é uma adaptação que evoluiu como resultado do cultivo de fungos (MISHRA, 1991).

O líquido fecal de saúvas, que são formigas Attini cortadeiras, contém quantidades apreciáveis de amilase (MARTIN *et al.*, 1973). A degradação do amido de material vegetal no interior do formigueiro é proposta como a principal via catabólica geradora de glicose, que por sua vez é uma fonte de carbono chave para a nutrição das formigas (SILVA *et al.*, 2003) e do fungo mutualista (Siqueira *et al.*, 1998).

Bacci e colaboradores (2013) realizaram um estudo com a formiga *Atta sexdens rubropilosa* e seu fungo mutualista, *Leucoagaricus gongylophorus*, com o objetivo de analisar as enzimas  $\alpha$ -amilase e maltase de ambos os organismos. Purificaram as enzimas  $\alpha$ -amilase e maltase presentes do conteúdo fecal de *A. sexdens rubropilosa* e compararam com as mesmas enzimas purificadas da cultura isolada de *Leucoagaricus gongylophorus*. Após esta análise, surgiu a hipótese de que o intestino das formigas operárias descartava a  $\alpha$ -amilase produzida pelas formigas e a maltase de origem fúngica. E mantinha a  $\alpha$ -amilase sintetizada pelo fungo e a maltase produzida pelas operárias.

Com o intuito testar esta hipótese, utilizou-se a metodologia do cálculo da razão ômega, para determinar sob qual tipo de pressão seletiva os genes das enzimas  $\alpha$ -amilase e maltase estavam sendo submetidos. As sequências dos genes codificadores destas enzimas foram obtidas a partir dos dados de cinco transcriptomas disponíveis em nosso laboratório: das formigas *A. sexdens rubropilosa* e *A. sexdens piriventris*, do fungo *Leucoagaricus gongylophorus*, mutualista das espécies de *Atta* e do fungo ainda não identificado que é mutualista de *M. goeldii*. Para completar esta análise, no presente trabalho nós sequenciamos o transcriptoma da formiga *Mycocepurus goeldii*.

Além das sequências dos quatro transcriptomas disponíveis das espécies Attini, utilizamos também as sequências da  $\alpha$ -amilase da maltase de *Acromyrmex echinatior* e *Atta cephalotes*, que foram obtidas na base de dados do GenBank.

### **Vias metabólicas**

Não há attíneas conhecidas que vivam sem o fungo mutualista, assim como, ao menos para a maioria das formigas cortadeiras (gêneros *Atta* e *Acromyrmex*), não se comprovaram formas do fungo mutualista que tenham assumido vida livre, independente das formigas.

As bases bioquímicas para o mutualismo obrigatório foram inicialmente estabelecidas sobre o metabolismo de polissacarídeos vegetais, que não são diretamente ingeridos pelas formigas, mas necessitam de degradação prévia pelas enzimas secretadas pelo fungo mutualista (DE SIQUEIRA et al., 1998; SILVA et al., 2003). Recentemente houve evidências que demonstraram que a degradação de amido vegetal é feita com amilases fúngicas e maltases das formigas, resultados que sugerem a existência de uma via metabólica mutualista. A organização de tal via parece ter envolvido seleção positiva pelas formigas de enzimas produzidas pelo fungo simbiote (BACCI et al., 2013), de modo que a evolução das formigas pode ter sido moldada em função da relação metabólica com os seus fungos mutualistas.

O metabolismo de aminoácidos parece também representar esta integração metabólica, uma vez que formigas cortadeiras parecem não dispor de enzimas da via biossintética de arginina, que provavelmente são fornecidas pelo fungo (NYGAARD *et al.*, 2011) o que, uma vez comprovado, poderia caracterizar uma segunda via metabólica mutualista.

Recentemente Nygaard *et al.* (2016),apresentou um estudo que mostra que provavelmente o cultivo de fungos simbioses pelas Attini tornou-se irreversível quando as formigas perderam a via de biossíntese de arginina, contando apenas com simbioses previsivelmente presentes para fornecer este aminoácido.

## **OBJETIVO**

### **Objetivo Geral**

Este trabalho teve como objetivo obter o transcriptoma da formiga Attini *Mycocepurus goeldii*, uma attínea pleisiomórfica, e realizar a anotação dos transcritos com o intuito de identificar as enzimas presentes nas vias metabólicas de aminoácidos e de carboidratos. A partir dos dados gerados, identificar possíveis ausências enzimáticas que poderiam ser supridas pelo fungo mutualista. Com este procedimento, objetivamos identificar dependências metabólicas que foram estabelecidas durante a evolução da simbiose entre formigas Attini e fungos mutualistas.

### **Objetivos específicos**

Os objetivos específicos compreendem:

- Realizar a montagem dos transcritos em *contigs*;
- Anotar o transcriptoma;
- Identificar os genes das enzimas das vias metabólicas de aminoácidos e carboidratos.
- Testar a hipótese de dependência das formigas em relação a amilases fúngicas.
- Verificar a possível dependência da formiga com relação ao fungo associado.



## MATERIAL E MÉTODOS

### **Coleta, extração e quantificação do RNA total**

Foram coletados cerca de 200 indivíduos (100 mg) da espécie *Mycocephurus goeldii* e posteriormente foi realizada a extração imediata do RNA total. A extração do RNA foi feita utilizando o método de TRIzol a partir da amostra de 100mg de operárias, seguindo as recomendações do fabricante (Invitrogen, UK). A concentração do RNA total foi determinada utilizando o aparelho Nano Drop 2000 (Thermo Scientific). A qualidade do RNA total foi verificada na resolução do gel de Agarose 1%, corado com GelRed. O RNA da amostra também foi avaliada de acordo com o Protocolo de Quantificação qPCR da Illumina e a qualidade do RNA foi também avaliada por meio de eletroforese em chip, utilizando o equipamento BioAnalyzer RNA nano chip e o Número de Integridade do RNA (RIN). Após a normalização, a amostra foi então submetida ao enriquecimento de RNA mensageiro eucarioto (OligodT Selection Method) e depois foi construída a biblioteca do tipo Truseq RNA.

### **Construção da biblioteca transcriptômica e sequenciamento**

A construção e sequenciamento da biblioteca transcriptômica foram realizadas pela empresa Macrogen Inc. (Seul, KR), como serviço terceirizado, utilizando a plataforma Illumina. Para cada amostra, foram feitas duas réplicas, as quais foram enviadas para Macrogen Inc. A biblioteca do tipo Truseq RNA foi sequenciada em ambos os sentidos (paired-end, 2x100 pb), em um terço da canaleta na plataforma Illumina (HiSeq™ 2000) seguindo o protocolo fornecido pelo fornecedor (Illumina Inc., San Diego, CA, USA).

### **Processamento dos dados e montagem *de novo***

As análises dos dados de sequenciamento foram conduzidas em um servidor (98 GB de memória e 8TB de HD) com sistema operacional Linux/Debian 6.0.6, pela bolsista de pós-doutorado, especialista em Bioinformática, Milene Ferro – Processo FAPESP 2014/17950-4. Para verificar a qualidade dos *reads* gerados, foram feitas análises estatísticas iniciais usando o programa FASTQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Os *reads* foram montados utilizando a ferramenta para *shortreads* Trinity, desenvolvida para transcriptoma *de novo* a partir de dados de *RNA-Seq* (GRABHERR *et al.*, 2011). De acordo com o parâmetro JM, deve-se considerar 1 GB para cada 1 milhão de pares de *reads* Illumina.

Assim, foram usados 80 GB de memória para montagem dos transcritos. Os *contigs* menores que 300 pb foram descartados, considerando que para as análises no *Blast x* teriam sequências com pelo menos 100 aminoácidos. O programa Trinity de montagem de transcritos gera várias isoformas para um mesmo gene (lócus). Oono e colaboradores (2014) descreveram uma filtragem de isoformas utilizando o maior *contig* obtido após a montagem, gerando um conjunto de sequências sem redundâncias, denominadas *unigenes* (genes únicos). Essa mesma abordagem foi utilizada para *Mycocarpurus goeldii*.

### **Anotação funcional**

Os *contigs* foram anotados utilizando o programa Blast2GO PRO (CONESA *et al.*, 2005). Todos os *unigenes* foram anotados funcionalmente contra o banco de sequência não redundante (NR) do NCBI utilizando o algoritmo *Blast x* com *e-value* mínimo de 1e-03. Que obteve resultados do *Blastx*, mapeamento de termos de ontologia gênica (GO), número enzimático (*Enzyme Commission*), domínios de proteína (*InterPro*) e vias metabólicas (*KEGG*).

### **Seleção de genes candidatos para análise de pressão seletiva**

Para o cálculo da razão  $\omega$  ( $\omega = dN/dS$ ), foi primeiramente realizado o alinhamento múltiplo das sequências homólogas de genes da maltase ou da  $\alpha$ -amilase, encontradas nos seis transcriptomas. Os alinhamentos foram feitos através do programa *BioEdit* (HALL, 1999), que gerencia a ferramenta *Clustal W* (THOMPSON *et al.*, 1994). Posteriormente, através do programa DnaSP, foram obtidos os valores de dN e dS para todos os alinhamentos possíveis entre os pares homólogos dos genes da  $\alpha$ -amilase e da maltase, fazendo isso separadamente, para as formigas e para fungos.

