

---

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

---

**DESVENDANDO A ECOLOGIA DE INTERAÇÕES INSETO-LEVEDURAS:  
CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA, MOLECULAR E DESCOBRIMENTO DE  
NOVAS TOXINAS KILLER**

**RODOLFO BIZARRIA JÚNIOR**

**Rio Claro – SP  
2023**

---

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

---

**DESVENDANDO A ECOLOGIA DE INTERAÇÕES INSETO-LEVEDURAS:  
CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA, MOLECULAR E DESCOBRIMENTO DE  
NOVAS TOXINAS KILLER**

**RODOLFO BIZARRIA JÚNIOR**

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

Orientador: Prof. Dr. André Rodrigues

B625d      Bizarria Júnior, Rodolfo

Desvendando a ecologia de interações inseto-leveduras :  
caracterização taxonômica, molecular e descobrimento de novas  
toxinas killer / Rodolfo Bizarria Júnior. -- Rio Claro, 2023  
177 p. : tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),  
Instituto de Biociências, Rio Claro  
Orientador: André Rodrigues

1. Mutualismo. 2. Formigas cultivadoras de fungos. 3. Toxinas  
killer. 4. Cyberlindnera. 5. Libidibia ferrea. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

## **IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA**

O presente estudo explorou interações entre leveduras e insetos, apoiando-se em dois modelos: os jardins de fungo de formigas atíneas e besouros associados aos frutos de pau-ferro. Identificamos leveduras presentes nos jardins de fungo que produzem toxinas de natureza antifúngica e que apresentam atividade contra diferentes patógenos humanos de importância clínica. Futuramente, tais toxinas podem ser exploradas como alternativas à moléculas antifúngicas sintéticas no controle de infecções fúngicas, principalmente, em decorrência do surgimento de patógenos humanos resistentes aos medicamentos empregados atualmente. Além disso, apresentamos uma nova interação inseto-levedura, entre uma espécie de *Cyberlindnera* e um besouro que infesta frutos de pau-ferro. Considerando a distribuição dessa árvore em território brasileiro, consideramos que esse pode ser um modelo primordial para estudo dessas interações no Brasil. Foi observado que a levedura produz atrativos voláteis, que futuramente poderão ser estudados em armadilhas entomológicas de insetos de importância econômica, em manejos integrados que mitiguem os danos causados nas lavouras. Em conclusão, o estudo além de elucidar a ecologia e evolução dessas interações, avança em linhas de pesquisa com impacto comercial e de interesse público.

## **POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH**

This study explored insect-yeast interactions relying on two models: the fungus gardens of attine ants and beetles associated with "pau-ferro" fruits. We identified that yeasts present in fungus gardens produce antifungal toxins against human pathogens of clinical importance. In the future, such toxins may be explored as alternatives to synthetic antifungal molecules to control fungal infections, an emerging field considering the human pathogens' resistance to the current available drugs. Furthermore, we present a new insect-yeast interaction between a species of *Cyberlindnera* and a beetle that infests "pau-ferro" fruits. Considering the distribution of this tree in the Brazilian territory, we consider that this could be a primordial model for studying these interactions in Brazil. We observed that the yeast produces volatile attractants, which eventually could be studied in entomological traps for economically important insects, in an integrated management to mitigate crop damage. In conclusion, the study elucidates the ecology and evolution of these interactions and advances on research lines with commercial and public interest.



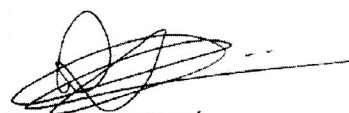
## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: DIVERSIDADE E ECOLOGIA DE LEVEDURAS ASSOCIADAS A INSETOS

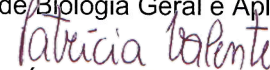
**AUTOR: RODOLFO BIZARRIA JÚNIOR**

**ORIENTADOR: ANDRÉ RODRIGUES**

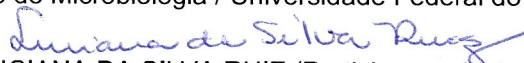
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada), área: Microbiologia Aplicada pela Comissão Examinadora:



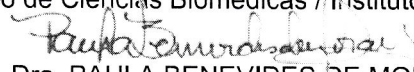
Prof. Dr. ANDRÉ RODRIGUES (Participação Virtual)  
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / Unesp - IB Rio Claro



Profa. Dra. PATRÍCIA VALENTE DA SILVA (Participação Virtual)  
Departamento de Microbiologia / Universidade Federal do Rio Grande do Sul



Profa. Dra. LUCIANA DA SILVA RUIZ (Participação Virtual)  
Núcleo de Ciências Biomédicas / Instituto Adolfo Lutz



Profa. Dra. PAULA BENEVIDES DE MORAIS (Participação Virtual)  
Departamento de Microbiologia / Universidade Federal do Tocantins



Profa. Dra. DERLENE ATTILI DE ANGELIS (Participação Virtual)  
Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas / Universidade Estadual de Campinas

Rio Claro, 30 de outubro de 2023

Título alterado para: "Desvendando a ecologia de interações inseto-leveduras: caracterização taxonômica, molecular e descobrimento de novas toxinas killer"

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todo corpo docente da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", em especial, ao Prof. Dr. André Rodrigues, a quem sou grato por todas as oportunidades de aprendizado que me concedeu, pelo empenho e dedicação a esse estudo e por toda experiência científica que compartilhou comigo ao longo dos anos que me orientou. Estendo meus agradecimentos a toda sua equipe que teve papel fundamental na minha formação científica.

Agradeço a todos discentes e funcionários do Departamento de Biologia Geral e Aplicada e do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), da UNESP – Rio Claro, pelo apoio e pelos momentos que compartilhamos. Em especial, agradeço à Tatiane de Castro Pietrobon, que foi essencial para a concretização desse estudo e à Luciana Simão Carneiro e Amanda Viana Galanti, pelo zelo que tiveram com minha coleção de leveduras.

Agradeço ao Prof. Dr. Paul A. Rowley, que me acolheu e incentivou no fascinante mundo das leveduras *killer*, além de compartilhar conhecimentos sobre ciência que levarei para a vida. Estendo meus agradecimentos a toda sua equipe que também me acolheu e me fez sentir em casa, e ao *International Programs Office*, da Universidade de Idaho, por todo empenho e auxílio durante minha estadia no exterior.

Agradeço às instituições financeiras de suporte a pesquisa, em especial, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), na qual fui agraciado com dois projetos aprovados [processo nº 2019/24412-2, e processo nº 2021/09980-4, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)], que me proveram apoio financeiro e institucional. O presente trabalho também foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Processo #142396/2019-2).

Por fim, porém não menos importante, dedico esse trabalho à minha família, em especial, aos meus pais, Açucena e Rodolfo, e minhas irmãs, Geovana e Juliana, e agradeço por todo apoio e suporte que me forneceram durante minha jornada científica.

*Remember when you were young, you shone like the sun.  
Shine on you crazy diamond.  
Now there's a look in your eyes, like black holes in the sky."*  
Pink Floyd  
Wish You Were Here (1975)

*"Eu medi os céus, agora, as sombras eu meço.  
Para o firmamento viaja a mente, na terra descansa o corpo."*  
Johannes Kepler (1571-1630)

## RESUMO

Leveduras estão frequentemente associadas a insetos e seus ambientes. Benefícios mútuos foram observados em interações insetos-leveduras e incluem, dentre outros, o uso das leveduras como fonte de alimento e sua dispersão por insetos atraídos por seus voláteis. Nesse cenário, as interações inseto-levedura são modelos interessantes para entendimento da ecologia e evolução de mutualismos. Formigas atíneas são componentes importantes da fauna do continente americano, pois praticam uma fungicultura de fungos basidiomicetos, desempenhando importantes papéis ecológicos. Leveduras foram reportadas nos jardins de fungo de formigas atíneas, porém, até o momento, pouco foi explorado sobre a diversidade de leveduras em diferentes fungiculturas. Nosso estudo indica que os jardins são ricos em leveduras, entretanto, são dissimilares em relação à composição. Além disso, algumas leveduras do jardim produzem toxinas antifúngicas, com amplo espectro de atividade, incluindo contra patógenos humanos de importância clínica. Nosso estudo identificou elementos codificadores genômicos de uma nova toxina, que futuramente poderão ser empregados no estudo e busca de novas toxinas em leveduras. Além disso, apresentamos uma nova interação inseto-levedura, entre uma espécie de *Cyberlindnera* e um besouro que infesta frutos de pau-ferro, sendo essa, uma árvore nativa e acessível em território brasileiro. Por fim, demonstramos que a levedura *Cyberlindnera* possui rearranjos em genes ribossomais, como a primeira evidência desse fenômeno em leveduras desse clado. Nossa hipótese é que esse fenômeno pode ser um resultado da interação com os besouros. Em conclusão, insetos e seus ambientes apresentam uma grande diversidade de leveduras de interesse biotecnológico, e seu estudo pode elucidar sobre a ecologia e evolução de mutualismos, um campo ainda inexplorado considerando a vasta diversidade de insetos.

**Palavras-chave:** Mutualismo. Formigas cultivadoras de fungos. Toxinas *killer*. *Cyberlindnera*. *Libidibia ferrea*

## ABSTRACT

Yeasts are often associated with insects and their environments. Mutual benefits have been reported in different insect-yeast interactions including, among others, the use of yeasts as nutritional sources and their dispersal by insects attracted to their volatiles. Therefore, insect-yeast interactions are interesting models for understanding the ecology and evolution of mutualisms. Attine ants are key players in the American fauna, performing a fungiculture of basidiomycete fungi with important ecological roles. Yeasts have been reported in fungus gardens of attine ants; to date, the diversity of yeasts in different fungicultures is elusive. Our study indicates that fungus gardens are rich yeast environments, but dissimilar in terms of community composition. In addition, some yeasts from fungus gardens produce antifungal toxins with a broad spectrum of activity, including towards human pathogens of clinical importance. Our study identified a new toxin encoded by genomic elements, which in the future could be used in the study and search for new toxins from yeasts. Furthermore, we present a new insect-yeast interaction, between a species of *Cyberlindnera* and a beetle that infests "pau-ferro" fruits, a native and accessible tree in the Brazilian territory. Finally, we demonstrated that the associated yeast *Cyberlindnera* has rearrangements in ribosomal genes, the first evidence of these characteristics in this clade. We hypothesize that it may be a result of the interaction with the beetles. In conclusion, insects and their environments harbor a diversity of yeasts of biotechnological interest. The study of these yeasts can shed light on the evolution and ecology of mutualisms, which is still an unexplored field considering the vast diversity of insects.

**Keywords:** Mutualism. Fungus-growing ants. Killer toxins. *Cyberlindnera*. *Libidibia ferrea*

## SUMÁRIO

|                             |     |
|-----------------------------|-----|
| <b>Breve contexto</b> ..... | 9   |
| <b>Capítulo 1</b> .....     | 13  |
| Introdução.....             | 13  |
| Material e Métodos.....     | 15  |
| Resultados.....             | 20  |
| Discussão.....              | 22  |
| Figuras.....                | 26  |
| <b>Capítulo 2</b> .....     | 31  |
| Introdução.....             | 31  |
| Material e Métodos.....     | 34  |
| Resultados.....             | 43  |
| Discussão.....              | 45  |
| Figuras.....                | 48  |
| <b>Capítulo 3</b> .....     | 54  |
| Introdução.....             | 54  |
| Material e Métodos.....     | 56  |
| Resultados.....             | 64  |
| Discussão.....              | 66  |
| Figuras.....                | 71  |
| <b>Capítulo 4</b> .....     | 74  |
| Introdução.....             | 74  |
| Material e Métodos.....     | 75  |
| Resultados.....             | 78  |
| Discussão.....              | 80  |
| Figuras.....                | 83  |
| <b>Conclusão</b> .....      | 87  |
| <b>Apêndice</b> .....       | 88  |
| Capítulo 1.....             | 88  |
| Capítulo 2.....             | 107 |
| Capítulo 3.....             | 129 |
| Capítulo 4.....             | 136 |
| <b>Referências</b> .....    | 156 |

## BREVE CONTEXTO

A natureza é repleta de formas de vida complexas que interagem entre si e competem por recursos importantes em seus habitats, com pressões seletivas que regem os ciclos de vida das espécies e sua ascendência ao longo das gerações. O resultado são adaptações e comportamentos que aumentam em frequência nas populações, uma vez que conferem vantagens na disputa por recursos. Simbiose é uma associação entre organismos distintos que compartilham o mesmo habitat, um importante modo de vida para o surgimento de adaptações e conquista de novos habitats. Alguns insetos sociais ganham destaque pelo uso de fungos como recurso nutritivo, transmitindo-os ao longo de novas gerações e habitats, em processo similar a agricultura humana, como é o caso do mutualismo das formigas cultivadoras de fungos. Em outros casos, dois organismos distintos podem compartilhar o mesmo nicho, porém sem interação física, ou com associação limitada pela geografia, distribuição ou ciclo de vida. Esse é o caso de muitas associações entre leveduras e insetos, que aqui denominamos como mutualismos não simbióticos, uma vez que, benefícios mútuos da associação são evidentes. Usualmente as leveduras contribuem para a nutrição, detoxificação e sinalização de recursos aos insetos, inclusive modulando comportamentos, ao passo que esses, contribuem para sua dispersão e por fornecimento de um ambiente propício para que as leveduras possam interagir, e eventualmente, se reproduzir. Uma série de outros benefícios foi evidenciada em outros modelos, ainda carecendo de maiores esclarecimentos, como proteção no combate de patógenos, por exemplo. A complexidade dessas interações é refletida na diversificação das associações ao longo da história de vida dos insetos, sendo que alguns mantêm associações com predominância de táxons, enquanto outros possuem múltiplas espécies compondo uma complexa comunidade.

Neste estudo, nos dedicamos a investigar duas dessas interações, a primeira entre leveduras associadas a jardins de fungo de formigas cultivadoras, e a segunda, a interação entre leveduras associadas a frutos de pau-ferro e o besouro que os infesta. As formigas cultivadoras de fungos mantêm em seus jardins uma diversa comunidade de leveduras, com poucas assinaturas de especificidade, que potencialmente reflete a diversidade de leveduras nos substratos forrageados pelas formigas e outras fontes, como o solo. Isso caracteriza a comunidade associada de leveduras como um elemento do holobionte das formigas cultivadoras de fungos. Nosso estudo explorou a diversidade de leveduras em jardins de diferentes formigas, que praticam diferentes estilos de fungicultura, sendo o maior esforço amostral realizado nesse ambiente até o momento. Constatamos que os jardins são complexos e que nenhum taxon comum entre todas as amostras foi encontrado, sendo as comunidades diferentes mesmo entre jardins da mesma espécie e localidade.

Apesar das leveduras nos jardins terem sido historicamente exploradas para diversidade taxonômica, alguns estudos fizeram avanços acerca da ecologia de leveduras nesse ambiente. Um desses estudos identificou que leveduras de jardins secretam toxinas antifúngicas que poderiam ter um papel protetivo nesse mutualismo, dessa forma, em um segundo estudo exploramos esse fenótipo denominado '*killer*' em leveduras obtidas desse ambiente. Constatamos que os jardins abrigam tais leveduras, e mesmo em casos de ausência, podem estar associados a outros fatores relacionados aos métodos de expressão do fenótipo. É importante ressaltar, que nosso estudo evidenciou que as toxinas produzidas por essas leveduras possuem ação inibitória contra diferentes leveduras patogênicas humanas, podendo ser futuramente exploradas para descobrimentos de novas drogas de interesse clínico, mitigando infecções fúngicas em humanos e outros organismos. Nosso estudo resultou no descobrimento do que pode ser



uma nova toxina ‘*killer*’, de estrutura e ação semelhante a uma toxina previamente conhecida e mobilizada em elementos citoplasmáticos.