A partir dos valores de dN e dS, foi calculada a razão  $\omega$  para cada alinhamento dos pares homólogos, e partir dos valores de  $\omega$  foi calculado o valor médio dos ômegas para maltases e amilases em cada um dos grupos de organismos. Foi também calculada a razão  $\omega$  para a maltase e  $\alpha$ -amilase de espécies de formigas não Attini. Estas sequências foram obtidas através do GenBank, como resultados de busca via *Blastn* utilizando como *query* sequências das enzimas de *M. goeldii*. Foram selecionados somente os resultados de *Blastn* que incluíam as sequências com mais de 80% de identidade em relação a *query*. Posteriormente, foi feito o alinhamento múltiplo para as sequências de maltase ou de  $\alpha$ -amilase das espécies não Attini, seguido do cálculo da razão  $\omega$ .

Para verificar a identidade entre as sequências dos pares homólogos dos genes da maltase e da  $\alpha$ -amilase, obtivemos o valor de identidade de cada par alinhado, através do programa *BioEdit*, utilizando a ferramenta *Pairwise alignment*.

Para a identificação das trocas de aminoácidos presente nas sequências codificadoras do gene da  $\alpha$ -amilase foi feita a tradução das sequências de todas as espécies analisadas. A tradução de nucleotídeos para aminoácidos foi feita utilizando o programa Orf Predictor (MIN *et al.*, 2005). As regiões de domínios e sítios catalíticos foram identificadas através do *Blastx* (GISH&STATES, 1193), e a quantificação das substituições dos aminoácidos foi feita manualmente a partir da observação do alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos da enzima  $\alpha$ -amilase.

Além da análise quantitativa das substituições de aminoácidos presentes na enzima  $\alpha$ -amilase também foi feita uma análise qualitativa através da matriz de substituição BLOSUM 62 - *BLOCKS SUBstitution Matrix* (HENIKOFF, 1992), que é uma tabela bidimensional (i, j) que contém valores que demonstram a probabilidade de que o aminoácido da posição i sofra mutação para o aminoácido da posição j, quaisquer que sejam as duas sequências envolvidas.

Os aminoácidos possuem propriedades bioquímicas que influenciam como eles são substituídos ao longo da evolução. Por exemplo, existe uma maior probabilidade de que um aminoácido seja substituído por outro com características estruturas e funcionais semelhantes em vez de um aminoácido pertencente ao um grupo diferente. Considerando que a comparação de proteínas é feita frequentemente com critérios evolutivos, é necessário um esquema de pontuação que leve em conta estas probabilidades. Se a amostra é grande o suficiente para ser estatisticamente significativa, as matrizes devem refletir as verdadeiras possibilidades de mutações que ocorreram ao longo de um certo período de evolução.

### **Análise das vias metabólicas**

A partir dos resultados do KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), foram analisadas as vias metabólicas pertencentes ao metabolismo de carboidratos e também as vias de metabolismo de aminoácidos, anotando as enzimas encontradas e as não encontradas pelo KEGG, considerando as vias metabólicas da espécie *Acromyrmex echinator*, disponíveis online no KEGG, como referência para saber o total de enzimas que deveriam estar presentes em *Mycocephurus goeldii*.

Para verificarmos quais enzimas estavam realmente ausentes no transcriptoma de *Mycocephurus goeldii*, criamos um banco das sequências homólogas às não encontradas pelo KEGG, composto de genes de *Acromyrmex echinator*, *Wasmannia auropunctata* e *Atta*

*cephalotes*, encontrados no GenBank. Estas espécies de formigas foram as que tiveram maior número de *hits* na anotação do transcriptoma de *M. goeldii*. A partir deste banco, foi feito um Blast local contra o transcriptoma de *Mycocepurus goeldii* sem o filtro de tamanho de 300 pb, possibilitando identificar transcritos de menor tamanho.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Sequenciamento Illumina *paired-end* e montagem *de novo*

Os dados de sequenciamento da biblioteca de *Mycocepurus goeldii*, demonstraram que a amostra gerou 16.247.965.344 bases com 160.870.944 *reads*, com conteúdo GC igual a 43,83% e qualidades FASTQ, baseada nos valores Phred de Q20, igual a 95,82% e Q30 igual a 89,63% (Tabela 1). Após a montagem de novo e a filtragem de sequências menores do que 300pb, foram produzidos 87,233 *contigs*, que foram agrupados em 28,707 transcritos não redundantes (*unigenes*). O tamanho médio dos *unigenes* foi de 1.304 pb (Tabela 1).

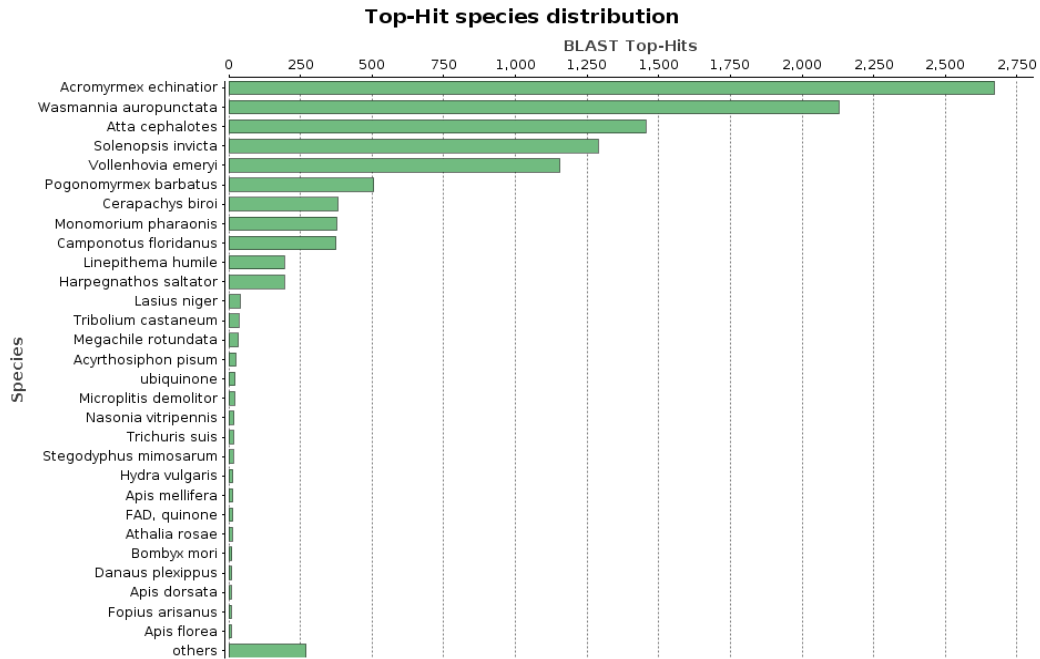
**Tabela 1:** Dados obtidos a partir do sequenciamento da biblioteca de *Mycocepurus goeldii*.

Bases	16.247.965.344
Pares de <i>reads</i>	160.870.944
<i>Contigs</i>	106.970
Tamanho médio dos <i>contigs</i>	1.304
<i>Contigs</i> maiores do que 300 pb	87.233
<i>Contigs</i> após filtro de isoformas	28.707
<i>Contigs</i> após retirada dos maiores que 8.000 pb	28.459

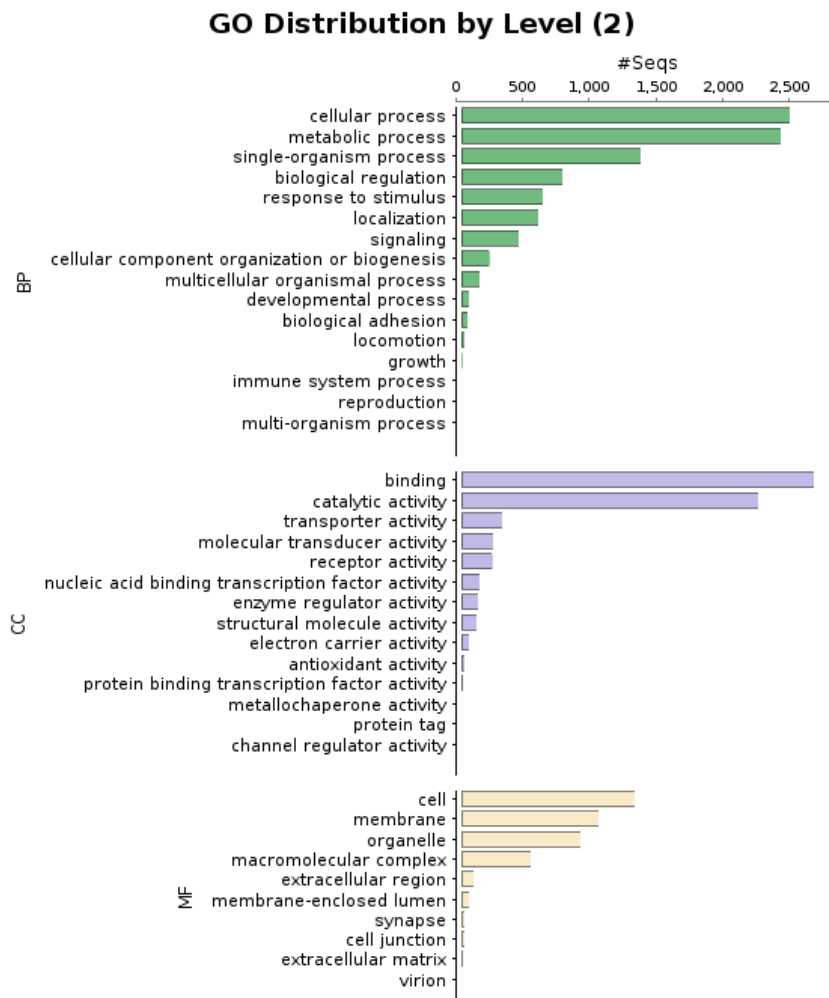
### Anotação funcional

Do total de 28.707 *unigenes*, para 17.134 *unigenes* não foi encontrado nenhuma sequência conhecida e, portanto podem ser considerados novos transcritos, regiões não traduzidas, RNA não codificante, ou sequências curtas que não contenham uma proteína com domínio. A maior parte dos melhores *hits* obtidos foi proveniente das espécies *Acromyrmex echinator*, *Wasmannia auropunctata* e *Atta cephalotes* (Figura 1).