Em um segundo momento, dedicamo-nos ao estudo de uma nova associação entre leveduras, frutos de pau-ferro e besouros que infestam os frutos. Nesse estudo, identificamos que uma nova espécie de levedura, que momentaneamente acomodamos no gênero *Cyberlindnera*, é o componente predominante da comunidade. Tal levedura possui a habilidade de produzir compostos voláteis a partir dos extratos dos frutos, que são atrativos e distinguíveis pelos besouros. Essa levedura, que habita os frutos, têm na atividade de construção de galerias pelos besouros um apoio, potencializando sua densidade no fruto. Uma vez que em alguns casos não encontramos essa levedura associada aos frutos infestados, e a levedura também estar presente nos frutos sadios, mesmo que em baixas quantidades, postulamos essa interação até o momento, como um mutualismo não simbiótico. Demais interações entre o besouro e a levedura são discutidas adiante. Curiosamente, tal levedura também apresenta rearranjos em genes ribossomais, que apesar de normalmente estarem associados a pressões seletivas de purificação, em outros casos podem estar sujeitos a outros eventos e pressões evolutivas, como reticulação, homoplasias e mecanismos de evolução ‘*birth-and-death*’. Nossos resultados indicaram que a levedura em questão mantém cópias diferentes de regiões ribossomais, resultando em alterações estruturais dessas moléculas de ácido ribonucleico. Nossa hipótese é que a interação com os besouros nos frutos potencializa os rearranjos de genes nessa levedura, devido à atuação de outras pressões seletivas que não as de purificação. Os resultados estimulam a investigação sobre evolução dos genes ribossomais em leveduras e outros organismos.

No geral, o estudo explora dois modelos complexos de interações inseto-levedura, em contextos diferentes, com alta diversidade e ausência de especificidade,

além de predominância de um taxon. As interações foram investigadas sob a ótica de outras interações inseto-levedura e as avaliações deste estudo podem ser futuramente exploradas em outros modelos. A tese central é que as interações mutualísticas com insetos desempenham um papel central na ecologia e evolução de leveduras.

## Capítulo 1

### Explorando a comunidade de leveduras associada a jardins de fungo de formigas cultivadoras de fungos<sup>1</sup>

#### 1. Introdução

As leveduras são amplamente distribuídas nos ecossistemas, estabelecendo comunidades em substratos ricos em nutrientes (BUZZINI et al., 2017). Frequentemente transportadas por insetos (BRYSCH-HERZBERG, 2004; DA COSTA NETO; MORAIS, 2020; GANTER, 1988; LACHANCE et al., 2001), as leveduras encontram neles, ambientes adequados para sua sobrevivência (STEFANINI, 2018) e, eventualmente, para se reproduzir sexualmente e hibridizar (REUTER et al., 2007; SEIKE et al., 2021; STEFANINI et al., 2016). As formigas cultivadoras de fungos (*Hymenoptera: Attini: Attina*, doravante denominadas formigas “atíneas”) mantêm um mutualismo com parceiros fúngicos utilizados como alimento (MÖLLER, 1893; WEBER, 1972). Tal mutualismo originou há cerca de 55-65 milhões de anos (BRANSTETTER et al., 2017; NYGAARD et al., 2016; SCHULTZ; BRADY, 2008). A ocorrência de leveduras tem sido continuamente relatada em ninhos dessas formigas (ANGELIS et al., 1983; CARREIRO et al., 1997; CRAVEN et al., 1970; FISHER et al., 1996; PAGNOCCA et al., 1996), entretanto a biodiversidade de leveduras ainda é inexplorada em diferentes fungiculturas (BIZARRIA et al., 2022).

Tradicionalmente, as formigas atíneas agrupam-se em dois clados filogenéticos: *Paleoattina* e *Neoattina* (SCHULTZ; BRADY, 2008; SCHULTZ et al., 2015). Esta distinção se dá por diferenças na morfologia das formigas, nos tipos de fungos cultivados e no comportamento de forrageamento. Os gêneros de formigas *Acromyrmex*, *Amoimyrmex* e *Atta* pertencem ao clado *Neoattina* (CRISTIANO et al., 2020; SCHULTZ; BRADY, 2008) e são comumente conhecidas como formigas-cortadeiras de folhas, forrageando material vegetal fresco como substrato para o parceiro fúngico (*Agaricales: Agaricaceae: Leucoagaricus gongylophorus*). O clado *Neoattina* também inclui quatro gêneros de formigas não cortadeiras de folhas: *Mycetomoellerius*,

---

<sup>1</sup> O texto a seguir foi publicado em Bizarria Jr, R., de Castro Pietrobon, T., & Rodrigues, A. (2023a). Uncovering the yeast communities in fungus-growing ant colonies. *Microbial Ecology*, 86(1), 624-635.

*Paratrachymyrmex*, *Sericomyrmex* e *Trachymyrmex*, que forrageiam folhas e galhos secos para nutrir diferentes fungos agaricáceos (SCHULTZ; BRADY, 2008; SCHULTZ et al., 2015). As formigas do clado *Paleoattina* (e algumas *Neoattina*, por exemplo, *Cyphomyrmex* e *Mycetophylax*) forrageiam uma ampla gama de substratos para nutrir diferentes fungos nas famílias *Agaricaceae* e *Pterulaceae*, incluindo fezes e carcaças de artrópodes, néctar e sementes (DE FINE LICHT; BOOMSMA, 2010; RONQUE et al., 2019; SCHULTZ; BRADY, 2008).

As leveduras obtêm acesso aos jardins de fungo das formigas atíneas através do forrageamento de substratos (BIZARRIA et al., 2022; CARREIRO et al., 1997; FISHER et al., 1996). Solo das trilhas de forrageamento e da escavação dos ninhos também são fontes do fluxo de levedura no sistema (ANGELIS et al., 1983; ARCURI et al., 2014; RODRIGUES et al., 2009), que podem ser transportadas para dentro ou para fora das colônias quando aderidas aos corpos das formigas (ARCURI et al., 2014; FISHER et al., 1996; PAGNOCCA et al., 2008). Mecanismos adicionais para a aquisição de leveduras nesse sistema ainda não foram estudados, como a possibilidade de transmissão por outros insetos ou artrópodes visitantes.

Uma grande quantidade de leveduras foi encontrada em jardins de formigas-cortadeiras, com uma abundância de  $10^2$  a  $10^7$  unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de jardim (CRAVEN et al., 1970; PAGNOCCA et al., 1996; RODRIGUES et al., 2009; PAGNOCCA et al., 2008). Esses números também indicam uma diferenciação espacial dentro do mesmo jardim, pois as partes novas e velhas dos jardins de fungo, assim como o material de descarte (lixo), apresentam diferenças na abundância de leveduras (CRAVEN et al., 1970; PAGNOCCA et al., 1996). Formigas-cortadeiras são as formigas atíneas mais estudadas em relação à diversidade de leveduras (BIZARRIA et al., 2022). No entanto, devido à diversidade taxonômica das formigas e a grande variedade de substratos forrageados pelas atíneas, realizamos o maior esforço de amostragem de leveduras neste ambiente até o momento, abrangendo quatro das cinco fungiculturas praticadas por formigas cultivadoras de fungos. Nossos resultados indicam que *Saccharomycetales* é a principal ordem encontrada nesse ambiente, e que o jardim de fungo é um ambiente rico que abriga comunidades distintas de leveduras, mesmo considerando colônias de formigas da mesma espécie.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Amostragem de jardins de fungos

Para avaliar a comunidade de leveduras em jardins de fungo de formigas atíneas que praticam diferentes fungiculturas, um total de 42 colônias de formigas foram amostradas em quatro locais (Tabela S1). Foram amostrados jardins de fungo da formiga-cortadeira *Acromyrmex coronatus* (n= 10 colônias, Fig. 1A), das formigas neoatíneas não cortadeiras, *Mycetomoellerius tucumanus* (n= 8, Fig. 1B) e *Mycetophylax* sp. (n= 8, Fig. 1C), e das formigas paleoatíneas: *Apterostigma* sp. (n= 2; fungicultura de *Pterulaceae*, fungos coral) e *Mycocepurus goeldii* (n= 14, Fig. 1D). Foram amostrados ninhos de *A. coronatus* que ocorrem em galhos de árvores ou em ninhos rasos no solo, os quais foram abertos com a remoção de material vegetal utilizado pela formiga para cobrir o ninho (com exceção de um ninho que se encontrava dentro de um tronco em decomposição). No caso de jardins de *A. coronatus*, as amostras incluíram o jardim velho e novo de oito colônias e apenas jardim antigo ou novo de outras duas colônias (Tabela S1). Ninhos de *Mycetophylax* sp. foram encontrados em troncos de madeira em decomposição. Ninhos de *M. tucumanus* e *M. goeldii*, foram amostrados por escavação de uma trincheira com cerca de 0,2–1 m de profundidade (de acordo com a profundidade dos jardins) próximo das entradas dos ninhos. Por último, os ninhos de *Apterostigma* sp. foram localizados em barrancos de solo, e portanto, a escavação lateral foi realizada para obtenção do jardim de fungo. Todas as amostras, que incluíram jardins de fungo com formigas operárias e crias, foram transportadas assepticamente, armazenadas em recipientes plásticos estéreis e encaminhadas ao laboratório para isolamento das leveduras.

### 2.2. Isolamento das leveduras

Para obtenção das leveduras de jardins de fungo utilizamos uma abordagem dependente de cultivo, a partir de diluição seriada, suspendendo 1 g de jardim de fungo em solução salina 0,85%, suplementada com 0,05% *Tween 80*. Nos casos de jardins que não atingiram um grama, as suspensões foram ajustadas mantendo as mesmas proporções entre as amostras. As amostras foram agitadas por 5 min e 100 µL de cada

diluição seriada foram espalhados na superfície dos meios *Yeast Malt Agar* (YMA: extrato de levedura 3,0 g L<sup>-1</sup>, extrato de malte 3,0 g L<sup>-1</sup>, peptona 5,0 g L<sup>-1</sup>, dextrose 10 g L<sup>-1</sup> e ágar 15 g L<sup>-1</sup>) e *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA: dextrose 40 g L<sup>-1</sup>; peptona 10 g L<sup>-1</sup> e ágar 15 g L<sup>-1</sup>). Ambos os meios foram suplementados com 150 µg mL<sup>-1</sup> de cloranfenicol, com o pH ajustado para 4,5 (com HCl 0,1 N). O pH das suspensões contendo os jardins de fungo em solução salina foram mensurados com pHmetro (Tecnal, TEC-11).

As placas foram incubadas a 20 °C, no escuro, e monitoradas diariamente para a presença de colônias de levedura com auxílio de estereomicroscópio (Leica, EZ4). O número de UFCs por grama de jardins de fungo foi contabilizado e as leveduras foram isoladas e purificadas em meio *Yeast Peptone Dextrose Agar* (YPD: extrato de levedura 10 g L<sup>-1</sup>, peptona 20 g L<sup>-1</sup>, dextrose 20 g L<sup>-1</sup> e ágar 15 g L<sup>-1</sup>, suplementado com 150 µg mL<sup>-1</sup> de cloranfenicol). As culturas axênicas foram transferidas para tubos inclinados com meio GYMP (extrato de levedura 5,0 g L<sup>-1</sup>, extrato de malte 10 g L<sup>-1</sup>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,0 g L<sup>-1</sup>, dextrose 20 g L<sup>-1</sup> e ágar 15 g L<sup>-1</sup>) e preservadas em glicerol 30% (suspensão de células em solução salina a 0,85%) a -80 °C.

### **2.3. Extração de DNA, amplificação e sequenciamento**

O DNA genômico foi extraído de todos os isolados de leveduras seguindo o protocolo proposto por Sampaio et al. (2001), com alterações nas etapas de incubação e centrifugação. Duas alçadas de leveduras cultivadas em YPD-agar (24–48 h) foram suspensas em 500 µL de tampão de lise estéril (Tris 50 mM, EDTA 50 mM, NaCl 250 mM, SDS 0,3%; pH 8) com esferas de vidro (425–600 µm, Sigma). Os tubos foram agitados em vórtex durante 4 min e incubados por 1 h a 65 °C. Este procedimento foi repetido duas vezes e depois os tubos foram centrifugados a 15.871 × g durante 15 min. Uma quantidade de 400 µL foi transferida para novos microtubos estéreis e mantida a 20 °C.

Para cada isolado, realizamos uma reação em cadeia da polimerase (PCR) por microssatélites (MSP-PCR), seguindo o protocolo proposto por Meyer et al. (1993) com modificações. O DNA foi diluído (1:750 µL) em água ultrapura estéril e MSP-PCR foi realizado em volumes de 25 µL com o oligonucleotídeo sintético (GTG)<sub>5</sub>. As reações incluíram 4 µL dNTPs (1,25 mM cada), 5 µL Tampão 5×, 2 µL 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,5 µL 10 µM (GTG)<sub>5</sub> *primer*, 7,3 µL água estéril ultrapura, 0,2 µL 5U µ L<sup>-1</sup> Taq polimerase, 5

μL DNA diluído (1:750). As condições de MSP-PCR foram as seguintes: 95 °C por 3 min, 40 ciclos a 93 °C por 45 s, 50 °C por 1 min, 72 °C por 1 min e uma etapa de extensão final a 72 °C por 6 min. Os *amplicons* foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,4% (p/v) com tampão TBE (Tris-Borate-EDTA) 0,5% por 3h. DNA *Ladder* 1Kb (Promega) foi usado como marcador de tamanho de referência. Os géis de agarose foram corados com solução GelRed (16 μL 10.000 × GelRed, 0,56 g NaCl, 100 mL H<sub>2</sub>O) e os padrões das bandas foram visualizados sob UV. Pelo menos duas cepas representativas de cada padrão foram selecionadas para *barcoding*, exceto pela ocorrência de *singletons* nas amostras.

Amplificamos a região D1/D2 do gene de RNA ribossômico de subunidade grande (LSU) para as leveduras representativas usando o par de oligonucleotídeos NL1 e NL4 (KURTZMAN; ROBNETT, 1998). As reações de amplificação (volume final de 25 μL) incluíram: 4 μL dNTPs (1,25 mM cada), 5 μL Tampão 5×, 2 μL 25mM MgCl<sub>2</sub>, 1 μL 10 μM NL1 *primer*, 1 μL 10 μM NL4 *primer*, 6,8 μL água estéril ultrapura, 0,2 μL 5U μL<sup>-1</sup> Taq polimerase, 5 μL DNA diluído (1:750). As condições do PCR foram as seguintes: 96 °C por 3 min, 35 ciclos a 96 °C por 30 s, 61 °C por 45 s e uma etapa de extensão final a 72 °C por 1 min. Realizamos a purificação dos *amplicons* com o kit *Wizard™ SV Gel and PCR Clean-Up System*, e a reação de sequenciamento foi realizada usando o kit *BigDye® Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing* (ThermoFisher Scientific), de acordo com os protocolos do fabricante. Em seguida, os *amplicons* foram injetados no sequenciador ABI 3500 Series Genetic Analyzer (ThermoFisher Scientific).

As sequências *forward* e *reverse* foram montadas no *software BioEdit v.7.0.5.3* (HALL, 1999) e depositadas no *GenBank* sob o número de acesso ON493906–ON494016. As sequências foram comparadas com sequências tipo similares depositadas no *GenBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) utilizando análise de BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

## 2.4. Análises filogenéticas

Para determinar o posicionamento filogenético das espécies, os *contigs* foram alinhados às sequências similares no *software MAFFT v.7*. (KATO et al., 2019) em dois conjuntos de dados, para Ascomycetos e Basidiomycetos, utilizando as configurações padrões de alinhamento fornecidas pelo *software*, segundo o tamanho das sequências. As árvores filogenéticas foram reconstruídas da seguinte forma: máxima

verossimilhança (ML-L) com aproximação ultrarrápida *bootstrap*, no IQ-TREE2 (Nguyen et al., 2015), máxima verossimilhança (ML), em RAxML-NG (KOZLOV et al., 2019), e inferência Bayesiana (BI), em MrBayes v .3.2.7 (RONQUIST et al., 2012). Para BI, usamos os recursos fornecidos pelo *CIPRES Science Gateway* (MILLER et al., 2010). O modelo SYM+FQ+I+G4 foi selecionado para ambos os conjuntos de dados usando o critério de informação bayesiano (BIC) gerado no IQ-TREE2 (KALYAANAMOORTHY et al., 2017). Para a reconstrução ML-L, foram definidas 10.000 réplicas para *bootstrap* ultrarrápido com 20.000 iterações. Para a reconstrução ML, foram definidas 1000 réplicas *bootstrap*. Para a reconstrução BI, o método Monte Carlo cadeia de Markov (MCMC) foi realizado na análise até que o desvio padrão das frequências fosse menor que 0,01. Os primeiros 25% das MCMC foram descartadas e a biblioteca *Beagle* foi usada para acelerar a execução das quatro cadeias. As árvores finais foram editadas em *FigTree* v.1.4.3 (RAMBAUT, 2016) e *TreeGraph2* (STÖVER; MÜLLER, 2010), usando a topologia da reconstrução ML-L como árvore de suporte, incluindo os valores dos nós das reconstruções ML e BI (Fig. S1 e S2).