**Figura 2:** Número de best hits em cada espécie com sequências depositada no NCBI.



**Figura 3:** Distribuição de termos de Ontologia Gênica (GO) para o nível 2 nas três ontologias (Processo Biológico, Função Molecular e Componente Celular).



Após o mapeamento dos termos GO (GO nível2), cujos resultados podem ser visualizados na figura 1, foi observado que, dentro de processos biológicos (9524 *unigenes*), a maioria dos *unigenes* se concentra em processo celular e processo metabólico. Dentro de componentes celulares (6298 *unigenes*), os *unigenes* se concentram em função celular, membrana e organelas. E com relação a função molecular (5015 *unigenes*), eles se concentram em ligantes e atividade catalítica (Figura 2).

A partir dos resultados de anotação do KEGG, foi verificado que 1061 *unigenes* estão atribuídos para 554 enzimas presentes em 104 vias metabólicas (tabela 2). Dentre essas vias, foram separadas as correspondentes ao metabolismo de aminoácidos e polisacarídeos, com o objetivo de verificar possíveis ausências enzimáticas que poderiam então ser supridas pelo fungo mutualista.

**Tabela 2:** Distribuição de resultados do Blastx feito pelo Blast2GO.

Anotação	<i>Mycocetpurus goeldii</i>
Número de Unigenes	28.707
Unigenes sem Blast results	248
Unigenes com BLASTX hits	11.325
Unigenes sem BLASTX hits	17.134
Unigenes com termos de GO	5.715
Unigenes com Enzyme Comission (EC)	1.116
Unigenes com Interpro	12.985
Unigenes com vias do KEGG	1.061

### Seleção de genes candidatos para análise de pressão seletiva

Foram feitos quatro alinhamentos múltiplos para as formigas. Um para maltases e outro para as amilases das cinco espécies de Attini (*Mycocetpurus goeldii*, *A. sexdens rubropilosa*, *A. sexdens piriventri*, *A. sexdens*, *Acromyrmex echinaior* e *Atta cephalotes*); e outros para maltases ou amilases de cinco espécies não Attini (*Wasmannia auropunctata*, *Monomorium pharaonis*, *Vollenhovia emeryi*, *Solenopsis invicta*), que foram espécies que voltaram como resultado de Blast x com identidade maior que 80% com relação às sequências de *M. goeldii*.

Um quinto alinhamento foi feito para maltases das duas espécies de fungos mutualistas. Nas tabelas 3, 4 e 5 encontram-se os valores de dN, dS, identidade e  $\omega$  relativos a cada um dos alinhamentos.

Ao observarmos os valores de  $\omega$  médio, vimos que o maior valor foi o das  $\alpha$ -amilases de formigas Attini, indicando menor pressão seletiva para estas enzimas. Este valor é 5,0 vezes maior que o da maltase das Attini, 2,5 vezes maior que maltase ou  $\alpha$ -amilase das

formigas não cultivadoras de fungo e 6,7 vezes maior do que a maltase dos fungos mutualistas. A pressão seletiva menor para  $\alpha$ -amilases das Attini pode ser mensurada para cada um dos pares de homólogos (Figura 3). Observando a figura 4 pode-se verificar que os valores de  $\omega$  não são influenciados pelos valores de identidade, devido à baixa correlação entre estes parâmetros, representados por baixos valores de R2. Desta forma, a pressão seletiva não ocorre como resultante da maior ou menor divergência entre os pares de sequências homólogas, mas é função do modo de evolução gênica.

Foi também identificado na enzima  $\alpha$ -amilase, em quais regiões estavam ocorrendo as substituições não sinônimas que resultaram no valor de  $\omega$  elevado para as espécies Attini.

**Tabela 3:** Valores de dN, dS, identidade e  $\omega$  para maltases homólogas de fungos mutualistas

Maltase					
Alinhamentos	Espécie 1	Espécie 2	dN	dS	$\omega$
1	Fungo de <i>M. goeldii</i>	<i>L. gongylophorus</i>	0,0951	1,6017	0,0594

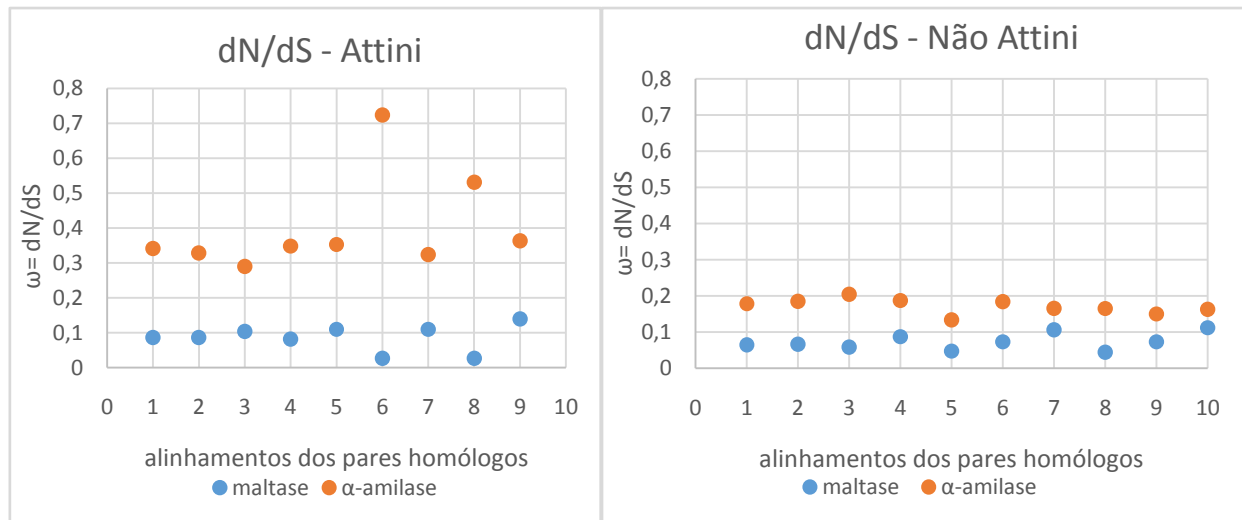
**Tabela 4:** Valores de dN, dS, identidade e  $\omega$  para cada par de homólogos da enzima  $\alpha$ -amilase de formigas Attini e Não Attini.

Número do alinhamento e espécies envolvidas			dN	dS	$\omega$	Identidade	$\omega$ Médio
ATTINI	1	<i>Mycocepurus goeldii</i> x <i>A. sexdens piriventris</i>	0,1458	0,4259	0,342334	0,821769	0,4
	2	<i>Mycocepurus goeldii</i> x <i>A. sexdens rubropilosa</i>	0,1457	0,4428	0,329042	0,819728	
	3	<i>Mycocepurus goeldii</i> x <i>A. sexdens sexdens</i>	0,1458	0,4262	0,342093	0,81676	
	4	<i>Mycocepurus goeldii</i> x <i>Acromyrmex echinaior</i>	0,1407	0,4849	0,290163	0,811741	
	5	<i>Mycocepurus goeldii</i> x <i>A. cephalotes</i>	0,1473	0,4329	0,340263	0,811066	
	6	<i>A. sexdens piriventris</i> x <i>A. sexdens sexdens</i>	0,0018	0,0031	0,580645	0,99797	
	7	<i>A. sexdens piriventris</i> x <i>Acromyrmex echinaior</i>	0,0442	0,1255	0,352191	0,933198	
	8	<i>A. sexdens piriventris</i> x <i>A. cephalotes</i>	0,0152	0,025	0,608000	0,971660	
	9	<i>A. sexdens rubropilosa</i> x <i>A. sexdens sexdens</i>	0,0018	0,0125	0,144000	0,99594	
	10	<i>A. sexdens rubropilosa</i> x <i>A. cephalotes</i>	0,0442	0,1366	0,323572	0,969636	
	11	<i>A. sexdens rubropilosa</i> x <i>Acromyrmex echinaior</i>	0,0152	0,0346	0,439306	0,931174	
	12	<i>A. sexdens sexdens</i> x <i>Acromyrmex echinaior</i>	0,0442	0,1255	0,352191	0,93360	
	13	<i>A. sexdens sexdens</i> x <i>A. cephalotes</i>	0,0152	0,0282	0,539007	0,97116	
	14	<i>Acromyrmex echinaior</i> x <i>A. cephalotes</i>	0,0416	0,1242	0,334944	0,933918	
NÃO ATTINI	1	<i>Wasmannia auropunctata</i> x <i>Monomorium pharaonis</i>	0,0961	0,5281	0,181973	0,841819	0,18
	2	<i>Wasmannia auropunctata</i> x <i>Vollenhovia emeryi</i>	0,0881	0,4821	0,182742	0,851626	
	3	<i>Wasmannia auropunctata</i> x <i>Solenopsis invicta</i>	0,1098	0,5298	0,207248	0,831636	
	4	<i>Monomorium pharaonis</i> x <i>Vollenhovia emeryi</i>	0,0734	0,5576	0,131636	0,854336	
	5	<i>Monomorium pharaonis</i> x <i>Solenopsis invicta</i>	0,096	0,5132	0,187062	0,845214	
	6	<i>Vollenhovia emeryi</i> x <i>Solenopsis invicta</i>	0,1045	0,6349	0,164593	0,825881	

**Tabela 5:** Valores de dN, dS, identidade e  $\omega$  para cada par de homólogos da enzima maltase de formigas Attini e Não Attini.