## 2.5. Avaliação do fenótipo killer

As leveduras *Saccharomycotina* recuperadas dos jardins de fungo foram avaliadas para a produção de toxinas *killer*, para elucidar se a frequência dessas leveduras neste substrato está associada à prevalência do fenótipo *killer*. Para tal, os ensaios foram realizados seguindo os protocolos descritos por Crabtree et al. (2019). Um total de 182 isolados de leveduras foram semeados em placas contendo YPD *killer assay* (tampão citrato-fosfato, 0,003% p/v azul de metileno, pH 4,6), previamente semeadas com os isolados sensíveis à toxina *killer*: *Saccharomyces cerevisiae* 1006, *Candida albicans* 12A, *Candida glabrata* Y55, *Pichia* sp. CAY-15 e *Cryptococcus neoformans* HLS3, em um total de 910 interações. As placas foram avaliadas durante 7 dias e fenótipos com zonas de inibição de crescimento ou halo azul nas levedura sensíveis foram considerados positivos para a produção de toxinas. Linhagens produtoras de toxinas: *Barnettozyma californica* e *Wickerhamomyces anomalus* foram utilizadas nos ensaios como controle positivo.



## 2.6. Análise estatística

Para descrever as comunidades de leveduras, índices de diversidade foram calculados usando a função *diversityresult* da biblioteca *BiodiversityR* (KINDT; COE, 2005) e pela função *specpool* da biblioteca *vegan* (OKSANEN et al., 2020). A riqueza de espécies, abundância, índice de *Shannon*, índice de *Simpson*, uniformidade (índice de uniformidade de *Shannon*), estimadores *Bootstrap*, *ACE*, *Chao*, *Jackknife* foram calculados para cada fungicultura. Calculamos curvas de rarefação para riqueza de espécies com a biblioteca “iNEXT” (CHAO et al., 2014; HSIEH et al., 2020) usando dados de abundância de cada fungicultura. Mapas de calor foram utilizados para visualizar as espécies recorrentes dos jardins de fungo. Para tanto, utilizamos o método de Ward como critério de aglomeração para os grupos hierárquicos e a função *hclust* da biblioteca *stats* (R CORE TEAM, 2021). Os dados nos mapas de calor foram padronizados por:  $(x - y) / s$ ; onde: "x" representa a abundância de espécies, "y" a média da abundância das espécies na fungicultura e "s" o desvio padrão da abundância das espécies na fungicultura. Para visualizar as interseções de espécies entre fungiculturas, a função *venn* da biblioteca *venn* (DUSA, 2021) foi utilizada.

Para comparar as fungiculturas, os dados de ocorrências das espécies foram padronizados com a função *decostand* da biblioteca *vegan* (OKSANEN et al., 2020), via método de distância euclidiana (LEGENDRE; GALLAGHER, 2001). Realizamos análises de agrupamento usando a função *hclust* da biblioteca *stats* (R CORE TEAM, 2021), definindo o método UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic average*) como critério de aglomeração para agrupamento hierárquico. O coeficiente de correlação cofenética foi calculado para garantir que o dendrograma representasse um resumo adequado dos dados padronizados para a espécie, utilizando a biblioteca *stats* (R CORE TEAM, 2021). Espécies indicativas das fungiculturas foram identificadas pelos agrupamentos e pelo método *Dufrene-Legendre*, calculada usando a função *indval* da biblioteca *labdsv* (ROBERTS, 2019). Para ordenação, realizamos uma análise *Multidimensional Scaling* (nMDS) não métrica com distâncias Euclidianas e de *Bray-Curtis*, usando a função *metaMDS* da biblioteca *vegan* (OKSANEN et al., 2020) e análise de coordenadas principais (PCoA) com distâncias Euclidianas e *Bray-Curtis*, usando a função *cmdscale* da biblioteca *stats* (R CORE TEAM, 2021). Três conjuntos de dados foram usados em ambos os casos: (i) abundância total, (ii) dados sem *singletons* e (iii) abundância relativa. Para comparação das diferenças entre

fungiculturas, foram utilizados testes de permutação e de variância de análises multivariadas usando a função *permutest* da biblioteca *vegan* (OKSANEN et al., 2020), posterior o cálculo de distâncias dos centróides e medianas com a função *betadisper* (9999 permutações). Todas as análises foram realizadas no *software RStudio* (v. 1.4.1717) (RSTUDIO TEAM, 2021), no R v.4.1.0 (R CORE TEAM, 2021).

### 3. Resultados

#### 3.1. Abundância de leveduras em jardins de fungo e fenótipo *killer*

Obtivemos um total de 946 isolados de leveduras a partir de 50 amostras de jardim de fungo (Tabelas S1 e S2), que correspondem a quatro das cinco fungiculturas praticadas por formigas atíneas. As leveduras foram abundantes em algumas amostras, variando de  $10^4$  a  $10^7$  UFCs por grama de jardim de fungo (Tabela S3). Em quatro amostras, não foi possível recuperar leveduras. A abundância também variou entre jardins de fungo do mesmo tipo de fungicultura (Tabela S3, Material Suplementar 2).

Ao todo 111 espécies distribuídas em 57 gêneros (Tabela S2) foram recuperadas, a maioria pertencente ao filo *Ascomycota* (Fig. 1E), sendo *Saccharomycetales* a ordem mais frequente, seguida de *Tremellales* (*Basidiomycota*, Fig. 1F). *Aureobasidium*, *Candida*, *Papiliotrema*, *Starmerella* e *Sugiyamaella* foram os gêneros mais frequentes (Tabela S2). Possíveis novas espécies foram encontradas, tanto de ascomicetos (n= 23), quanto de basidiomicetos (n= 15).

Em relação às leveduras do subfilo *Sacharomycotina*, apenas 5,2% apresentavam fenótipo *killer* (47 de 910 interações; Fig. 2a, Tabela S4). Dentre os gêneros mais abundantes em jardins de fungo, apenas *Candida* (*C. blattae*, *C. orthopsilosis*, *C. railenensis*, *C. sinolaborantium*; e *Candida* sp. relacionado a *C. temnochilae*) e *Starmerella meliponinorum* tiveram representantes com fenótipo positivo para produção de toxinas *killer* (Tabela S4).

#### 3.2. Cada fungicultura tem um conjunto único de leveduras

Todos os estimadores de diversidade indicam que maiores esforços de amostragem podem aumentar o número de espécies de leveduras recuperadas desse ambiente

(Tabela S3). Os jardins mais ricos foram os de *Mycetophylax* sp., *M. goeldii* e os jardins novos de *A. coronatus* (Fig. 2b, Tabela S3). Apesar da alta diversidade de leveduras, as comunidades são heterogêneas, com baixa uniformidade e alta dissimilaridade (Tabela S3). Os jardins de *Apterostigma* sp. apresentam a menor riqueza e abundância, também confirmada pelos demais estimadores de riqueza e diversidade (Tabela S3), o que pode estar relacionado ao pequeno número amostral de jardins dessa espécie. No geral, apenas amostras de *Apterostigma* sp. e *M. tucumanus* apresentaram curvas de rarefação com tendência de estabilização assintótica, se considerado a extrapolação da amostragem (Fig. 2).

Poucas espécies são compartilhadas entre as fungiculturas (Fig. 3), exceto as comunidades dos jardins velhos e novos de *A. coronatus*, e em alguns casos, entre jardins de *Apterostigma* sp. e *Mycetophylax* sp., que foram amostrados no mesmo local (Tabela S1). Em alguns casos, uma alta incidência de uma espécie particular de levedura foi observada, como foi o caso de *Candida orthopsilosis* e *Starmerella etchellsii* para *A. coronatus*, *Wickerhamomyces ciferrii* para *M. tucumanus*, *Scheffersomyces* sp. para *Mycetophylax* sp., *Sugiyamaella smithiae* para *M. goeldii* e *Kurtzmaniella quercitrusa* para *Apterostigma* sp. (Fig. 4).

Comunidades de leveduras são diferentes mesmo entre jardins de fungos da mesma espécie de formiga (Fig. 5), mesmo considerando análises sem a presença de *singletons* e de abundância relativa (Fig. S3-S5). As análises de ordenação nMDS indicam poucas semelhanças entre as colônias da mesma fungicultura com agrupamentos entre espécies diferentes de formigas, resultados semelhantes foram observados para ordenações PCoA (apesar da baixa representatividade de variância explicada em cada eixo, Fig. S3). A maioria dos agrupamentos entre jardins da mesma fungicultura foi detectada para *A. coronatus* (grupos 5, 7, 9 e 12), *M. tucumanus* (grupo 1) e *M. goeldii* (grupos 10 e 14, Fig. 5a). *Aureobasidium leucospermi*, *Candida orthopsilosis*, *Candida railenensis*, *Candida sinolaborantium*, *Candida* sp. YA59 (relacionada à *C. vriesiae*), *Coniochaeta* sp. YA110, *Hannaella kunmingensis*, *Hyphopichia burtonii*, *Kurtzmaniella quercitrusa*, *Saitozyma podzolica*, *Vexillomyces* sp. YA6, *Wickerhamomyces ciferrii*, *Yamadazyma* sp. YA58 e *Yarrowia lipolytica* foram identificadas como espécies indicadoras para os agrupamentos (ou seja, espécies abundantes em uma fungicultura específica e possivelmente aos substratos/ambiente forrageados pelas formigas; Fig. 5a).

#### 4. Discussão

Os jardins de fungo de formigas atíneas possuem uma comunidade de leveduras diversa e dissimilar, mesmo entre colônias da mesma fungicultura. Inicialmente observadas por Craven et al. (1970), a abundância de leveduras em jardins de atíneas têm sido ocasionalmente exploradas por outros estudos (CARREIRO et al., 1997; MELO et al., 2021; RODRIGUES et al., 2009), e o forrageamento das formigas cultivadoras e a grande amplitude de substratos forrageados (RONQUE et al., 2019; SCHULTZ; BRADY, 2008) possuem um papel na diversidade de leveduras nesse ambiente (BIZARRIA et al., 2022; FISHER et al., 1996). Estudando jardins de formigas derivadas cortadeiras e não cortadeiras de folhas, que foram os mais estudados anteriormente (CRAVEN et al., 1970; MELO et al., 2021; PAGNOCCA et al., 1996, 2008; RODRIGUES et al., 2009), encontramos altas contagens de leveduras (em alguns casos com  $10^7$  UFC g<sup>-1</sup>), o que é esperado devido a maior quantidade de material vegetal forrageado, como previamente identificado em *Atta* sp. (BLANTON; EWEL, 1985; MUELLER, RABELING, 2008). As abundâncias de leveduras observadas em outras fungiculturas, refletem observações em diferentes grupos de insetos, incluindo *Coleoptera*, *Neuroptera*, e outros insetos (NGUYEN et al., 2007; SUH et al., 2005, 2008; URBINA et al., 2013).

Apesar dos jardins de fungo hospedarem uma grande quantidade de leveduras, a estrutura das comunidades é muito diferente, mesmo entre jardins da mesma fungicultura. Essa dissimilaridade pode ser um resultado do nicho ecológico da espécie de formiga, em função da sua distribuição geográfica, escolhas de forrageamento, e espécie de fungo cultivado, o que também foi observado para a diversidade de fungos filamentosos (RODRIGUES et al., 2011). A influência do nicho ecológico pode particularmente ser mais importante para formigas paleoatíneas, que coletam uma ampla variedade de substratos como fezes e carcaças de artrópodes, pedaços de madeira e galhos, néctar e sementes, e que cultivam uma grande variedade de fungos *Leucocoprinus* spp. e *Myrmecopterula* spp. (DE FINE LICHT; BOOMSMA, 2010; LEAL-DUTRA et al., 2020; RONQUE et al., 2019; SCHULTZ; BRADY, 2008). Por outro lado, essa influência também pode afetar mesmo formigas neoatíneas, que utilizam diferentes substratos vegetais em grande quantidade para o cultivo de diferentes espécies de *Leucoagaricus* spp. (SCHULTZ; BRADY, 2008; SCHULTZ et al., 2015).

Apenas em quatro das cinquenta amostras de jardins de fungo, não foram recuperadas leveduras. Observações semelhantes também foram documentadas por Rodrigues et al. (2009) estudando jardins de fungo da formiga-cortadeira *Atta texana*. Acreditamos que a ausência de leveduras em alguns jardins de fungo possa ser resultado da competição microbiana no jardim, ou no meio de cultivo durante o isolamento, especialmente em casos onde fungos filamentosos de crescimento rápido estavam presentes, pois dificultam o isolamento de demais taxa. Assim como em outras observações no mutualismo de formigas atíneas (BIZARRIA et al., 2022), *Saccharomycetales* foi a ordem mais frequente de leveduras; e Ascomicetos foram mais frequentemente recuperados que Basidiomicetos. Futuramente, esforços para elucidar a ocorrência de leveduras por técnicas que permitam o acesso da comunidade não cultivável, ou abordagens mais sensíveis, como a reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) e o sequenciamento de próxima geração (NGS), poderão fornecer avanços importantes na detecção e quantificação de leveduras específicas na matriz dos jardins de fungo.

Apenas algumas espécies de leveduras são compartilhadas entre diferentes fungiculturas (Fig. 3) e mesmo entre colônias da mesma espécie (Tabela S2). A prevalência de alguns taxa pode revelar sua abundância no ecossistema natural ao qual as formigas estão situadas, devido a transferência de leveduras pelo forrageamento das formigas. Entre as leveduras *Saccharomycetales* algumas espécies são amplamente conhecidas como habitantes de substratos vegetais e insetos, incluindo *Wickerhamiella* spp. (LACHANCE et al 2001, 1998), *Sugiyamaella* spp. (SENA et al., 2017; SHI et al., 2021), e *Yamadazyma* spp. (KURTZMAN et al., 2011). Leveduras basidiomicéticas são usualmente abundantes em diversos substratos, e particularmente em solos (YURKOV et al, 2018), que podem ser fontes de *Trichosporonaceae* e *Sporidiobolales* também encontradas em jardins de fungo. A abundância particular de *Aureobasidium leucospermi* em alguns jardins de *M. goeldii* pode estar associada ao substrato forrageado, uma vez que espécies de *Aureobasidium* são comuns habitantes de madeira (LEE et al., 2017), um substrato comumente forrageados pelas formigas.

A ocorrência única de algumas espécies pode estar associada a sua ocorrência em substratos vegetais e em ambientes visitados e habitados por outros insetos, como *Candida railenensis* em frutos de *Quercus robur* (ISAEVA et al., 2009), *Candida blattae* em intestino de *Corydalus cornutus* (astern dobsonfly) e em uma espécie não identificada de barata (NGUYEN et al., 2007), *Schwanniomyces vanrijiae* em colônias

de *Formica aquilonia* (MAKSIMOVA et al., 2016), *Kurtzmaniella quercitrusa* em flores de *Passiflora edulis* e besouros *Conotelus* sp. (SANTOS et al., 2020), assim como intestino de *Macrotermes bellicosus* (ARREY et al., 2021). Coletivamente, essas ocorrências podem revelar a conexão entre a diversidade de fungos nos jardins e a distribuição natural de leveduras no ecossistema.

Algumas leveduras, conhecidas como *killers* (SOMERS; BEVAN, 1969; WOODS; BEVAN, 1968), produzem toxinas proteicas ou glicoproteicas que são úteis para matar células susceptíveis. As toxinas *killers* podem levar células à morte interferindo na permeabilidade da membrana (MAGLIANI et al., 1997; MARQUINA et al., 2002; SCHMITT; BREINIG, 2006), na síntese de ácidos nucleicos e pela interferência no ciclo celular (SCHMITT et al., 1989, 1996; SCHMITT; REITER, 2008). A ocorrência de leveduras *killers* foi previamente explorada em jardins de formigas (CARREIRO et al., 2002; ROBLEDO-LEAL et al., 2016; RODRIGUES et al., 2009) e em nosso estudo. Encontramos que 5.2% das leveduras *Saccharomycetales* são positivas para o fenótipo *killer*, entretanto, a distribuição real desse fenótipo em leveduras ambientais ainda é elusiva, especialmente o jardim de fungo que foi superficialmente explorado. Uma vez que as toxinas *killer* apresentam condições ótimas de atividade (MAGLIANI et al., 1997; MARQUINA et al., 2002), o método de triagem com meio tamponado com acréscimo de azul de metileno, pode subestimar a ocorrência dessas leveduras. Além disso, outros mecanismos de interferência podem induzir falsos positivos por inibição de isolados sensíveis (SIPICZKI et al., 2020). Futuramente, novos esforços devem ser empregados para identificar os elementos genéticos que codificam as toxinas nas leveduras isoladas de jardins de fungo, além de novos ensaios frente a uma ampla gama de isolados sensíveis e condições para evitar subestimações.

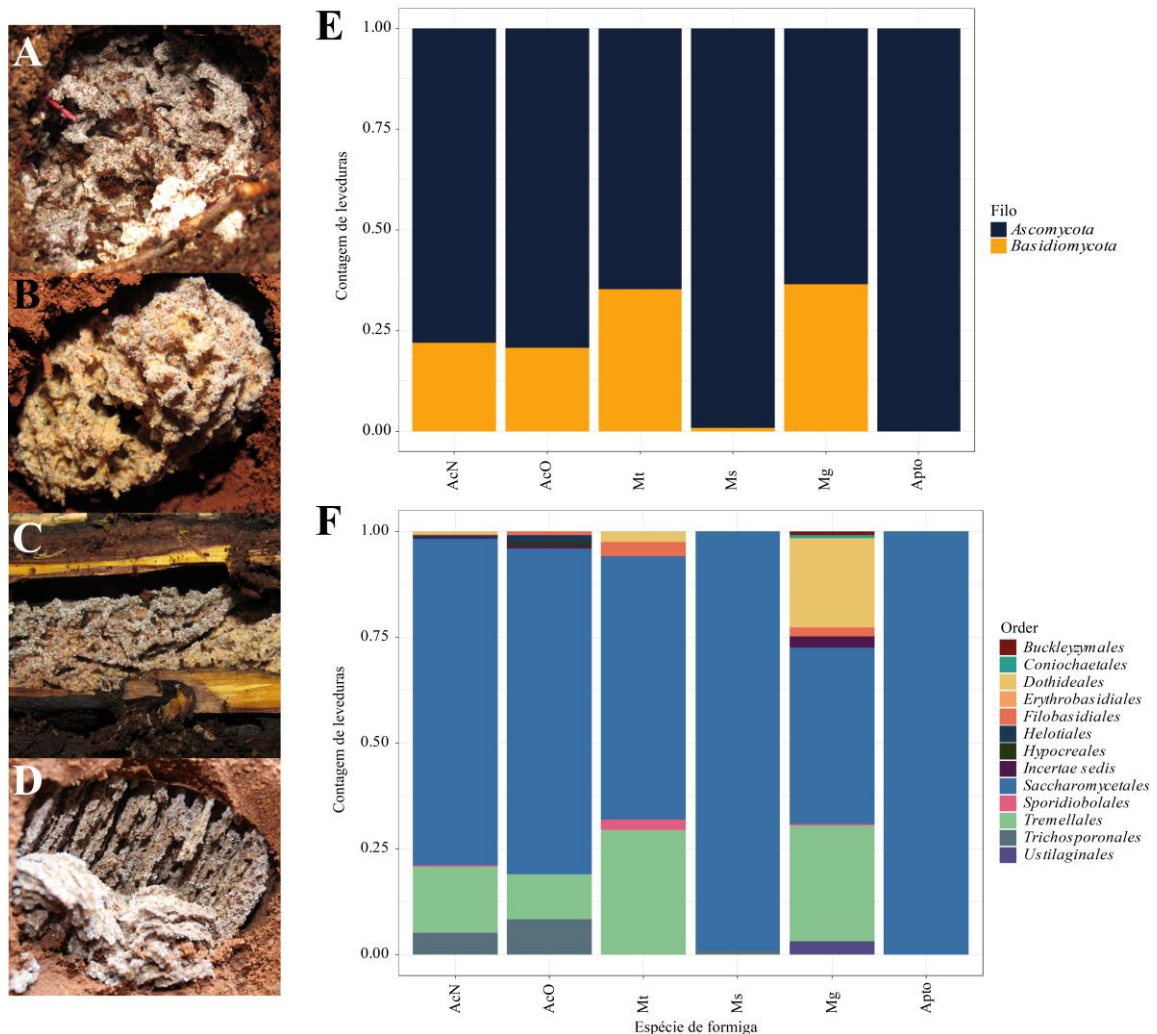
As toxinas *killer* são mecanismos importantes de competição, inibindo células vizinhas sensíveis (BOYNTON, 2019), que pode ser uma importante estratégia quando os recursos se sobrepõem à competidores (CASE; GILPIN, 1974). O rico micobioma de leveduras em jardins de fungo e a manutenção realizada pelas formigas (i.e. no controle do pH, temperatura e umidade do jardim) e os diferentes substratos forrageados, geram um cenário propício para competição por interferência e ocorrência de leveduras *killer*. As observações de Carreiro et al. (2002) devam ser cuidadosamente avaliadas, por se tratarem de observações em colônias de *A. sexdens* mantidas em condições de laboratório, utilizando folhas de *Eucalyptus alba* como substrato. Nossas observações diferem pela origem ambiental das amostras e, apesar de apenas 5,2% das leveduras

avaliadas serem *killers*, nossas observações devem ser revistas frente a uma ampla variedade de leveduras sensíveis e outras condições de cultivo.

Atualmente, o papel ecológico das leveduras nos jardins de fungos somente foi explorado para formigas cortadeiras de folhas (BIZARRIA et al., 2022) e supõe-se que as leveduras contribuam para (i) a degradação da biomassa vegetal no jardim de fungo (ARCURI et al., 2014; CARREIRO, 2000; MELO et al., 2021; MENDES et al., 2012), (ii) a imunidade do jardim contra antagonistas microbianos (RODRIGUES et al., 2009) e (ii) a desintoxicação do ácido galacturônico (ARCURI et al., 2014; MENDES et al., 2012), um subproduto da hidrólise da pectina que afeta a sobrevivência de operárias em *Atta sexdens* (SILVA et al., 2003). Entretanto, todas as hipóteses em relação aos papéis ecológicos das leveduras nesse ambiente carecem de evidências empíricas para suporte das premissas. Em especial, como as toxinas *killer* também afetam outros organismos (CAPPELLI et al., 2014, 2019; PEREZ et al., 2016; POLONELLI; MORACE, 1986), o potencial das leveduras *killer* no jardim, afetando sua imunidade e/ou saúde, ainda é um caminho inexplorado. De forma geral, nossos resultados apoiam que os jardins de fungo (não apenas os de formigas cortadeiras) são uma fonte emergente para estudo de diversidade e ecologia de leveduras.

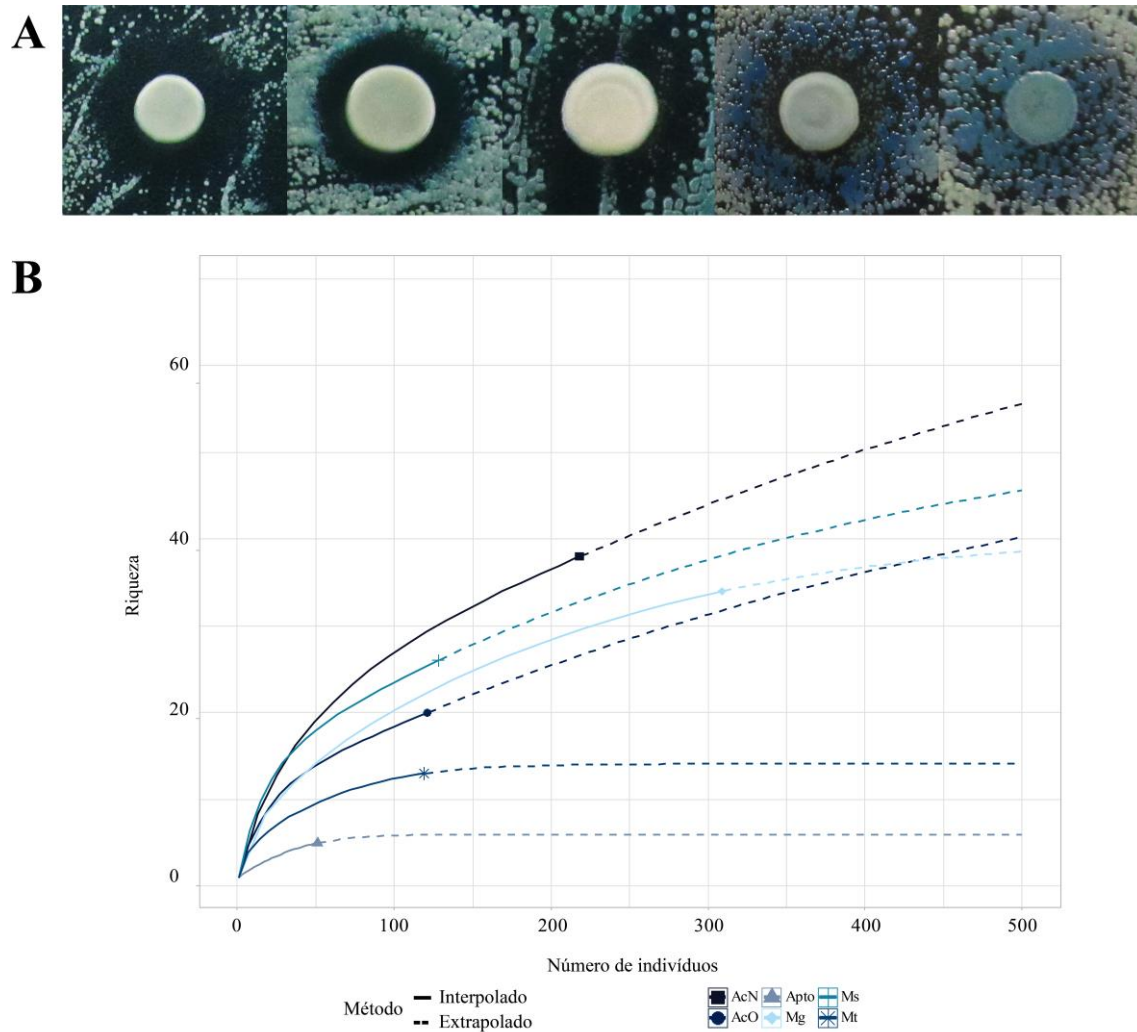
## 5. Figuras

**Figura 1.** *Saccharomycetales* foi a ordem de leveduras mais frequentemente obtida dos jardins de fungo de diferentes espécies de formigas atíneas. As amostras correspondem a jardins de quatro das cinco fungiculturas praticadas por atíneas: **A.** *Acromyrmex coronatus* (formiga-cortadeira de folhas). **B.** *Mycetomoellerius tucumanus* (atínea derivada não cortadeira). **C.** *Mycetophylax* sp. (atínea basal). **D.** *Mycocepurus goeldii* (atínea basal). **E.** Abundância relativa de filos classificados por espécie de formiga. **F.** Abundância relativa de ordens classificadas por espécie de formiga. **AcN.** Jardim novo de *A. coronatus*, **AcO.** Jardim velho de *A. coronatus*, **Mt.** *Mycetomoellerius tucumanus*, **Ms.** *Mycetophylax* sp., **Mg.** *Mycocepurus goeldii*, **Apto.** *Apterostigma* sp. (Fungicultura basal de *Pterulaceae*).

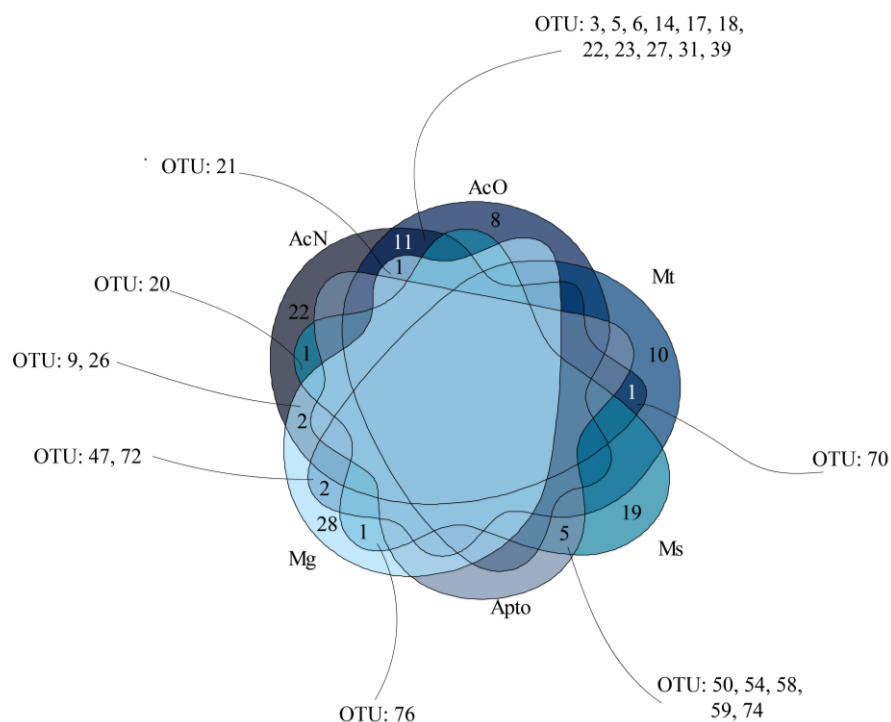




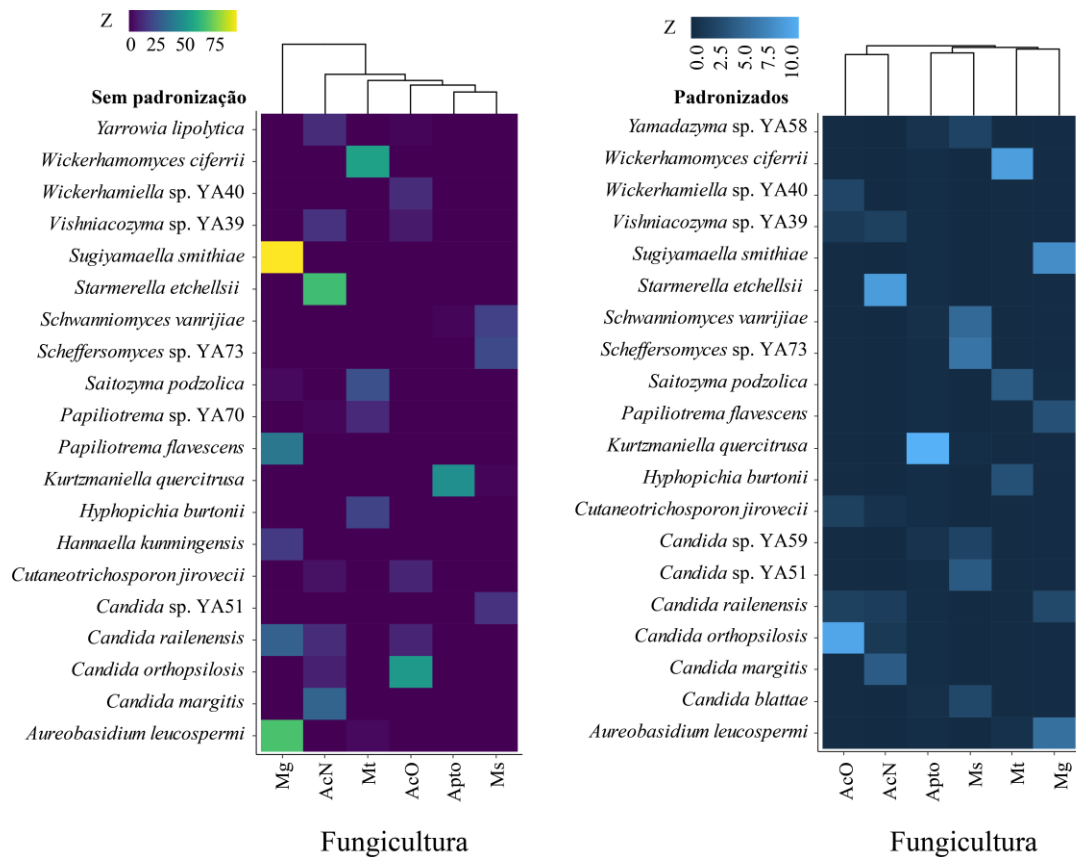
**Figura 2.** Jardins de fungo de formigas atíneas abrigam uma rica comunidade de leveduras. **A.** Fenótipo *killer* observado em algumas leveduras isoladas de jardins de fungo. Da esquerda para a direita: *Candida blattae* (1000), *Candida blattae* (1001), *Candida* sp. (relacionado à *C. temnochilae*), *Candida sinolaborantium*, *Starmerella meliponinorum*. As zonas azuis são células mortas coradas com azul de metileno na presença de toxinas *killer*. **B.** Curvas de rarefação interpoladas e extrapoladas (linhas tracejadas indicam riqueza extrapolada de espécies). **AcN.** Jardim novo de *Acromyrmex coronatus*, **AcO.** Jardim velho de *A. coronatus*, **Mt.** *Mycetomoellerius tucumanus*, **Ms.** *Mycetophylax* sp., **Mg.** *Mycocarpus goeldii*, **Apto.** *Apterostigma* sp. (Fungicultura basal de *Pterulaceae*).