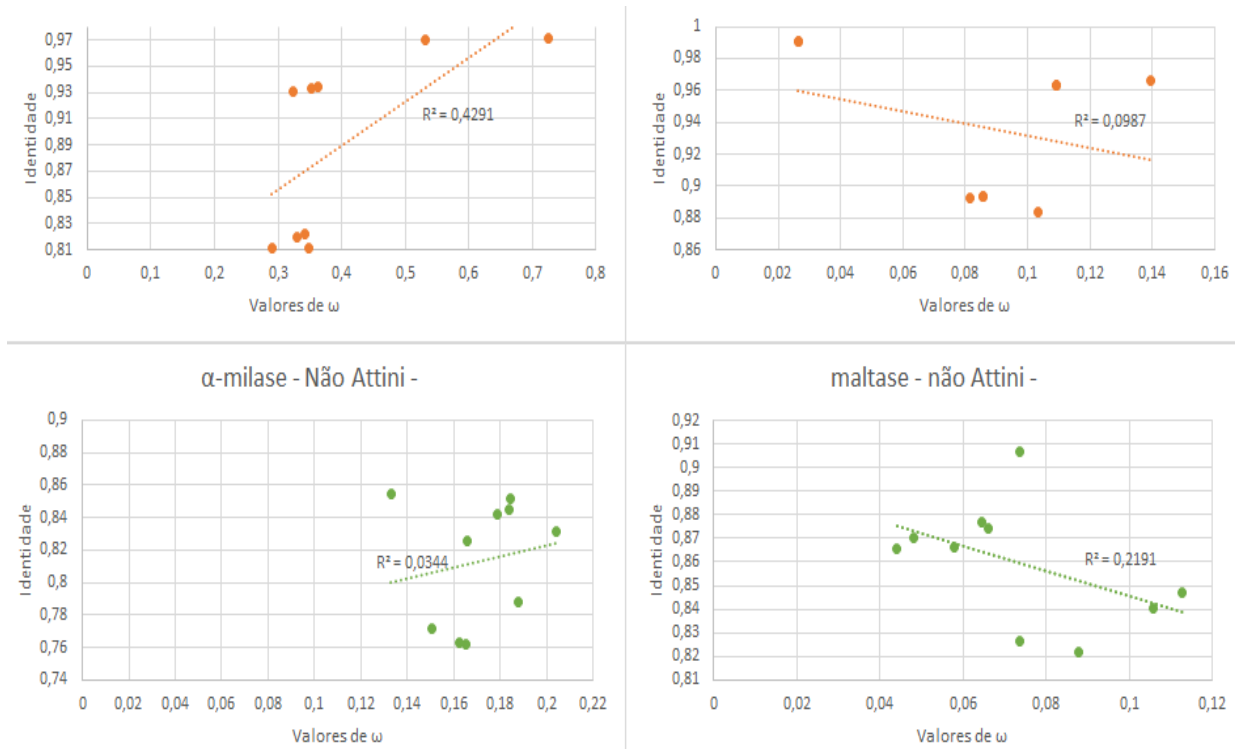
Número do alinhamento e espécies envolvidas			dN	dS	$\omega$	Identidade	$\omega$ Médio
ATTINI	1	<i>Mycocepurus goeldii</i> x <i>A. sexdens rubropilosa</i>	0,0381	0,4442	0,085772	0,893363	0,08
	2	<i>Mycocepurus goeldii</i> x <i>A. sexdens piriventris</i>	0,0381	0,4442	0,085772	0,893363	
	3	<i>Mycocepurus goeldii</i> x <i>A. sexdens sexdens</i>	0,0381	0,4442	0,085772	0,89410	
	4	<i>Mycocepurus goeldii</i> x <i>A. cephalotes</i>	0,0371	0,4563	0,081306	0,883669	
	5	<i>Mycocepurus goeldii</i> x <i>Acromyrmex echinator</i>	0,0484	0,4691	0,103176	0,892617	
	6	<i>A. sexdens rubropilosa</i> x <i>A. cephalotes</i>	0,001	0,038	0,026316	0,991052	
	7	<i>A. sexdens rubropilosa</i> x <i>Acromyrmex echinator</i>	0,0136	0,1244	0,109325	0,963460	
	8	<i>A. sexdens piriventris</i> x <i>A. cephalotes</i>	0,001	0,038	0,026316	0,991052	
	9	<i>A. sexdens piriventris</i> x <i>Acromyrmex echinator</i>	0,0136	0,1244	0,109325	0,963460	
	10	<i>A. sexdens sexdens</i> x <i>A. cephalotes</i>	0,001	0,038	0,026316	0,99105	
	11	<i>A. sexdens sexdens</i> x <i>Acromyrmex echinator</i>	0,0136	0,1244	0,109325	0,96346	
	12	<i>Acromyrmex echinator</i> x <i>A. cephalotes</i>	0,0146	0,1048	0,139313	0,966443	
NÃO ATTINI	1	<i>Wasmannia auropunctata</i> x <i>Monomorium pharaonis</i>	0,0338	0,6568	0,051462	0,87658	0,04
	2	<i>Wasmannia auropunctata</i> x <i>Vollenhovia emeryi</i>	0,0364	0,6721	0,054159	0,87405	
	3	<i>Wasmannia auropunctata</i> x <i>Solenopsis invicta</i>	0,0353	0,7252	0,048676	0,86623	
	4	<i>Monomorium pharaonis</i> x <i>Vollenhovia emeryi</i>	0,0264	0,7978	0,033091	0,87007	
	5	<i>Monomorium pharaonis</i> x <i>Solenopsis invicta</i>	0,0264	0,4094	0,064485	0,90672	
	6	<i>Vollenhovia emeryi</i> x <i>Solenopsis invicta</i>	0,0185	0,7372	0,025095	0,86587	

**Figura 4:** Pressão seletiva ( $\omega$ ) nos genes de maltase  $\alpha$ -amilase em formigas Attini (A) ou não Attini (B).



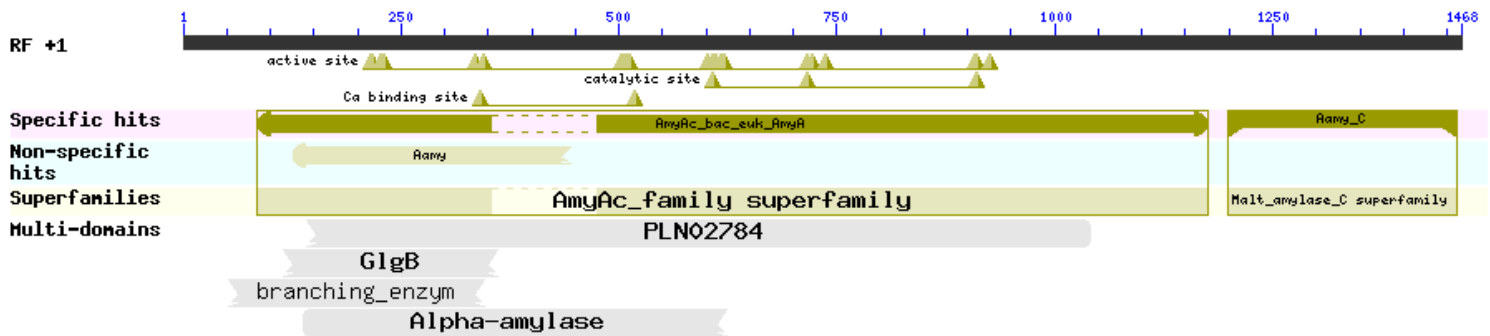


**Figura 5:** Valor de  $\omega$  em função da identidade em cada alinhamento de homólogos. Baixos valores de  $R^2$  indicam fraca correlação entre os parâmetros.



As trocas não sinônimas (de aminoácidos) ocorrem nos sete domínios diferentes (Figura 5). O domínio *AmyAc\_bac\_euk\_AmyA*, que inicia no aminoácido 29 e termina no 328, sendo o domínio mais extenso na enzima, é um domínio catalítico encontrado em  $\alpha$ -amilases bacterianas e eucarióticas, responsável por catalisar a hidrólise das ligações glicosídicas do glicogênio, amido, polissacarídeos e alguns oligossacarídeos. Outro domínio presente na enzima, chamado de *Alpha-amylase*, inicia no aminoácido 88 até o 332, está presente nas enzimas da família das glicosil hidrolases e um domínio beta-barril chave grega carboxi-terminal de cálcio. O terceiro domínio presente na estrutura das  $\alpha$ -amilases é o *GlgB*, se estende do aminoácido 39 até o 120, sua função está relacionada com o transporte e com o metabolismo de carboidratos. O domínio *branching\_enzym* é responsável por transferir cadeias de resíduos de glicose a outras cadeias semelhantes durante a biossíntese de glicogênio, se estende a partir do aminoácido 18 até o 115. Os outros três domínios catalíticos conservados (*Aamy\_C* - 400 ao 487; *Aamy* - 42 ao 148; *PLN02784* - 48 ao 347) não estão com as suas funções especificadas no Banco de Dados de Domínios Conservados do NCBI, mas neles também foram identificadas trocas de grupos de aminoácidos devido às substituições não sinônimas presentes nas sequências nucleotídicas da  $\alpha$ -amilase das Attini.

**Figura 6:** Domínios conservados da alfa-amilase selecionada. Imagem extraída do resultado de Blast x a partir da sequência nucleotídica do gene da enzima.



Por serem regiões de domínios funcionais conservados, essas substituições podem afetar a função da  $\alpha$ -amilase das espécies de Attini. Entre estas substituições, podem ser relatadas tanto troca de aminoácidos do grupo dos aminoácidos polares por aminoácidos pertencente ao grupo dos apolares (38 substituições), quanto de polares ácidos substituídos por polares básicos (7 substituições) ou dos polares neutros (13 substituições); além de trocas entre polares básicos e polares neutros (10 substituições), além das trocas de aminoácidos sem mudanças de grupos (45 substituições para aminoácidos do mesmo grupo) (Tabela 6).

Os mesmos tipos de troca entre grupos de aminoácidos não ocorrem com frequência entre as espécies não Attini: ao longo de todo alinhamento das sequências de aminoácidos foram quantificadas 28 trocas (34%) de aminoácidos com alteração do grupo dos polares para os apolares, para as não Attini, contra 38 (32%) alterações corridas nas Attini. Sendo que nas Attini a quantidade de trocas no geral foi igual a 113, contra 87 nas não Attini (Tabela 6).

Os aminoácidos apolares possuem radical "R" geralmente formado exclusivamente por carbono e hidrogênio sendo assim hidrofóbicos, o radical R localiza-se internamente na molécula de proteína, estabilizando sua estrutura por interações hidrofóbicas. Já os aminoácidos do grupo polar, possuem o radical R hidrofílico, são mais solúveis em água porque contêm grupos funcionais capazes de formar ligações de hidrogênio com a água, estabilizando sua estrutura por interações hidrofílicas. Portanto trocas de aminoácidos entre esses dois grupos possivelmente desestabilizam a estrutura da enzima.

Os resultados da análise quantitativa das substituições dos resíduos de aminoácidos na  $\alpha$ -amilase mostram que a enzima das Attini está com uma grande quantidade de resíduos sendo substituídos por aminoácidos não compatíveis com relação a estrutura e função dentro da cadeia proteica.

Reforçando esse resultado, a análise feita a partir da Matriz BLOSUM 62, mostra que a  $\alpha$ -amilase das Attini possui trocas de resíduos não comuns. As trocas não comuns recebem

uma pontuação abaixo de zero, e as trocas de aminoácidos mais comuns recebem valores igual ou maior que zero.

A partir do somatório dos valores designados para cada umas das substituições de aminoácidos ao longo do alinhamento entre as Attini e Não Attini é possível verificar que a soma total dos valores de BLOSUM nas Attini é 28% inferior ao resultado encontrado nas Não Attini (Figura 5). O total de BLOSUM nas Attini foi igual a 194, e nas não Attini 268.

As mudanças de grupos de aminoácidos presentes nas espécies podem ser um indicativo que a enzima  $\alpha$ -amilase das espécies Attini está perdendo sua função catalítica, pois todos os seus domínios estão com alterações de aminoácidos que desestabilizam a estrutura proteica por interferir nas interações hidrofílicas ou hidrofóbicas da enzima. Na Figura 5 é possível visualizar todos os resíduos que sofreram modificação ao longo de toda a sequência primária da  $\alpha$ -amilase, comparando *Mycocepurus goeldii*, espécies cortadeiras e Não Attini.

Para comparação dos resultados encontrados com relação às trocas de resíduos de aminoácidos, foi feito o mesmo com enzima maltase. A partir do alinhamento das sequências de aminoácidos da enzima maltase entre as espécies Attini e não Attini foi quantificado o número de resíduos que sofreram substituições e também os tipos de trocas que eles sofreram, juntamente com a análise qualitativa a partir da matriz BLOSUM. Na figura 6 e na tabela 7 é possível verificar os resultados das duas análises.

Comparando os resultados entre a enzima  $\alpha$ -amilase e a enzima maltase, considerando que a  $\alpha$ -amilase possui o total de 487 resíduos, 194 resíduos sofreram trocas ao longo do alinhamento das sequências e na maltase do total de 447 resíduos, 51 sofreram trocas (Figura 6). Além do que na maltase a maioria das substituições não ocorre entre grupos, no total de 40 trocas ocorridas nas sequências das Attini, 12 (30%) delas é entre apolares e polares, as demais trocas estão dentro dos grupos. E nas não Attini, das 20 trocas 7 (35%) são entre os grupos polares e apolares, logo com relação a enzima maltase, não existe tantas diferenças nas substituições de aminoácidos comparando Attini e não Attini (Tabela 7).

Os resultados encontrados na análise do valor de  $\omega$  juntamente com a identificação dos tipos de substituições de aminoácidos encontradas nas sequências da enzima, reforçados com a análise qualitativa feita a partir da matriz BLOSUM, sugerem que as formigas Attini deixaram de utilizar a sua própria  $\alpha$ -amilase, passando a utilizar a do fungo mutualista, apoiando a hipótese de Bacci e colaboradores (2013), pois os resultados mostram uma pressão seletiva relaxada sobre a enzima  $\alpha$ -amilase quando se comparado com os resultados encontrados na enzima maltase.

**Figura 7:** Resíduos de aminoácidos que sofreram trocas ao longo do alinhamento das seqüências da enzima  $\alpha$ -amilase das espécies Attini e não Attini (ácido  $\leftrightarrow$  básico, básico  $\leftrightarrow$  polar neutro, ácido  $\leftrightarrow$  polar neutro, apolar  $\leftrightarrow$  polar neutro, apolar  $\leftrightarrow$  ácido, básico  $\leftrightarrow$  apolar, mesmo grupo, cortadeiras, não Attini e *M. goeldii*).

Residue	2	5	7	13	15	17	19	20	23	27	38	42	46	51	55	61	64	65	67	68	69	82	
<i>M. goeldii</i>	R	A	A	T	V	Y	D	P	E	D	D	V	K	M	G	I	V	I	V	D	K	I	
Leaf-cutters	Q/R	L	W	A	AL	Q	D	L	V	N/D	K	E	N	MI	G	I/V	V	I	I/V	E/K	N	K	
Attini	Q/R	AL	AW	T/A	AVL	QY	D	PL	E/V	D/N	D/K	V/E	K/N	MI	G	IV	V	I	IV	DE/K	K/N	I/K	
BLOSUM62	1	-1	-3	0	-1	-1	6	-3	-2	1	-1	-2	0	1	6	3	4	4	3	-1/1	0	-1	13
Non-Attini	Q/R	V	L	AV	AV	Q	E	T/PL	VA	D	D	V/D	R	MI/H	G/S	IV	VL	IV	IV	GP	N	I/E/K	
BLOSUM62	1	4	4	0	0	5	5	-1	0	6	6	-3*	5	-3	0	3	1	3	3	-2	6	-3	40
Residue	84	90	91	94	95	98	102	103	107	108	111	113	119	120	121	124	132	133	134	137			
<i>M. goeldii</i>	Q	P	D	K	E	D	N	V	T	Y	A	L	N	F	D	T	N	S	H	S			
Leaf-cutters	A/N	A	E/K	K	N/D	R	N	A	I	Y	V	F	N	H	K/A	K	DD	T	QN	N			
Attini	QN/A	PA	DE/K	K	N/DE	D/R	N	VA	T/I	Y	AV	LF	N	F/H	D/K/A	T/K	N/D	ST	H/QN	SN			
BLOSUM62	-1	-1	-1	5	0	-2	6	0	-1	7	0	0	6	-1	-1	-1	1	1	1	1		20	
Non-Attini	H	PA	D/Q	KR	K/E	R	N/D	VA	I	Y/IF	V	F	N/D	H/W	R/D/Q	KR	N/D	T	RH/Y/F	SN			
BLOSUM62	8	-1	0	2	1	5	1	0	4	3	4	6	1	-2	-2	2	1	5	-3	1		36	
Residue	140	145	146	150	151	153	155	158	160	161	169	177	178	183	184	187							
<i>M. goeldii</i>	A	G	Y	Y	P	S	D	Q	A	G	S	G	K	D	I	T							
Leaf-cutters	G	G/E	F/S	V	S	P	N	Q	A	G	S	S	K	DE/K	K	N							
Attini	AG	G/E	YS/F	Y/V	P/S	P/S	D/N	Q	A	G	S	G/S	K	DE/K	I/K	TN							
BLOSUM92	0	-2	-2	-1	-1	-1	1	5	4	6	4	0	5	-1	-3	0						14	
Non-Attini	A	RH/V	FA/S/E	P/YTN	P	S/PAG	NT	RK/NQ	E/PA	K/VAFG	S/V	S/G	N/K	E	K	E/N							
BLOSUM62	4	-3	-3	-3	7	-1	0	1	-1	-3	-2	0	0	5	5	0						6	
Residue	191	192	194	195	197	200	211	214	215	221	222	225	226	227	228	230	232						
<i>M. goeldii</i>	E	V	A	A	V	I	Y	K	V	N	D	V	K	H	N	R	G						
Leaf-cutters	K/E	MI	D	VI	I/V	Y	E	K	VI	K	N	P	K/E	H/Y	N	P	G/D						
Attini	E/K	VMI	A/D	AVI	IV	I/Y	Y/E	K	VI	N/K	D/N	VP	K/E	H/Y	N	R/P	G/D						
BLOSUM62	1	1	-2	-1	3	-1	-2	5	3	0	1	-2	1	2	6	-2	-1					12	
Non-Attini	A/E/Q	AVL	DE	A	V	F	G/NS/H	E/K	V/E	K	N	T	E	H	N/H	P	G/N/E						
BLOSUM62	-1	-1	2	4	4	6	-2	1	-2	5	6	5	5	8	1	7	-2					46	
Residue	233	237	238	239	246	249	250	257	259	264	267	269	272	273	274	277	278	284	298	309			
<i>M. goeldii</i>	T	I	F	F	G	S	N	L	A	R	L	E	A	F	N	N	L	S	L	S			
Leaf-cutters	A	V	F	F	S/G	I	S	F	A	R	M	E	A	L	N	N	Q	N	VL	G/S			
Attini	T/A	IV	F	F	G/S	S/I	NS	LF	A	R	ML	E	A	FL	N	N	L/Q	SN	VL	G/S			
BLOSUM62	0	3	6	6	0	-2	1	0	4	5	2	5	4	0	6	6	-2	1	1	0		45	
Non-Attini	A/T	I	V/F/T	V/T/F	G	VI	S/K	F	A/T	R/T	M	K/E*	A/S	LMF	N/K	N/D	L/Q	N	VL	G			
BLOSUM62	0	4	-2	-1	6	3	0	6	0	-1	5	1	1	2	0	1	-2	6	1	6		36	
Residue	310	311	312	315	316	321	326	336	337	339	344	346	347	350	351	356	361	364					
<i>M. goeldii</i>	H	S	E	I	Y	A	V	T	A	V	D	S	T	V	G	S	I	S					
Leaf-cutters	H	P/S	E	T	Y	K	V/I	T	A	I	A/G	N/DE	S	A	N	S	V/I	T					
Attini	H	P/S	E	I/T	YY	A/K	VI	T	A	VI	AG/D	SN/DE	TS	VA	G/N	S	VI	ST					
BLOSUM62	8	-1	5	-1	7	-1	3	5	4	3	-2	0	1	0	0	4	3	1				39	
Non-Attini	N/H	P	D/N	TN	Y/H	L/Q/R	V	IV/T	AP	VI	D/Y	YQ/H/D	TNS	A/D	NT	S/A	VL/R	ST/I					
BLOSUM62	1	7	1	0	2	-2	4	3	-1	3	-3	-3	1	-2	0	1	-3	-2				7	