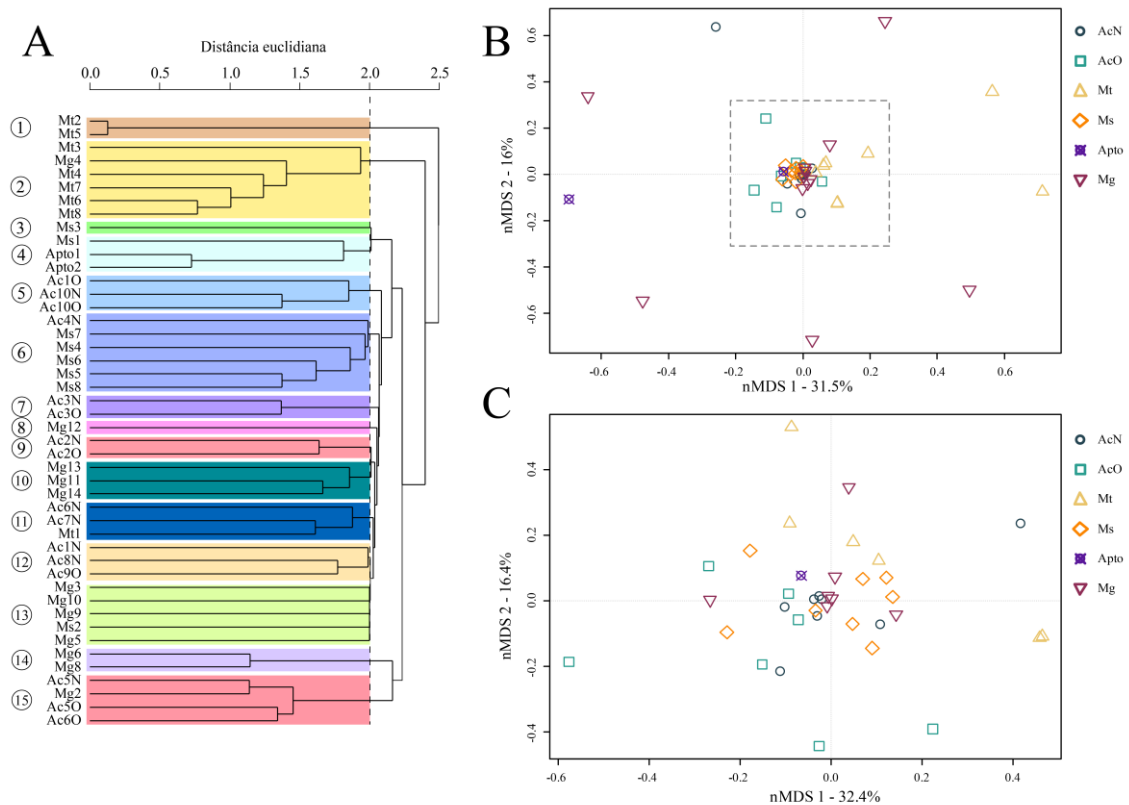
**Figura 3.** Poucas espécies de leveduras são compartilhadas entre fungiculturas. Diagrama de Venn indica a ausência de uma espécie comum entre todas as fungiculturas. A maior similaridade foi observada na fungicultura de *Acromyrmex coronatus*, e entre *Apterostigma* sp. e *Mycetophylax* sp., que foram amostrados no mesmo local, sugerindo um componente geográfico da comunidade recuperada. **AcN.** Jardim novo de *A. coronatus*, **AcO.** Jardim velho de *Acromyrmex coronatus*, **Mt.** *Mycetomoellerius tucumanus*, **Ms.** *Mycetophylax* sp., **Mg.** *Mycocephurus goeldii*, **Apto.** *Apterostigma* sp. (Fungicultura basal de *Pterulaceae*). **OTU3:** *Vishniacozyma alagoana*; **OTU5:** *Papiliotrema* sp.; **OTU6:** *Vexillomyces* sp.; **OTU9:** *Rhodotorula mucilaginosa*; **OTU14:** *Candida ortopsilose*; **OTU17:** *Yarrowia lipolytica*; **OTU18:** *Meyerozyma caribbica*; **OTU20:** *Wickerhamiella occidentalis*; **OTU21:** *Candida railenensis*; **OTU22:** *Hanseniaspora thailandica*; **OTU23:** *Trichosporon insectorum*; **OTU26:** *Trichosporon coremiiforme*; **OTU27:** *Cutaneotrichosporon jirovecii*; **OTU31:** *Hannaella phetchabunensis*; **OTU39:** *Vishniacozyma* sp.; **OTU47:** *Aureobasidium leucospermi*; **OTU50:** *Candida blattae*; **OTU54:** *Kurtzmaniella quercitrusa*; **OTU58:** *Yamadazyma* sp.; **OTU59:** *Candida* sp. (relacionada à *C. vriesiae*); **OTU70:** *Papiliotrema* sp.; **OTU72:** *Saitozyma podzolica*; **OTU74:** *Schwanniomyces vanrijiae*; **OTU76:** *Sugiyamaella carassensis*.



**Figura 4.** Mapas de calor das vinte espécies de leveduras mais recorrentes, agrupadas por espécies de formigas (sem e com padronização dos dados; por:  $(x - y) / s$ ; onde: "x" representa a abundância de espécies, "y" a média da abundância das espécies na fungicultura e "s" o desvio padrão da abundância das espécies na fungicultura). Apesar das diferenças observadas nos agrupamentos das fungiculturas, poucas diferenças foram observadas nos mapas de calor padronizados e não padronizados pela média da abundância das espécies. O critério de agrupamento de Ward foi aplicado para o agrupamento de espécies de formigas. **AcN.** Jardim novo de *Acromyrmex coronatus*, **AcO.** Jardim velho de *A. coronatus*, **Mt.** *Mycetomoellerius tucumanus*, **Ms.** *Mycetophylax* sp., **Mg.** *Mycocephurus goeldii*, **Apto.** *Apterostigma* sp. (Fungicultura basal de *Pterulaceae*).



**Figura 5.** As comunidades de leveduras são dissimilares entre colônias da mesma fungicultura. **A.** Critério UPGMA formam agrupamentos entre colônias de formigas de diferentes fungiculturas, exceto por alguns grupos formados por *Acromyrmex coronatus* (grupos 5, 7, 9 e 12), *Mycetomoellerius tucumanus* (grupo 1) e *Mycocepurus goeldii* (grupo 10). A maioria dos agrupamentos é compartilhada entre colônias de diferentes fungiculturas. As seguintes espécies foram consideradas indicativas para os grupos ( $P < 0,05$ ): *Hyphopichia burtonii* e *Wickerhamomyces ciferrii* (grupo 1), *Saitozyma podzolica* (grupo 2), *Candida sinolaborantium*, *Candida* sp. (relacionada à *C. vriesiae*) e *Yamadazyma* sp. (grupo 3), *Kurtzmaniella quercitrusa* (grupo 4), *Candida orthopsilosis* e *Yarrowia lipolytica* (grupo 7), *Coniochaeta* sp. (grupo 8), *Vexillomyces* sp. (grupo 9), *Hannaella kunmingensis* (grupo 10), *Aureobasidium leucospermi* (grupo 14) e *Candida railenensis* (grupo 15). **B.** A análise de ordenação nMDS (estresse: 0,155) mostra a dissimilaridade entre colônias da mesma fungicultura. Homogeneidade multivariada foi observada para ambas as distâncias (para ambos, mediana e centroide;  $P > 0,05$ ), entretanto, nenhuma evidência suporta diferenças entre fungiculturas ( $P = 0,19$ ). **C.** Uma segunda análise de ordenação nMDS (estresse: 0,228) foi realizada excluindo as colônias mais diferentes (mantendo as colônias do quadrado tracejado na primeira ordenação). **AcN.** Jardim novo de *Acromyrmex coronatus*, **AcO.** Jardim velho de *A. coronatus*, **Mt.** *Mycetomoellerius tucumanus*, **Ms.** *Mycetophylax* sp., **Mg.** *Mycocepurus goeldii*, **Apto.** *Apterostigma* sp. (Fungicultura basal de *Pterulaceae*).



## Capítulo 2

### Leveduras killer em jardins de atíneas: mineração de genoma em busca de novas toxinas<sup>2</sup>

#### 1. Introdução

Algumas leveduras e fungos leveduriformes secretam toxinas antifúngicas, levando à morte de células vizinhas suscetíveis (CASTILLO; CIFUENTES, 1994; GOLUBEV et al. 2002; KOLTIN; DAY, 1976; PFEIFFER et al. 2004; WOOD; BEVAN, 1968), com potencial notável como novos antifúngicos no combate à infecções fúngicas (ALLEN et al., 2011; FREDERICKS et al., 2021b; KABIR et al., 2011; PEREZ et al., 2016; POLONELLI et al., 1991; VALZANO et al., 2016). Essas toxinas proteicas tem uma faixa de atividade variando de estreita até ampla, afetando células de espécies filogeneticamente próximas ou distantes (BOYNTON, 2019; GOLUBEV, 1998; GOLUBEV, 2006). Desde a sua primeira descrição em *Saccharomyces cerevisiae* na década de 60 (BEVAN; MAKOWER, 1963; MAKOWER; BEVAN, 1963; WOOD; BEVAN, 1968), as leveduras foram classificadas de acordo com seus fenótipos como produtoras de toxinas (*killers*), resistentes (não produzindo toxinas, mas imune a elas) e suscetíveis (vulnerável à toxina). As toxinas *killers* podem ser codificadas por diferentes elementos genéticos, incluindo regiões cromossômicas, satélites de RNA de fita dupla (dsRNA) de totivírus dsRNA ou elementos lineares de DNA de fita dupla (dsDNA) (BEVAN et al., 1973; MAGLIANI et al., 1997; ROWLEY, 2017; SOMERS; BEVAN, 1969). A frequência desses elementos em diferentes linhagens de *Saccharomycotina* e fungos leveduriformes, no entanto, ainda é pouco esclarecida, e apenas em casos singulares observou-se que as toxinas de leveduras *Saccharomyces* codificadas por dsRNA possuem homólogos genômicos em diferentes linhagens de leveduras *Saccharomycotina* (FREDERICKS et al. 2021a).

Diferentes mecanismos de ação foram relatados para toxinas *killer*, incluindo ruptura de membranas citoplasmáticas (BREINIG et al., 2002; MARTINAC et al., 1990), inibição da síntese de DNA e síntese de  $\beta$ -glucano (SCHMITT et al., 1996;

---

<sup>2</sup> Trabalho realizado na Universidade de Idaho (EUA), sob a modalidade de apoio ‘Bolsas no Exterior - Estágio de Pesquisa – Doutorado’, processo FAPESP n. 2021/09980-4.

YAMAMOTO et al., 1986), fragmentação e dano de ácidos nucleicos (KAST et al., 2014; KLASSEN et al., 2004), retardo do ciclo celular (KLASSEN et al., 2004; SCHMITT et al., 1996) e morte celular programada (ou seja, apoptose; BREINIG et al., 2006). Devido aos seus mecanismos de inibição, as toxinas *killer* são frequentemente investigadas como antimicrobianos naturais, promissores contra fungos patógenos de humanos e de plantas (ALLEN et al., 2011; FREDERICKS et al., 2021b; PEREZ et al., 2016; VALZANO et al., 2016; WALKER et al., 1995).

É frequentemente relatado que toxinas *killer* desempenham um papel importante na competição de interferência entre espécies (BUSSEY et al., 1988; GANTER; STARMER, 1992; PIECZYNSKA et al., 2016), especialmente em ambientes que reforçam a interação entre células produtores de toxinas e suscetíveis (BOYNTON et al., 2019). Além disso, sabe-se que a coexistência dos diferentes fenótipos é afetada por parâmetros ambientais, incluindo disponibilidade de nutrientes (PINTAR; STARMER, 2003; WLOCH-SALAMON et al., 2008), densidade celular (GREIG; TRAVISANO, 2008; VADASZ et al., 2003), pH e temperatura (BUSSEY et al., 1988; MAGLIANI et al., 1997; MCBRIDE et al., 2008). Na natureza, a prevalência de leveduras *killer* geralmente varia em torno de 6,12 a 23,5% (ABRANCHES et al., 1997; CHANG et al., 2015; PHILLISKIRK; YOUNG, 1975; PIECZYNSKA et al., 2013; STUMM et al., 1977; TRINDADE et al., 2002; WOJCIK; KORDOWSKA-WIATER, 2015).

As implicações ecológicas das toxinas *killer* em comunidades de leveduras são frequentemente exploradas por interações cruzadas entre produtores de toxinas e células suscetíveis (BOYNTON, 2019; WOOD; BEVAN, 1968). Até o momento, apenas alguns relatos indicaram a presença de leveduras *killer* associadas a organismos modelo (como é o caso de *Drosophila* spp., BUSER et al., 2021; STARMER et al., 1987). Comunidades de leveduras *killer* foram inicialmente relatadas no ambiente de formigas cultivadoras de fungos (Hymenoptera: tribo Attini: subtribo Attina, doravante denominadas 'formigas atíneas') (BIZARRIA et. al., 2023a; CARREIRO et al., 2002; ROBLEDO-LEAL et al., 2016), principalmente associados a jardins de fungo, corpos de formigas e folhas coletadas pelas formigas (fenótipos *killer* variando de 3,3 a 13,4% das interações, BIZARRIA et. al., 2023a; CARREIRO et al., 2002; ROBLEDO-LEAL et al., 2016). As formigas atíneas estabeleceram um mutualismo obrigatório com fungos basidiomicetos há cerca de 55-65 milhões de anos (BRANSTETTER et al., 2017; NYGAARD et al., 2016; SCHULTZ; BRADY, 2008), usando fungos como fonte primária de alimento para seus colônias (i.e., fungos das famílias *Agaricaceae* e

*Pterulaceae*; MÖLLER, 1893; SCHULTZ; BRADY, 2008; WEBER, 1972). Esses insetos praticam diferentes fungiculturas (ou seja, de acordo com seus cultivares e os substratos forrageados; SCHULTZ; BRADY, 2008; SCHULTZ et al., 2015), sendo considerado um sistema modelo para estudo de mutualismos. Além disso, as formigas atíneas são agentes ecológicos nos Neotrópicos, sendo herbívoros dominantes (CORRÊA et al., 2010; MEYER et al., 2011), promovendo a ciclagem de nutrientes e a fertilidade do solo (FARJI-BRENER; WERENKRAUT, 2015; STERNBERG et al., 2007) e em alguns casos, a dispersão e germinação de sementes (LEAL; OLIVEIRA, 1998).