Continua...

Residue	367	368	369	370	376	384	388	389	392	394	396	398	399	400	407	413	416	422	425	426		
<i>M. goeldii</i>	N	N	T	M	V	I	I	R	V	A	N	N	I	D	Y	C	Q	F	E	T		
Leaf-cutters	D	D	K/N	T	I	V/I	V	R	I/N	A	N	D	V	N	Q	S	N	I	D	G		
Attini	N/D	N/D	K/NT	M/T	IV	VI	VI	R	VI/N	A	N	N/D	VI	N/D	YQ	C/S	QN	FI	ED	T/G		
BLOSUM62	1	1	-1	-1	3	3	3	5	-3	4	6	1	3	1	-1	-1	0	0	2	-2	24	
Non-Attini	D	D	N/D	T	V	I	V	RH/G	N	AV	NQ/H	N/D/G	VI	N/G	QY/W	C	D/N	I	ED	G/R/NS		
BLOSUM62	6	6	1	5	4	4	4	0	6	0	1	1	3	0	-2	9	1	4	2	0	55	
Residue	427	429	432	434	436	438	441	452	454	459	461	465	466	467	469	473	474	475	476	480	BLOSUM	
<i>M. goeldii</i>	Y	L	V	F	C	E	T	N	Q	V	K	N	R	K	Y	L	T	S	E	M		
Leaf-cutters	H	F	H	F	S	Q	I/T	N/D	V/K	T	T/R	N	G	K	Y	L	A/V	N	E	MV		
Attini	Y/H	LF	V/H	F	C/S	E/Q	I/T	N/D	V/K/Q	V/T	KR/T	N	G/R	K	Y	L	T/AV	NS	E	MV		
BLOSUM62	2	0	-3	6	-1	2	-1	1	-2	-2	-1	6	-2	5	7	4	0	1	5	1	28	194
Non-Attini	Y/F	MF	T	FV	C	E/P/R	T	N	K/E	V	K/T	D/N	R/S	KR	Y/H	FLV	K/ST	N	E/Q	T/V		
BLOSUM62	3	0	5	-1	9	-1	5	6	1	4	-1	1	-1	2	2	-1	0	6	2	0	42	268

**Figura 8:** Resíduos de aminoácidos que sofreram trocas ao longo do alinhamento das sequências da enzima  $\alpha$ -amilase das espécies Attini e não Attini (ácido ↔ básico, básico ↔ polar neutro, ácido ↔ polar neutro, apolar ↔ polar neutro, apolar ↔ ácido, mesmo grupo, ortadeiras, não Attini e *M. goeldii*).

Residue	4	8	10	20	49	53	56	62	65	66	78	83	84	90	94	96	98	100	102	103	135	147	153	
<i>M. goeldii</i>	R	A	H	S	A	A	V	R	S	S	V	G	V	G	T	I	G	T	T	H	I	A	S	
Leaf-cutters	S	S	H	S	S	A	L	K	S	S	I/V	S	A	E	S	V	R	I	K	S	V	T	S/C	
Attini	R/S	A/S	H	S	A/S	A	VL	RK	S	S	IV	S/G	VA	G/E	TS	VI	G/R	T/I	T/K	H/S	IV	A/T	S/C	
BLOSUM62	-1	1	8	4	1	4	1	2	4	4	3	0	0	-2	1	3	-2	-1	-1	-1	3	0	-1	32
Non-Attini	S	A/S	N/H	A/S	A/S	A/S	V	RK	TS	TS	VI	S	A	E	S	V	G	T	K	S	V	A	S	
BLOSUM62	4	1	1	1	1	1	4	2	1	1	3	4	4	5	4	4	6	5	5	4	4	4	4	73
Residue	165	169	174	179	189	197	205	207	218	239	240	248	273	276	308	317	332	336	339	357	368	378	385	
<i>M. goeldii</i>	T	G	H	V	S	S	E	V	V	N	F	E	E	S	I	H	V	A	N	A	M	N	P	
Leaf-cutters	T/M	S/N	H/Y	A/T	S/N	A/P	D	I	V/I	S	L	D	D	T	I	H/R	M	A/T	D	S	M/V	S/N	P/S	
Attini	T/M	S/N/G	H/Y	A/T/V	SN	AP/S	ED	VI	VI	NS	LF	ED	ED	ST	I	HR	MV	A/T	N/D	A/S	MV	SN	P/S	
BLOSUM92	-1	1	2	0	1	-1	2	3	3	1	0	2	2	1	4	0	1	0	1	1	1	1	-1	24
Non-Attini	T	N/T/G	H/Y	T/V	S	S	E	VI	V	S	LM	ED	ED	T	IV	Y/R	M	A/S	D	A/S	M	SN	P	
BLOSUM62	5	0	2	0	4	4	5	3	4	4	2	2	2	5	3	2	5	1	6	1	5	1	7	73
Residue	390		421	427	433	445	TOTAL BLOSUM																	
<i>M. goeldii</i>	V		G	L	V	E	62																	
Leaf-cutters	V/M		A	F	I	D	169																	
Attini	VM		GA	LF	VI	ED	62																	
BLOSUM62	1		0	0	3	2	169																	
Non-Attini	V		A	F	I	E	169																	
BLOSUM62	4		4	6	4	5	169																	

**Tabela 6:** Total de trocas entre os tipos de aminoácido da enzima  $\alpha$ -amilase para Attini e não Attini. Substituição de aminoácidos polares por não polares (38/113=34%; 28/87=32%) ou de polares por polares em grupos distintos (30/113=27%; 29/87=33%) ou no mesmo grupo (45/113=40%; 30/87=34%).

	Apolar		Polar neutro		Polar ácido		Polar básico		Total	
	Attini	Não Attini	Attini	Não Attini	Attini	Não Attini	Attini	Não Attini	Attini	Não Attini
Apolar	33	21	27	17	5	4	6	7	71	49
Polar neutro			11	5	13	12	10	13	34	30
Polar ácido					1	2	7	4	8	6
Polar básico							0	2	0	2
Total	33	21	38	22	19	18	23	26	113	87

**Tabela 7:** Total de trocas entre os tipos de aminoácido da enzima maltase para Attini e não Attini. Substituição de aminoácidos polares por não polares (12/40= 30%; 7/20=35%) ou de polares por polares em grupos distintos (6/40= 15%; 3/20=15%) ou no mesmo grupo (23/40= 58%; 10/20=50%).

	Apolar		Polar neutro		Ácido		Básico		Total	
	Attini	Não Attini	Attini	Não Attini	Attini	Não Attini	Attini	Não Attini	Attini	Não Attini
Apolar	12	4	11	7	1	0	0	0	23	11
Polar neutro			5	3	1	0	5	3	11	6
Polar ácido					4	2	0	0	4	2
Polar básico							2	1	2	1
Total	12	4	15	10	6	2	7	4	40	20

### Análise das vias metabólicas de aminoácidos e carboidratos

Com os resultados do KEGG obtidos a partir do Blast2GO foi possível selecionar as vias metabólicas para o metabolismo de aminoácidos e de carboidratos. Selecionadas as vias, foi possível contabilizar manualmente o número de enzimas ausentes em *Mycocephurus goeldii* comparadas com as enzimas preditas nas vias da formiga *Acromyrmex echinator*, organismo de referência filogeneticamente mais próximo de *Mycocephurus goeldii* encontrado no KEGG.