O comportamento de forrageamento das formigas atíneas agrega uma grande e complexa comunidade de leveduras nos jardins de fungo (ARCURI et al., 2014; BIZARRIA et al., 2022; CRAVEN et al., 1970; FISHER et al., 1996; PAGNOCCA et al., 2008). Os jardins são, em teoria, um ambiente adequado para a ocorrência de leveduras *killer*, com alto nível de açúcares disponíveis (SILVA et al., 2003, 2006) e grande densidade de microrganismos (BIZARRIA et al., 2023a; CRAVEN et al., 1970; FISHER et al., 1996; PAGNOCCA et al., 1996; RODRIGUES et al., 2008), elementos-chave para a competição de espécies, que é um dos pilares do uso ecológico das toxinas *killers*. Nesse estudo, realizamos uma avaliação abrangente do fenótipo *killer* em diferentes isolados de *Saccharomycotina* associados às fungiculturas de formigas atíneas. As avaliações foram realizadas frente a um grande conjunto de isolados sensíveis, incluindo patógenos humanos, que frequentemente são resistentes a medicamentos antifúngicos (por exemplo, *Candida albicans*, *C. glabrata* e *C. auris*, BOHNER et al., 2022; BONGOMIN et al., 2017; FISHER et al., 2022; SANGLARD et al., 1998). Os resultados revelam que os jardins hospedam diferentes leveduras *killer*, de atividade específica ou ampla, mas com ausência de elementos citoplasmáticos para codificação. Em especial, um isolado da espécie *Candida sinolaborantium*, que produz toxinas com ação de amplo espectro, incluindo patógenos, foi submetido a sequenciamento genômico e mineração por regiões semelhantes às toxinas. Constatamos via expressão heteróloga uma nova toxina com similaridade a toxinas previamente descritas e codificadas por satélites de dsRNA. No geral, demonstramos que os jardins de fungo podem hospedar leveduras produtoras de toxinas *killer*, úteis para uso futuro como novos antifúngicos de interesse clínico.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Origem das leveduras e análise filogenética

Para investigar a prevalência de leveduras *killer* nos jardins de fungo, uma coleção representativa de leveduras previamente caracterizada por Bizarria et al. (2023a) foi examinada (Tabela S1). A identificação das leveduras envolveu a análise de amplificação de microssatélite (MSP-PCR) e sequenciamento da região D1/D2 do gene que codifica o RNA ribossômico da subunidade maior (LSU; Bizarria et al., 2023a). Seleccionamos um total de 180 leveduras para os ensaios de produção de toxinas *killer*. As leveduras são provenientes de jardins de fungo da formiga-cortadeira *Acromyrmex coronatus* (n = 91), da formiga não cortadeira *Mycetomoellerius tucumanus* (n = 13), das formigas basais *Mycetophylax* aff. *auritus* (n = 42) e *Mycocepurus goeldii* (n = 25), que cultivam fungos *Agaricaceae*; e *Apterostigma goniodes* (n = 9), que cultiva fungos *Pterulaceae*.

Para avaliar a relação filogenética entre os isolados de leveduras, realizamos uma análise com espécies representativas e seus parentes mais próximos (sequências utilizadas na análise filogenética estão listadas na Tabela S2). As sequências foram alinhadas com MAFFT v.7. (KATO et al., 2019) e modelos de substituição de nucleotídeos foram gerados usando o critério de informação Bayesiano (BIC), no IQ-TREE2. SYM+I+G4 foi selecionado como o modelo de substituição de nucleotídeos. Árvores filogenéticas de máxima verossimilhança (ML) foram reconstruídas no IQTREE2 (NGUYEN et al., 2015), com 10.000 réplicas de *bootstrap* ultrarrápido (árvore concluída após 262 iterações, LogL: -14980,772). As árvores finais foram editadas no FigTree v.1.4.3 (RAMBAUT, 2016).

### 2.2. Ensaios de determinação do fenótipo killer

Para confirmar a produção de toxinas *killer*, avaliamos os fenótipos por ensaios de co-cultivo, seguindo os procedimentos descritos em Crabtree et al. (2019). Os 180 isolados de leveduras foram semeados em placas de ágar YPD 4.6 dextrose “*killer assay*” (extrato de levedura 10 g L<sup>-1</sup>, peptona 20 g L<sup>-1</sup>, dextrose 20 g L<sup>-1</sup>, citrato de sódio 29,9 g L<sup>-1</sup>, suplementado com 0,003% p/v azul de metileno e pH ajustado para 4,6 com HCl). As placas foram previamente semeadas com suspensão de 10<sup>5</sup> células mL<sup>-1</sup> com um dos 49 isolados selecionados como suscetíveis (i.e., de jardins de fungo e de fontes



não relacionadas ao ambiente das formigas atíneas, Tabela S3), em um total de 8.820 interações. Nove isolados que codificam toxinas conhecidas foram utilizados como controle positivo. As leveduras também foram avaliadas em um segundo ensaio frente a 21 leveduras patogênicas como isolados suscetíveis (Tabela S3). A produção de toxinas foi registrada após cinco dias de incubação a temperatura ambiente, seja por uma zona de inibição ou por coloração de células sensíveis com azul de metileno. A severidade da atividade foi pontuada de acordo com Fredericks et al. (2021a), pela zona de inibição com ou sem halo azul de metileno, ou por halo de azul de metileno forte ou fraco sem zona de inibição.

### 2.3. Extração de elementos codificantes de dsRNA

Para determinar se os isolados de leveduras codificam toxinas via elementos de dsRNA, realizamos a extração dos elementos de dsRNA de todas as leveduras, seguindo os protocolos estabelecidos por Okada et al. (2015), com modificações. As leveduras foram cultivadas em caldo de levedura-peptona-dextrose (YPD: extrato de levedura 10 g L<sup>-1</sup>, peptona 20 g L<sup>-1</sup>, dextrose 20 g L<sup>-1</sup>), centrifugadas a 3000 × g por 5 min, e o caldo foi removido por aspiração. As células foram suspensas em água estéril, centrifugadas a 8.000 × g e a água aspirada. Um total de 450 µL de 2× *Sodium chloride-Tris-EDTA buffer* (STE: NaCl 200 mM; Tris-HCl 20 mM, pH 8,0; EDTA 30 mM) e 0,5 µL de β-Mercaptoetanol foram adicionados e as células rompidas em um disruptor celular (*Digital Disruptor Genie, Scientific Industries*) por 3 min a 3.000 rpm. Em seguida, 50 µL de solução de 10% dodecil sulfato de sódio (SDS) e 350 µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) foram adicionados aos extratos brutos, que foram homogeneizados e centrifugados a 10.000 × g para 5 min. Em seguida, 500 µL de sobrenadante foram misturados com etanol absoluto (5:1), e o volume final de 600 µL foi transferido para colunas de celulose (*i.e.*, 0,05 g de celulose D em tubo de 0,6 mL perfurado e colocado em tubos coletores de 2 mL). As colunas foram centrifugadas a 10.000 × g durante 30 s e o fluxo foi descartado. Em seguida, 350 µL de tampão de lavagem (1× STE contendo 16% v/v de etanol absoluto) foram adicionados à coluna e centrifugados a 10.000 × g por 30 s, seguido pelo descarte por fluxo.

As colunas foram transferidas para um novo tubo coletor, adicionando-se 350 µL de 1× STE e centrifugados a 10.000 × g por 30 s. A fração eluída foi coletada e 1 mL de etanol absoluto com 40 µL de 3 M acetato de sódio aquoso (pH 5,2) foi adicionado. Os

tubos foram invertidos 10 vezes e centrifugados a  $20.000 \times g$  durante 15 min. A mistura de etanol foi então aspirada sem perturbar o pellet precipitado, que foi então seco em temperatura ambiente e suspenso em 15  $\mu\text{L}$  de água estéril. A presença dos elementos foi examinada por eletroforese em gel de agarose TAE 0,8%, com brometo de etídio (carregando 5  $\mu\text{L}$  de cada amostra), a 130 V por 30 min em tampão 1% TAE. Como referência de peso molecular, foi utilizado um DNA *Ladder* de 1 kb. O isolado YJM1307 de *Saccharomyces cerevisiae*, conhecido por hospedar totivírus e satélites de dsRNA foi usado como controle positivo.

#### **2.4. Extração de plasmídeos lineares de dsDNA**

Para determinar se plasmídeos lineares de dsDNA codificam as toxinas *killer*, extraímos os elementos de dsDNA das leveduras caracterizadas como *killers*. As culturas foram cultivadas em YPD e 200  $\mu\text{L}$  foram centrifugados a  $3000 \times g$  durante 5 min, removendo o caldo por aspiração. As células de levedura foram suspensas em 10  $\mu\text{L}$  de solução de Zymolase (5% de Tris-HCl 50 mM, pH 8; 10% de EDTA 5 mM e 85% de água estéril) e 7,2  $\mu\text{L}$  de 10 mg  $\text{mL}^{-1}$  de Zymolase (*United States Biological Life Sciences*, Swampscott, MA), seguidas por incubação a 30°C por 1 h. Após a incubação, 1  $\mu\text{L}$  de 10% SDS e 3  $\mu\text{L}$  de proteinase K (*New England Biolabs*, Ipswich, MA) foram adicionados à suspensão, seguido de uma incubação de 1 h a 65 °C. Após a incubação, foram adicionados 5  $\mu\text{L}$  de *loading dye* e a suspensão foi centrifugada a  $3000 \times g$  por 5 min. A presença de plasmídeos de dsDNA foi examinada em eletroforese em gel de agarose 0,6% TAE, com brometo de etídio (carregando 10  $\mu\text{L}$  de cada amostra), a 130 V por 60 min em tampão 1% TAE. Como referência de peso molecular, foi utilizada um DNA *Ladder* de 1 kb. Isolados das espécies *Kluyveromyces lactis* AWJ137 e *Pichia acaciae* NRRL Y-18665, conhecidas por hospedarem plasmídeos de dsDNA, foram utilizadas como controle positivo.

#### **2.5. Precipitação e estabilidade das toxinas**

Para investigar a estabilidade das toxinas produzidas por *C. sinolaborantium* LESF 1467, este foi cultivado em 10 mL de meio YPD (pH 4,6) a 25 °C com agitação de 150 rpm. A cultura foi centrifugada a  $3.100 \times g$  por 5 min e filtrada com membrana de 0,45

µm. Ao extrato filtrado (2,5 mL) foi adicionado 1:1 etanol absoluto e, após misturar por inversão, o extrato foi incubado em gelo por 24 h. A mistura foi centrifugada a  $20.000 \times g$  por 20 min, o sobrenadante foi removido e as proteínas precipitadas foram suspensas em 10 µL de YPD 4.6. Para confirmar a atividade dos precipitados, 4 µL das proteínas suspensas foram utilizadas em ensaios *killer* contra o isolado suscetível *Kodamaea ohmeri* LESF 1474 devido ao fenótipo de fácil distinção. Células do isolado *C. sinolaborantium* LESF 1467 foram utilizadas como controle positivo do fenótipo *killer*, nas mesmas condições. Para avaliar a termoestabilidade, as toxinas precipitadas foram incubadas a temperatura ambiente ou inativadas por calor a 60 e 98 °C, durante 2 min, e a atividade conferida frente a *K. ohmeri* LESF 1474. A atividade *killer* também foi avaliada em relação à estabilidade em diferentes pHs, em ensaios de fenótipo *killer* contra o isolado LESF 1474, com pH do meio ajustado para 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5 e 6 com HCl 12N, e diferentes temperaturas, 17, 20, 25, 30 e 35°C. A área de atividade da toxina foi medida em cm<sup>2</sup> após quatro dias com ImageJ 1.53t (SCHNEIDER et al., 2018).

## **2.6. Produção de pseudohifas de *Kodamaea ohmeri* frente às toxinas**

Observou-se que a levedura *Kodamaea ohmeri* LESF 1474 produz pseudohifas na presença de toxinas de *C. sinolaborantium* LESF 1467 e seus precipitados. Esse fenótipo também foi confirmado em uma estirpe patogênica de *K. ohmeri*. O fenótipo foi investigado submetendo o isolado LESF 1474 à leveduras *killer* canônicas (*i.e.*, que produzem toxinas conhecidas), bem como frente a cultura tipo de *C. sinolaborantium* CBS 9940. Esse fenótipo foi investigado coletando as células na zona de interação e suspendendo-as em PBS 1× (NaCl 8 g L<sup>-1</sup>; KCl 0,2 g L<sup>-1</sup>; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,44 g L<sup>-1</sup>; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,24 g L<sup>-1</sup>; suplementado com 0,05% de Tween 20, e com pH ajustado para 7,4 com HCl) e observando a morfologia celular em microscópio.

Células de brotamento e pseudo-hifas nas zonas de interação foram contabilizadas com uma câmara de Neubauer e comparadas com o crescimento axênico de *K. ohmeri* LESF 1474 nas mesmas condições de ensaio. Para confirmar a sobrevivência das células na interação, estas foram recuperadas, suspensas em PBS 1×, a concentração ajustada para  $10^3$  células mL<sup>-1</sup>, e 100 µL foram semeados em YPD. As colônias foram contabilizadas após três dias de incubação, em temperatura ambiente.

Uma vez que um fenótipo semelhante foi confirmado na presença de *S. cerevisiae* DSM-70459 que secreta a toxina *killer* Klus (codificada por elementos de

dsRNA), as avaliações microscópicas também foram conduzidas na presença desse isolado. Para confirmar que o fenótipo está relacionado à produção da toxina, a linhagem DSM-70459 foi submetida ao processo de cura, para perda do satélite de dsRNA, crescendo em meio contendo 5.0  $\mu\text{M}$  de ciclohexamida durante sete dias. Células curadas foram avaliadas para perda do fenótipo *killer* e dos satélites codificadores da toxina, conforme descrito anteriormente.

## **2.7. Extração de gDNA, sequenciamento genômico, montagem e anotação**

Uma vez que *C. sinolaborantium* LESF 1467 mostrou uma ampla gama de atividade em relação à diferentes isolados suscetíveis, mas nenhum elemento citoplasmático foi encontrado, este isolado foi investigado quanto à presença de regiões de codificação genômica homólogas às toxinas *killer* conhecidas. A levedura foi crescida em caldo YPD, as células recuperadas por centrifugação ( $3000 \times g$  por 5 min), lavadas e suspensas em 500  $\mu\text{L}$  de tampão TE (10 mM Tris-Cl; 0,1 mM EDTA, pH 8). As células foram recuperadas por centrifugação, como descrito anteriormente, e o pellet foi ressuspenso por agitação. Foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de tampão de lise (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8, 1mM EDTA pH 8) e aproximadamente 300  $\mu\text{L}$  de esferas de vidro. Um volume de 200  $\mu\text{L}$  de solução fenol-clorofórmio-álcool isoamílico foi adicionado e a amostra submetida a agitação por 3 min a 3000 rpm (Disruptor Genie). Um total de 200  $\mu\text{L}$  de tampão TE foi adicionado, seguido por centrifugação por 5 min a  $21000 \times g$ . A camada aquosa superior foi transferida para um novo microtubo e 1 mL de etanol absoluto foi adicionado e misturado por inversão. O tubo foi centrifugado por 3 min a  $21000 \times g$ . O sobrenadante foi removido e o pellet suspenso em 400  $\mu\text{L}$  de tampão TE. Em seguida, 30  $\mu\text{L}$  de DNase-free RNase A foram adicionados e a solução misturada e incubada a 5 min a 37 °C. Dez  $\mu\text{L}$  de acetato de amônio 4M e 1 mL de etanol absoluto foram adicionados, misturados por inversão, e centrifugados por 3 min a  $21000 \times g$ . O sobrenadante foi descartado e o pellet foi seco por aproximadamente 20 min em temperatura ambiente. O DNA genômico foi suspenso em 100  $\mu\text{L}$  de tampão TE, e acondicionado a -20 °C.