Identificamos uma diferença na quantidade de enzimas que o KEGG mapeou nas vias de *Mycocephurus goeldii* com relação ao total de enzimas das vias de *Acromyrmex echinator*. A partir dos resultados do Blast local verificamos que para muitas vias metabólicas a quantidade de enzimas que estavam ausentes no mapeamento do KEGG foram encontradas, ou seja, as enzimas estão presentes no transcriptoma porém por algum motivo desconhecido o Blast2GO não as anotou ou a elas não atribuiu o número de *Enzyme Commission*. As tabelas 8 e 9 mostram as vias encontradas para metabolismo de carboidratos e aminoácidos respectivamente, juntamente com a quantidade de enzimas encontradas por via através do Blast2GO e o total de enzimas de cada via metabólica da espécie que usamos como referência, e com isso é possível verificar quais ECs foram encontrados após o Blast local no transcriptoma de *M. goeldii*.

**Tabela 8:** Vias metabólicas de carboidratos em MG, total de ECs encontrados com o Blast2GO e com o Blast local.

Via Metabólica	Total ECs em <i>A. echinator</i>	ECs Blast 2GO	ECs Blast Local	EC	Nome da enzima
Glicólise e gliconeogênese	23	14	10	2.7.1.147	ADP-dependent glucokinase
				5.1.3.15	glucose-6-phosphate 1-epimerase
				5.4.2.2	phosphoglucomutase
				2.7.1.11	ATP-dependent phosphofructokinase
				1.2.1.12	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
				5.4.2.11	phosphoglycerate mutase
				2.7.1.40	pyruvate kinase
				4.1.1.32	Phosphoenolpyruvate carboxykinase
				3.1.3.80	multiple inositol polyphosphate phosphatase 1-like
1.2.1.3	aldehyde dehydrogenase				
Frutose e manose	14	7	8	1.1.1.21	aldehyde reductase
				1.1.1.14	sorbitol dehydrogenase-like
				3.1.3.11	fructose-1,6-bisphosphatase I
				2.7.1.11	ATP-dependent 6-phosphofructokinase
				1.1.1.271	GDP-L-fucose synthase
				4.2.1.68	L-fuconate dehydratase
				2.7.1.3	ketohehexokinase
2.7.1.28	dihydroxyacetone_kinase				
Degradação do amido	17	7	10	4.1.1.35	UDP-glucuronate decarboxylase
				2.4.1.17	glucuronosyltransferase
				3.2.1.31	beta-glucuronidase
				3.1.3.12	trehalose 6-phosphate phosphatase
				3.2.1.20	$\alpha$ -glucosidases, Maltase
				2.4.1.15	$\alpha$ -trehalose-phosphate synthase [UDP-forming]
				2.7.7.9	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase
				3.2.1.1	$\alpha$ -amylase
				2.4.1.25	4- $\alpha$ -glucanotransferase
5.4.2.2	phosphoglucomutase				
Galactose	11	6	6	2.7.7.9	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase
				3.2.1.23	Beta-galactosidase
				5.4.2.2	phosphoglucomutase
				3.2.1.20	lysosomal $\alpha$ -glucosidase
				2.7.1.11	6-phosphofructokinase 1
1.1.1.21	aldehyde reductase				
Ácido Cítrico	17	13	4	4.1.1.32	phosphoenolpyruvate carboxykinase
				2.3.3.1	citrate synthase
				1.3.5.1	succinate dehydrogenase-ubiquinone
				6.2.1.4	succinate dehydrogenase

**Tabela 9:** Vias Metabólicas de aminoácidos, total de ECs encontrados com o Blast2GO e com o Blast local.

Via Metabólica	Total ECs em <i>A. echinator</i>	ECs Blast 2GO	ECs Blast Local	EC	Nome da enzima
Glicina, serina e treonina	22	10	12	5.4.2.11	phosphoglycerate_mutase
				1.1.1.81	glyoxylate_reductase
				2.7.1.31	glycerate_kinase
				3.1.3.3	phosphoserine_phosphatase
				4.3.1.19	threonine_dehydratase
				4.4.1.1	putative_cystathionine_gamma-lyase
				2.1.2.1	serine_hydroxymethyltransferas
				1.2.1.8	putative_aldehyde_dehydrogenase
				1.5.8.3	sarcosine_dehydrogenase,_mitochondria
				4.1.1.48	threonine_aldolase
				2.3.1.29	glycine_C-acetyltransferase
				1.1.1.103	L-threonine_3-dehydrogenase
Biossíntese de valina, leucina e isoleucina	2	1	1	4.3.1.19	threonine dehydratase
Alanina, aspartato e glutamato	20	6	14	2.1.3.2	Aspartate carbamoyltransferase
				6.3.4.5	Asparagine synthetase
				2.6.1.2	Alanine aminotransferase
				4.3.2.2	Adenylosuccinate lyase
				1.4.3.1	D-aspartate oxidase
				3.5.1.3	omega-amidase - NIT2
				1.2.1.24	Succinatesemialdehyde dehydrogenase
				2.6.1.19	4-aminobutyrate aminotransferase mitochondrial
				1.4.1.3	D-aspartate oxidase
				1.4.1.13	Putative glutamate synthase-NADPHEC
				4.1.1.15	Glutamate decarboxylase
				3.5.1.2	Glutaminase
2.4.2.14	Amidophosphoribosyltransferase-like				
6.3.5.5	Carbamoyl-phosphate-synthase IDEM EC-2.1.3.2				
Biossíntese L-isina	2	1	2	2.6.1.39	kynurenine/2-aminoadipate aminotransferase
				1.2.1.31	aldehyde dehydrogenase family 7 member A1
Histidina	4	2	4	2.1.1.22	cytosolic_non-specific_dipeptidase
				3.4.13.18	histidine_decarboxylase
				4.1.1.22	aldehyde_dehydrogenase
Biossíntese de arginina	9	4	5	1.2.1.3	cytosolic_non-specific_dipeptidase
				3.5.1.2	glutaminase
				1.4.1.3	glutamate dehydrogenase
				2.6.1.2	alanine aminotransferase
				6.3.4.5	argininosuccinate synthase
1.14.1339	nitric oxide synthase				



Apesar de todas as vias em *M. goeldii* terem sido completadas, tendo como base as enzimas previstas nas vias de *A. echinator*, após o Blast local, na via de biossíntese de arginina, porém para a enzima argininossuccinato sintase, que catalisa a conversão de aspartato e citrulina em argininossuccinato, foi encontrada uma sequência truncada. Em 2011, Nygaard e colaboradores, também encontraram somente um pseudogene para a enzima argininossuccinato sintase no genoma da formiga cortadeira *Acromyrmex echinator*. Outra enzima da via de síntese de arginina abordada por Nygaard e colaboradores (2011) foi a argininossuccinato liase, que não foi encontrada no genoma de *Acromyrmex echinator*, e o mesmo ocorreu também no genoma de *Atta cephalotes* (SUEN, 2011), duas espécies Attini derivadas. Também fizemos a busca por essa enzima no transcriptoma de *M. goeldii* utilizando sequências da enzima de espécie não Attini (*Wasmannia auropunctata*) para fazer o Blast local contra as sequências de *M. goeldii*, e não foi encontrado nenhum gene ou pseudogene para argininossuccinato liase.

Sendo assim, existe a possibilidade dessa enzima não estar sendo sintetizada pelas formigas Attini há algum tempo, pois *Mycocepurus goeldii* é uma pleisiomórfica e em seu transcriptoma não foi encontrada argininossuccinatoliase e foi encontrado apenas um pseudogene para argininossuccinato sintase, mostrando assim que a dependência do fungo mutualista para a biossíntese de arginina não é algo exclusivo de espécies derivadas, e que é um evento ancestral na história evolutiva das Attini.

A estratégia de se fazer um Blast local para preencher os ECs faltantes nas vias foi eficiente, mostrando que o transcriptoma foi processado corretamente de modo que não tiveram genes perdidos no processo de montagem, nas vias selecionadas.

Além de ter sido possível preencher todos os ECs faltantes em todas as vias selecionadas em *M. goeldii*, verificamos que dentre as vias analisadas, algumas possuíam mais enzimas do que as encontradas nas vias de *A. echinator*. Possivelmente, porque o KEGG tem uma limitação para mapear todos os genes de enzimas em seus respectivos metabolismos. Na tabela 10 é possível verificar em quais vias foi observado essa diferença de ECs entre *Acromyrmex echinator* e *Mycocepurus goeldii*.

**Tabela 10:** ECs ausentes no mapeamento das vias de *Acromyrmex echinator* e presentes no mapeamento das vias de *Mycocepurus goeldii*, feitos pelo KEGG.

Via metabólica	ECs ausentes no KEGG DE <i>A. echinator</i>	Nome da enzima
Glicólise e gliconeogênese	1.2.1.5	aldehyde dehydrogenase
Metabolismo de frutose	2.7.1.105	phosphofructokinase 2
Metabolismo de galactose	3.5.1.25	acetyl glucosamine phosphate deacetylase
Biossíntese de lisina	2.6.1.57	aromatic aminotransferase
	2.6.1.9	histidinol-phosphate transaminase
Metabolismo de histidina	1.2.1.5	aldehyde dehydrogenase

## CONCLUSÃO

- O gene da enzima  $\alpha$ -amilase das espécies Attini sofre uma menor pressão seletiva em comparação ao gene das espécies Não Attini, que está sob forte pressão seletiva.
- Existem mais substituições entre aminoácidos grupo Apolares e Polares na enzima  $\alpha$ -amilase das Attini em comparação com a  $\alpha$ -amilase das Não Attini o que possivelmente comprometem a função da enzima visto que o valor de Blosum62 é mais baixo nas Attini do que o das Não Attini, e considerando que todas as mudanças ocorrem nos domínios da enzima.
- Reforça-se a hipótese lançada por Bacci *et al.*, (2013) sugerindo que as Attini estão deixando de utilizar a sua própria enzima para degradação de amido vegetal e passando utilizar somente a amilase fornecida pelo fungo mutualista.
- Na da via de biossíntese de arginina, a ausência da enzima argininossuccinato liase e a presença somente do pseudogene da argininossuccinato sintase no transcriptoma da formiga *Mycocepurus goeldii*, apóia a hipótese lançada com os genomas das duas espécies de Attini cortadeiras (*Atta cephalotes* e *Acromyrmex echinator*) de que essa enzima é suprida pelo fungo, visto que trata-se de uma via de síntese de um aminoácido extremamente importante e sem essas duas enzimas não seria possível obtê-lo.