O genoma foi sequenciado por *Illumina NextSeq 550*, por método *paired-end*, e as bibliotecas criadas com *kit Illumina DNA Prep kit for WGS* (<https://www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/nextera-dna-flex.html>). A análise inicial da qualidade e as etapas de limpeza foram realizadas

com fastp v0.20.1 (CHEN et al., 2018). O genoma foi montado com SPAdes v3.15.5 (GUREVICH et al., 2013) com múltiplos k-mers (21,31,41,51,61,71,81). O *software blobtools* v3.5.2 (LAETSCH; BLAXTER, 2017) foi usado para verificar contaminantes. Resumidamente, *blastn* 2.13.0+ (ALTSCHUL et al., 1990) foi usado para pesquisar estruturas em todo o banco de dados ncbi nt; minimap2 v.2.24-r1122 (LI, 2018) e samtools v.1.13 (LI et al., 2009) foram usados para obter cobertura de sequenciamento. A visualização *blobtools* foi usada para averiguar os resultados. As regiões de rDNA e ITS foram anotadas com ITSx v.1.3 (BENGTSSON-PALME et al., 2013), que foi comparado com um *amplicon* previamente submetido ao NCBI para este isolado (código de ON493969) como parte das etapas de verificação de contaminação. As estatísticas de montagem final foram obtidas com QUAST v.5.2.0 (BANKEVICH et al., 2012). A integridade foi verificada usando BUSCO 5.4.4 (SEPPEY; MANNI; ZDOBNOV, 2019) e *saccharomycetes\_odb10* (2.137 BUSCOs). A predição genética foi realizada usando Braker v2.1.6 (BRÜNA et al., 2021) [inclui Augustus v3.4.0 (STANKE; MORGENSTERN, 2005), ProtHint v2.6.0 e GeneMark-ES 4.71 (LOMSADZE et al. 2005)] com métodos do OrthoDB 10 (KRIVENTSEVA et al., 2019). O InterProScan v5.60 foi usado para anotação funcional de proteínas previstas.

## 2.8. Mineração do genoma por regiões semelhantes à toxinas

Para busca de toxinas presentes em regiões cromossômicas, foi realizada uma busca nas proteínas preditas com BLASTP 2.9.0, utilizando uma coleção de toxinas conhecidas. Foram selecionados os resultados com alinhamentos superiores a 100 e com *e-values* superiores a 0.13. Um *open reading frame* com similaridade à toxina Klus (28% de identidade, com 151 aa de comprimento do alinhamento e um *e-value* de 9,34E-08) foi encontrada e selecionada para a continuidade das análises. Para amplificação da região de interesse, foram desenhados *primers* no *software* Primer3web v. 4.1.0 (<https://primer3.ut.ee/>), sendo esses oligonucleotídeos os que franqueiam a região (961F: 5'-TTAACGACTTTCGTCTTCGCTATCC-3' e 961R: 5'-ATTGAGATCAGTGGCCTGTGTAGC-3') e *primers nested* (961NF: 5'-CGATCACCTAGCCCAAATGC-3' e 961NR: 5'-AAAGTGTTGGCCAAGGACACG-3'). As reações de amplificação incluíram 25 µL do *Phusion High Fidelity Master Mix* (New England Biolabs, Ipswich, MA), 2,5 µL 10 µM *foward primer*, 2,5 µL 10 µM *reverse primer*, 17,5 µL água estéril ultrapura, 2,5 µL

DNA diluído (1:9). As condições de amplificação foram as seguintes: 98 °C por 3 min, 30 ciclos a 98 °C por 30 s, 63 °C por 30 s, 72 °C por 30 s e uma etapa de extensão final a 72 °C por 5 min. Reações de *nested*-PCR foram realizadas nas mesmas condições, substituindo os *primers* e utilizando como DNA o produto de amplificação anterior (diluído 1:9). *Amplicons* foram sequenciados para confirmação da identidade da região escolhida.

## 2.9. Estrutura da região codificadora e análise comparativa

A partir da confirmação da região codificadora semelhante à toxina Klus, a sequência foi submetida à previsão de estrutura proteica, a partir da sequência de aminoácidos, no *software* AlphaFold2 (JUMPER et al., 2021), seguindo os padrões de predição do *software*. As coordenadas obtidas da estrutura predita foram comparadas com um banco de dados de estruturas conhecidas, pelo algoritmo *Dali* (<http://ekhidna.biocenter.helsinki.fi/dali>), com um método de alinhamento por matriz de distância. Uma busca por sequências similares no NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) foi realizada, sendo os resultados filtrados por *e-value* (menor que 0), identidade (acima de 30%) e comprimento do alinhamento (acima de 109). As sequências de proteínas foram alinhadas com *Clustal Omega* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), sendo o alinhamento composto de 87 sequências e 383 posições. Modelos de substituição de aminoácidos foram gerados (ambos reversíveis e não reversíveis) de acordo com o critério de informação Bayesiano (BIC), sendo WAG+R4 o modelo escolhido. Árvores filogenéticas de máxima verossimilhança (ML) foram reconstruídas no *IQTREE2* (NGUYEN et al., 2015), com 10.000 réplicas de *bootstrap* ultrarrápido (árvore concluída após 204 iterações, LogL: -18876.056). As árvores finais foram editadas no *FigTree* v.1.4.3 (RAMBAUT, 2016).

## 2.10. Clonagem e transformação em *Escherichia coli*

Para estudo da região codificadora foi adicionado ao *amplicon* um terminal "TA", para tal as reações incluíram: 1 µL Taq polimerase, 19 µL do produto de PCR, 1 µL de 10 µM dNTPs, 5 µL do tampão da 10×, e 24 µL de água estéril ultrapura. A reação foi incubada a 72 °C durante 20 min. Para a clonagem, foi utilizado o kit *pCR™8/GW/TOPO™ TA Cloning* (Invitrogen, Waltham, MA), adicionando 1 µL dos

*amplicons* com adição de terminais TA, 0,25 µL de solução salina do kit, 0,25 µL do vetor *pCR<sup>TM</sup>8/GW/TOPO<sup>TM</sup>*, a reação foi incubada a temperatura ambiente por 2 h, seguidas da adição de 25 µL de células de *Escherichia coli* competentes (*One-Shot TOP10 Competent Cells, Invitrogen*, Waltham, MA). A reação foi mantida em gelo por 30 min, seguido por choque térmico a 42 °C por 30 s e, em seguida, banho de gelo por 2 min. Posteriormente, foi adicionado 250 µL de meio *Super Optimal broth* (SOC: 20 g L<sup>-1</sup> Triptona, 5 g L<sup>-1</sup> Extrato de levedura, 0,58 g L<sup>-1</sup> NaCl, 0,19 g L<sup>-1</sup> KCl, 2,03 g L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 1,20 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>, e 3,6 g L<sup>-1</sup> dextrose) pré-aquecido a 37 °C, o inóculo foi incubado a 37 °C por 1 h, e 250 µL foram plaqueados em meio *Luria bertani* (LB: 10 g L<sup>-1</sup> de Triptona, 5 g L<sup>-1</sup> de Extrato de levedura, 10 g L<sup>-1</sup> de NaCl, e 15 g L<sup>-1</sup> de ágar) suplementado com 100 µg mL<sup>-1</sup> de Espectinomicina. Os plasmídeos foram extraídos com o kit *High-Speed Mini Plasmid* (IBI Scientific, Dubuque, IA), seguindo os procedimentos recomendados pelo fabricante.

Devido a diversidade transcricional dos códons CUG-Leu em algumas leveduras (KRASSOWSKI et al., 2018), os vetores contendo o gene de interesse foram submetidos a mutações direcionadas (SDM: *Site-Directed Mutagenesis*), devido a presença de um códon CUG na posição 556 da sequência de DNA (posição 186 na sequência proteica). Desse modo, os mutantes consistem nas alternativas identificadas para CUG-Leu em outras leveduras, sendo denominadas L186A e L186S, sendo L o aminoácido original, 186 a posição, “A” a mutação para Ala, e “S” a mutação para Ser. Para obtenção dos mutantes, foram desenhados *primers* ancorando a posição 186, sendo: 961GCCG: 5'-CAGCTGTGGCGCGAACCATAGCGGG-3' (*forward* 1); 961TCG: 5'-CAGCTGTGGCtcgAACCATAGCGGG-3' (*forward* 2), e 961SNM: 5'-AGTCCCGCAGGCCAATCC-3' (*reverse*). As reações de amplificação incluíram 12,5 µL do *Phusion High Fidelity Master Mix*, 1 µL 10 µM *foward primer*, 1 µL 10 µM *reverse primer*, 9,5 µL água estéril ultrapura, 1 µL DNA diluído (1:9). As condições de amplificação foram as seguintes: 98 °C por 30 min, 25 ciclos a 98 °C por 5 s, 67 °C por 10 s, 72 °C por 50 s e uma etapa de extensão final a 72 °C por 5 min. Para remover o DNA inicial (que não contém a mutação) da reação, um tratamento com DpnI foi conduzido: 22 µL do produto de PCR, 2 µL DpnI, 3 µL *CutSmart buffer*, 3 µL água ultrapura estéril, a reação foi incubada a 37 °C durante 1 dia. Para adição dos 5'-P e 3'-OH, um tratamento com PNK foi conduzido: 30 µL do produto tratado, 5 µL tampão do PNK, 1 µL PNK, 5 µL 10 mM ATP, 1 µL 0,1 M DTT, 8 µL de água ultrapura estéril. As reações foram incubadas por 30 min a 37 °C, e inativadas a 65 °C por 10 min. O

produto foi purificado utilizando o kit *Monarch DNA & PCR Cleanup* (New England Biolabs, Ipswich, MA), seguindo os protocolos do fabricante. Para re-ligamento dos plasmídeos, a seguinte reação foi realizada: 2 µL do produto purificado, 1 µL T4 DNA ligase, 2 µL 10× tampão de ligação, 15 µL de água ultrapura estéril. A reação foi incubada por 2 h em temperatura ambiente e, em seguida, 25 µL de células de *E. coli* competentes (*One-Shot TOP10 Competent Cells*, Invitrogen, Waltham, MA) foram adicionadas. As culturas transformadas foram selecionadas em LB suplementado com 100 µg mL<sup>-1</sup> de Espectinomicina, os plasmídeos extraídos com o kit *High-Speed Mini Plasmid* (IBI Scientific, Dubuque, IA), e as mutações conferidas por sequenciamento (*ELIM Biopharmaceuticals*, Hayward, CA).

Os vetores foram submetidos a uma recombinação *Gateway*<sup>TM</sup>, dos vetores em pCR<sup>TM</sup>8 para pAG306-GAL-ccdB. Para a recombinação, a reação conduzida com 0,5 µL do vetor de origem, 0,5 µL do vetor de destino, 1 µL de água estéril ultrapura e 0,5 µL de LR Clonase II. A reação foi incubada por 4 h em temperatura ambiente, seguido da adição de 0,25 µL de Proteinase K e incubação a 37 °C por 10 min. Por fim, foi dado seguimento a transformação como anteriormente, e culturas transformadas selecionadas em LB suplementado com 100 µg mL<sup>-1</sup> de cloranfenicol e ampicilina.

## **2.11. Transformação e expressão em *Saccharomyces cerevisiae***

Para transformação das leveduras, o vetor contendo o gene de interesse foi linealizado com a enzima NcoI cortando no gene Ura3, seguido pela inativação da enzima a 65 °C por 30 min. O produto foi purificado utilizando o kit *Monarch DNA & PCR Cleanup* (New England Biolabs, Ipswich, MA), seguindo os protocolos do fabricante. Células de *S. cerevisiae* cry1 foram crescidas em YPD até obtenção de densidade óptica de 1,3, em seguida, as células foram lavadas com água estéril e suspensas em 10 mL de tampão TE com adição de 100 mM LiAc, incubadas a 30 °C por 30 min sob 130 rpm de agitação. As células foram centrifugadas a 1500 × g por 5 min a 4 °C e suspensas em 5 mL de 1M sorbitol gelado, as células foram então recuperadas por centrifugação e suspensas em 550 µL de 1M sorbitol gelado. Para transformação, 80 µL das células suspensas foram adicionados em 5 a 10 µg dos plasmídeos linearizados e transferidos a cubas de eletroporação. As cubas foram incubadas em gelo por 10 min e pulsadas com *GenePulser* (200 Ω, 1.5kV e 25 µF). Para recuperação das culturas transformadas, as células foram crescidas a 30 °C por 2 dias,



em meio CM-ura (*complete media*: 2.5 g L<sup>-1</sup> da mistura *drop-out* sem Uracila, 1.7 g L<sup>-1</sup> de base de nitrogênio para leveduras YNB, 5 g L<sup>-1</sup> de sulfato de amônio, 20 g L<sup>-1</sup> de dextrose). Para expressão do gene de interesse, ensaios de avaliação de fenótipo *killer* foram conduzidos em YPGal (extrato de levedura 10 g L<sup>-1</sup>, peptona 20 g L<sup>-1</sup>, galactose 20 g L<sup>-1</sup>, citrato de sódio 29,9 g L<sup>-1</sup>, suplementado com 0,003% p/v de azul de metileno e pH ajustado para 4,6 com HCl e ágar 15 g L<sup>-1</sup>). *Candida sinolaborantium* LESF 1467 e *S. cerevisiae* cry1 foram utilizadas como controle positivo e negativo da atividade *killer*, respectivamente.

### 3. Resultados

#### 3.1. Jardins de fungos abrigam leveduras *killer*

Um total de 180 isolados de leveduras *Saccharomycotina*, obtidos de jardins de fungo de diferentes espécies de formigas atíneas, foi avaliado quanto à produção de toxinas *killer*. Das 59 espécies de leveduras, 10 (16,95%; Fig. 1) foram capazes de produzir toxinas eficazes contra, pelo menos, um dos isolados suscetíveis avaliados (Fig. 2A), correspondendo a 30 do total de 180 isolados (16,67%, Table S4). *Candida blattae*, *C. sinolaborantium*, *Candida* sp. (relacionada à *C. temnochilae*), *Diutina catenulata*, *Kazachstania spencerorum*, *Kodamaea ohmeri*, *Saccharomycetales* sp. (relacionado à *C. vrieseae*), *Schwanniomyces vanrijiae*, *Wickerhamomyces ciferrii* e *Wickerhamomyces* sp. (relacionada à *W. ciferrii*) foram confirmados como produtores de toxinas. Os fenótipos foram consistentes entre isolados da mesma espécie (Fig. 2A), com exceção dos isolados de *S. vanrijiae*, com uma gama diferente de atividade em relação aos diferentes isolados suscetíveis (Fig. 2A). Leveduras *killer* estavam ausentes apenas nos jardins de *M. goeldii* (Fig. 2B) e apenas 173 das 8.820 (1,96%) interações foram positivas para a produção de toxinas, sendo 24 das 173 (13,87%) das interações positivas observadas entre isolados da mesma fungicultura (Fig. 2C). O isolado *C. sinolaborantium* LESF 1467 foi o que apresentou a maior amplitude de atividade, inibindo 29 dos 49 (59,18%; Tabela S4) isolados suscetíveis (Fig. 2A).

### 3.2. Leveduras *killer* têm atividade contra leveduras patogênicas

Em relação às interações de leveduras *killer* frente às leveduras patogênicas humanas como isolados suscetíveis, 32 dos 180 (17,78%) isolados avaliados foram capazes de produzir toxinas que inibem pelo menos um isolado suscetível (Tabela S5). O isolado *C. sinolaborantium* LESF 1467 foi, novamente, a levedura que apresentou a maior amplitude de atividade, inibindo 10 dos 21 (47,62%; Tabela S5) isolados suscetíveis.

### 3.3. As características das toxinas de *Candida sinolaborantium*

As toxinas secretadas por *C. sinolaborantium* são termossensíveis, sendo inativadas por aquecimento a 60 °C e 98 °C (Fig. 3A). A inibição de *K. ohmeri* pelas toxinas secretadas por *C. sinolaborantium* apresenta um pH ótimo entre 4,6 e 5 (Fig. 3B, Tabela S7), e 20°C (Fig. 3C, Tabela S6), que são consistentes com a natureza das toxinas *killer*, perdendo atividade em pHs neutros (por exemplo, nenhuma inibição foi observada no pH 6,0). Foi observado aumento de pseudohifas de *K. ohmeri* na presença das toxinas de *C. sinolaborantium*, quando comparado com as culturas axênicas (Fig. 4A-C, Tabela S7). Pseudohifas também foram observadas na presença de toxinas precipitadas por etanol (Fig. 3A). Células nas zonas de interação apresentaram sobrevivência reduzida, quando comparadas às células em culturas axênicas (Fig. 4C, Tabela S7). Em relação à toxina *Klus*, o mesmo fenótipo de aumento de produção de pseudohifas foi observado para *S. cerevisiae* DSM-70459, que secreta a toxina *Klus*, sendo que a cura da levedura levou à perda do fenótipo (Fig. 4A), porém sem perda significativa na sobrevivência das células (Tabela S7).