## REFERÊNCIAS

- BACCI, M.; BUENO, O. C.; RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F. C.; SOMERA, A. F.; SILVA, A. A metabolic pathway assembled by enzyme selection may support herbivory of leaf-cutter ants on plant starch. *J. Insect Physiol.*, v. 59, p. 525-531, 2013. ISI/GS: 2/2, 2013.
- BOUCK, A.; VISION, T. The molecular ecologist's guide to expressed sequence tags. *Mol Ecol.* New York, v. 16, n. 5, p. 907-24, 2007.
- CONESA, A; GÖTZ, S; GARCÍA-GÓMEZ, JM; TEROL, J; TALÓN, M; ROBLES, M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21 (18): 3674–6, 2005.
- DOUGLAS, A. E. The microbial dimension in insect nutritional ecology. **Funct Ecol.** London, ENG, v. 23, p.38 – 47, 2009.
- DOUGLAS, A. E. **The symbiotic habit.** Princeton University Press, Princeton, NJ. 216p, 2010.
- FERNANDEZ, F. **Listado de las especies de hormigas de la Región Neotropical.** 379-411. In: F. Fernández (Ed.), *Introducción a las Hormigas de la Región Neotropical.* Instituto de investigación de recursos biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá, Colômbia, 2003.
- GISH, W. & STATES, D. J. Identification of protein coding regions by database similarity search. **Nature Genet.** 3:266-272. 1993.
- GRABHERR, M. G. *et al.* Full-length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome. **Nat Biotechnol.** London, UK, v. 15, n. 29, f. 7, p. 644- 52, 2011.
- GOLDMAN N.; YANG Z. A codon-based models nucleotide substitution for protein-coding DNA sequences. **Mol. Biol. Evol.** 11(5): 725-36. 1994
- HALL, TOM A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: *Nucleic acids symposium series.* p. 95-98. 1999.
- HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The Ants.** Massachusetts: Belknap Press of Harvard University. 732p, 1990.
- HOBSON, P. N.; WALLACE, R. J. Microbial ecology and activities in the rumen: part 1. **Crit Rev Microbiol.** London, ENG, v. 9, p.165–225, 1982.
- HUGHES, A. L. & NEI, M. Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals over dominant selection. **Nature** 335: 167-170. 1988.
- HUGHES, A. L. & NEI, M. Nucleotide substitution at major histocompatibility complex class II loci: Evidence for over dominant selection. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 86:958-962. 1989.
- ILLUMINA. **An Introduction to Next Generation Sequencing Technology.** Disponível em <[http://www.illumina.com/Documents/products/Illumina\\_Sequencing\\_Introduction.p df](http://www.illumina.com/Documents/products/Illumina_Sequencing_Introduction.p df)> Acesso em 20/03/2016.
- KEMPF, W. A review of the ant genus *Mycocepurus* Forel, 1893 (Hymenoptera: Formicidae). **Studia Entomologica.** 6: 417-433, 1963.
- MACKAY, W. P.; J.M. MAES, P.R; FERNÁNDEZ & G. LUNA. The ants of North and Central America: the genus *Mycocepurus* (Hymenoptera: Formicidae). **J. Insect Science** 4 (27): 1-7, 2004.
- MACKAY, W. P. Dos especies nuevas de hormigas de la tribu Attini de Costa Rica y México: *Mycetosoritis vinsoni* y *Mycocepurus curvispinosus* (Hymenoptera: Formicidae). **Rev. Bio. Trop.** 46: 421-426, 1998.
- MARTIN, M. M.; GIESELMANN, M. J.; MARTIN, J. S. Rectal Enzymes of Attine Ants. A-Amilase and Chitinase. **J Insect Physiol.** Great Britain, UK, v. 19, p.1409 16, 1973.
- MAYHÉ-NUNES, A. J. & MENEGUETE P. S. **Definição de termos para as projeções mesossomais das operárias de *Mycocepurus* Forel, 1893 (Hymenoptera, Formicidae).** Contribuições Avulsas sobre a História Natural do Brasil. Série Zoologia 27: 1-7, 2000.
- MEHDIABADI, N. J. & SCHULTZ T. R. Natural history and phylogeny of the fungus-farming ants (Hymenoptera: Formicidae). **Myrmecological News** 13: 37-55, 2009.

- MIN, X.J., BUTLER, G., STORMS, R; TSANG, A. Orf Predictor: predicting protein-coding regions in EST-derived sequences. *Nucleic Acids Res.*, Web Server Issue W677-W680 (<http://bioinformatics.yzu.edu/tools/OrfPredictor.html>) 2005.
- MISHRA, S.C. Chemical composition and digestive enzymes of the nest of *Crematogaster dohrni*, Rogenhoferi Mayr (Hymenoptera: Formicidae) and their significance. *Journal of Animal Morphology and Physiology* 38, 19–28.1991.
- MUELLER, U. G.; SCHULTZ, T. R.; CURRIE, C. R.; ADAMS, R. M. M. The origin of the attine ant-fungus mutualism. *Q. Rev. Biol.*, v. 76, n. 2, p. 169-197, 2001.
- NYGAARD, S.; ZHANG, G.; SCHIØTT, M.; LI, C.; WURM, Y.; HU, H.; ZHOU, J.; JI, L.; QIU, F.; RASMUSSEN, M.; PAN, H.; HAUSER, F.; KROGH, A.; GRIMMELIKHUIJZEN, C. J. P.; WANG, J. & BOOMSMA, J. J. The genome of the leaf-cutting ant *Acromyrmex echinatior* suggests key adaptations to advanced social life and fungus farming In: *Genome Res.* 21, 8, p. 1339-1348 10 p, 2011.
- NYGAARD, S. *et al.* Reciprocal genomic evolution in the ant–fungus agricultural symbiosis. *Nat. Commun.* 7:12233 doi: 10.1038/ncomms12233, 2016.
- OONO, Y., et al. Genome-wide transcriptome analysis reveals that cadmium stress signaling controls the expression of genes in drought stress signal pathways in rice. *PLoS One.* V. 9, n. 5. 2014.
- OLIVEIRA, M. T.; ROSA, A. C.; AZEREDO-ESPIN, A. M. L.; LESSINGER, A. C. Improving access to the control region and tRNA gene clusters of Dipteran mitochondrial DNA. *J. Med Entomol.*, v. 43, n. 3, p. 636-639, 2006.
- ORR HA. Fitness and its role in evolutionary genetics. *Nat Ver Genet.* 10(8): 531-9. 2009
- SCHERER N. M. **Evolução molecular Darwiniana nas proteínas relacionadas à patogênese (PRs) em plantas.** Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 104f, 2002.
- PACHECO, P & BERTI, F. I. **Formigas cortadeiras e seu controle.** Piracicaba: IPEF/GTFC, 1987.
- RABELING, C. M. VERHAAGH & W. ENGELS Comparative study of nest architecture and colony structure of the fungus-growing ants, *Mycocepurus goeldii* and *M. smithii*. *J. Insect Science.* 7 (40): 1-13, 2007.
- RABELING, C.; J. LINO-NETO S.C.; CAPPELLARI, I.A.; DOS-SANTOS, U.G. MUELLER & M. BACCI JR. Thelytokous parthenogenesis in the fungus-growing ant *Mycocepurus smithii* (Hymenoptera: Formicidae). *Public Library of Science.* 4: e6781, 2009.
- SCHULTZ, T. R.; MEIER, R. A phylogenetic analysis of the fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini) based on morphological characters of the larvae. *Syst. Entomol.*, v. 20, n. 4, p. 337–370, 1995
- SIQUEIRA, C.G., *et al.* Metabolism of plant polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of leaf-cutting ant *Atta sexdens*. *Appl Environ Microbiol.* Washington, USA, v. 64, n. 12, p. 4820-2, 1998.
- SILVA, A.,*et al.* Survival of *Atta sexdens* on different food sources. *J. Insect Physiol.*v. 49, n. 4, p. 307–13, 2003.
- SUEN G, TEILING C, LI L, HOLT C, ABOUHEIF E, BORNBERG-BAUER E, et al. The Genome Sequence of the Leaf-Cutter Ant *Atta cephalotes* Reveals Insights into Its Obligate Symbiotic Lifestyle. *PLoS Genet* 7(2): e1002007. doi:10.1371/journal.pgen.1002007, 2011.
- THOMPSON, J. D; Higgins, D. G and Gibson, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22, 4673–4680. 1994.
- WEBER, N. A. **Gardening ants: the Attines.** Philadelphia: The American Philosophical Society, 146 p, 1972.
- ZILBER-ROSENBERG, I.; ROSENBERG, E. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiol Rev.* London, UK, v. 32, p.723–35, 2008.