### 3.4. Montagem e anotação do genoma

O resultado do processo de limpeza resultou em 4,203,746 *reads* (Tabela S8). Já o processo de montagem resultou em uma completude de cerca de 98%, conteúdo GC de 48.76% e uma N50 de 155,979 (Tabela S8). Foram preditos 5,951 genes codificadores de proteínas (Tabela S8).

### 3.5. Expressão heteróloga do gene de interesse

Os resultados da mineração por toxinas no genoma de *C. sinolaborantium* indica a presença de um *open reading frame* que se assemelha estruturalmente à toxina Klus (que é codificada por satélites citoplasmáticos de dsRNA em *S. cerevisiae*). Os resultados obtidos pelo Dali, indicam que a estrutura predita possui similaridades com outras proteínas antifúngicas (i.e. Ginkbilobin), lectinas (i.e. proteínas que se ligam a carboidratos) e à toxina SMK (i.e. uma toxina *killer* com estruturas conhecidas por cristalografia, secretada pela levedura halotolerante *Millerozyma farinosa*; KASHIWAGI et al., 1997). As comparações obtidas frente ao conjunto de dados do NCBI indicam que o gene estudado possui similaridade com outras regiões encontradas em diversos grupos de fungos (Fig. 5A-C), inclusive com outras espécies de leveduras do subfilo *Saccharomycotina*. A expressão heteróloga da região de interesse induzida por galactose resultou nos mesmos fenótipos de formação de pseudohifa por *K. ohmeri* (independente das mutações realizadas no códon CUG, Fig. 5D). Os fenótipos não foram observados em meio YPD, que não induz a expressão da região de interesse. Desse modo, os resultados indicam a presença de uma região cromossômica com regiões similares em outras linhagens *Saccharomycotina*, e que mantém os fenótipos esperados na expressão de uma nova toxina com similaridade estrutural à SMK e Klus, denominamos a nova toxina como Ksino, por ter sido descoberta em *Candida sinolaborantium*.

## 4. Discussão

Leveduras *killer* foram relatadas em diferentes substratos, incluindo plantas (ABRANCHES et al., 1997; GANTER; STARMER, 1992; GOLUBEV et al., 2002; RAMÍREZ et al., 2020a; STUMM et al., 1977; TRINDADE et al., 2002, WOJCIK; KORDOWSKA-WIATER, 2015), insetos (ABRANCHES et al., 1997; CARREIRO et al., 2002), solo (STUMM et al., 1977; VITAL et al., 2002; WOJCIK; KORDOWSKA-WIATER, 2015) e ambientes aquáticos (HUA et al., 2010; LIBKIND et al., 2004). Embora as leveduras *killer* sejam difundidas no ambiente, sua ecologia ainda é um campo em desenvolvimento (i.e., especialmente para leveduras não industriais). A identificação e caracterização de toxinas *killer* estão limitadas pela escolha de um isolado susceptível e de condições utilizadas para avaliação da produção das toxinas.

Avaliando as leveduras obtidas de jardins de fungo frente os diferentes isolados suscetíveis, encontramos que a prevalência de leveduras *killer* em diferentes espécies de formigas é de 16,67%, que se assemelha às prevalências em outros ambientes (com taxas entre 6,12 a 23,5%; ABRANCHES et al., 1997; CHANG et al., 2015; PHILLISKIRK; YOUNG, 1975; PIECZYNSKA et al., 2013; STUMM et al., 1977; TRINDADE et al., 2002; WOJCIK E KORDOWSKA-WIATER, 2015).

A ausência de leveduras *killer* nos jardins de fungo de *M. goeldii* pode ser devida à falta de isolados suscetíveis ou das condições de cultivo estabelecidas. O fenótipo *killer* foi presente em maior abundância quando linhagens não associadas ao mesmo jardim de fungo foram avaliadas, o que apoia a coexistência de fenótipos de leveduras *killer* e sensível no mesmo ambiente. Esta coexistência pode ser devida à presença de microhabitats que permitem a separação espacial dos diferentes fenótipos (como anteriormente presumido por STARMER et al., 1987; ABRANCHES et al., 1997; TRINDADE et al., 2002 em outros ambientes), embora um estudo aprofundado da arquitetura de jardins de fungo ainda se faz necessário.

Leveduras *killer* associadas a jardins de fungos são frequentemente encontradas associadas aos substratos forrageados, como plantas, insetos e solo (BIZARRIA et al., 2022), de modo que as formigas contribuem para a transferência das leveduras entre ambientes, e por consequência, também as leveduras *killer*. *Candida blattae* foi previamente isolada do intestino de insetos (i.e., *Corydalus cornutus* e uma barata não identificada; NGUYEN et al., 2007). *Candida sinolaborantium* também foi previamente recuperada do intestino de besouros *Amphix laevigatus* (Endomychidae), larvas de besouros *Cerambycidae* e madeira de decomposição (SUH et al., 2005; GUAMÁN-BURNEO et al., 2015). *Schwanniomyces vanrijiae* foi previamente recuperado de maçãs e colônias de formigas *Formica aquilonia* (MADBOULY et al., 2020; MAKSIMOVA et al., 2016). *Kazachstania spencerorum* nom. inv. foi originalmente isolada de solo (Basiônimo: *Saccharomyces spencerorum* nom. inv., VAUGHAN-MARTINI, 1995; KURTZMAN; ROBNETT, 2003). *Kodamaea ohmeri* foi encontrada associada a insetos e plantas, incluindo ao besouro das colmeias *Aethina tumida* (AMOS et al., 2019), besouros *Nitidulidae* e *Erotylidae* (SUH; BLACKWELL, 2005) e folhas de *Hibiscus rosa-sinensis* (FUENTEFRÍA et al., 2006).

Em relação ao fenótipo *killer*, as espécies que encontramos em jardins de formigas atíneas também foram identificadas em outros substratos como leveduras *killers*, incluindo *Diutina catenulata* (Basiônimo: *Candida catenulata*) em leite cru e queijo

(FUENTEFRÍA et al., 2007; STOPIGLIA et al., 2014), *K. ohmeri* de folhas de *H. rosa-sinensis* e em uma colônia de uma espécie não identificada de formiga (tratada com a sinonímia *Pichia ohmeri* em COELHO et al., 2009; FUENTEFRÍA et al., 2006, 2008), *Schwanniomyces vanrijiae* em maçãs (MADBOULY et al., 2020) e *Wickerhamomyces ciferrii* em fruto de *Coumarouna punctata* (tratada com basônimo *Hansenula ciferrii* em GOLUBEV et al., 2015; NOMOTO et al., 1984). A exceção foi *Kazachstania spencerorum* que, pelo que sabemos, é o primeiro relato de um fenótipo *killer* para esta espécie, que foi previamente relatado em espécies relacionadas *K. exigua* e *K. unispora* (PEREZ et al., 2016; STOPIGLIA et al., 2014).

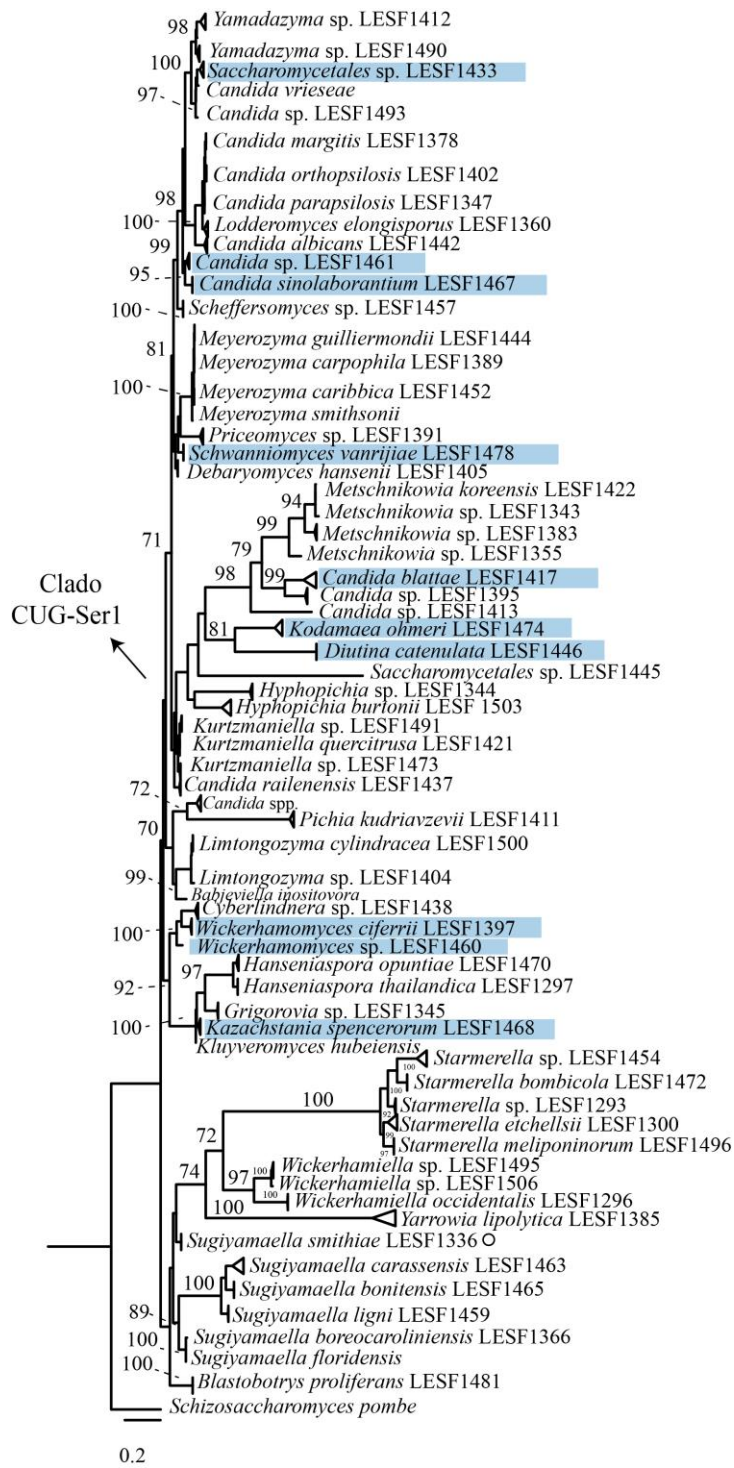
Nossa busca por elementos codificadores de toxinas *killer* indicou que nenhum dos 180 isolados de leveduras *Saccharomycotina* apresentava elementos citoplasmáticos codificadores de toxinas, e que as leveduras *killer* encontradas, secretam toxinas codificadas por elementos cromossômicos. Dentre os exemplos de leveduras com elementos citoplasmáticos de dsRNA se encontram: *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia kluyveri*, *Saccharomyces* spp., *Torulaspora delbrueckii* e *Zygosaccharomyces bailii* (IVANNIKOVA et al., 2006, 2007; NAUMOV et al., 2005, 2009; RAMÍREZ et al., 2015, 2020b; RODRÍGUEZ-COUSIÑO et al., 2017; SCHMITT; NEUHAUSEN, 1994; ZORG et al., 1988); com elementos citoplasmáticos de dsDNA: linhagens dos gêneros *Babjevia*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Millerozyma* e *Pichia* (KLASSEN et al., 2017; KLASSEN; MEINHARDT, 2007; SCHAFFRATH et al., 2018); e por regiões cromossômicas: linhagens dos gêneros *Cyberlindnera*, *Kluyveromyces*, *Lachancea*, *Millerozyma*, *Pichia*, *Saccharomyces* e *Tetrapirisporea* (GOTO et al., 1990; KLASSEN et al., 2017; MAGLIANI et al., 1997; SCHAFFRATH et al., 2018). Nossos dados indicam que os modelos de codificação de dsRNA e dsDNA são escassos entre alguns grupos de leveduras. A frequência de elementos dsRNA pode estar associada a 10% da população de *Saccharomyces* spp. (PIECZYNSKA et al., 2013), mas a distribuição de elementos citoplasmáticos em outros grupos de leveduras não foi extensivamente investigada e sua frequência pode ser distribuída ou restrita a clados específicos do subfiló. A maior parte das leveduras que estudamos, pertence ao clado CUG-Ser1 (SHEN et al., 2018), sendo que alguns membros desse clado apresentam uma alteração na tradução de códons CUG, de leucinas para serinas. Tal mudança foi sugerida como um fator para mitigar a associação com vírus (KRASSOWSKI et al., 2018), que dependem do maquinário do hospedeiro para encapsulamento e polimerização. A ausência de elementos citoplasmáticos nessas leveduras pode estar associada a esse

fator, uma vez que os satélites dependem e estão ancorados em um *Totivirus*. Entretanto, um estudo exploratório de diferentes linhagens desse clado se faz necessário para excluir qualquer associação e natureza estocástica.

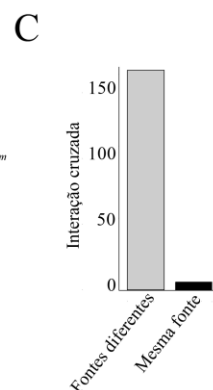
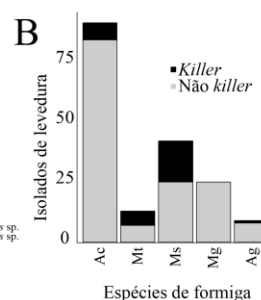
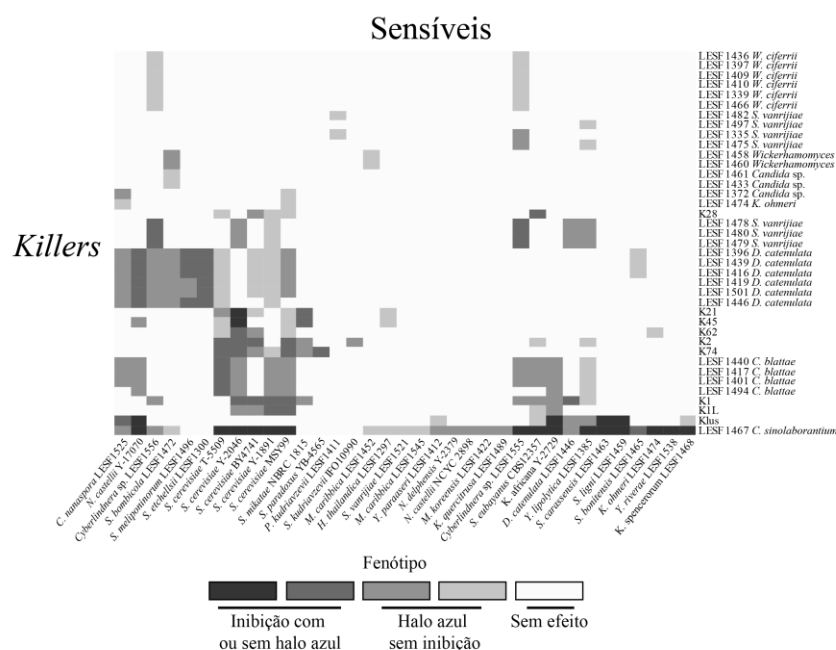
Nosso estudo indica que os jardins de fungo de formigas atíneas abrigam leveduras *killer*, semelhante às descobertas anteriores de Carreiro et al. (2002) em colônias de laboratório de *Atta sexdens*. As diferentes linhagens de *Saccharomycotina* diferem em atividade *killer* dos nove isolados de leveduras que produzem toxinas conhecidas e por não hospedarem elementos citoplasmáticos codificantes. Em particular, as toxinas secretadas por *C. sinolaborantium* tiveram ampla gama de atividade, inclusive frente a patógenos humanos infecciosos (por exemplo, *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. auris*), o que pode indicar a presença de múltiplas toxinas. A técnica aplicada de mineração identificou uma região genômica codificadora para uma nova toxina (a que denominamos Ksino), que se assemelha estruturalmente e em atividade à toxina Klus, codificada por elementos citoplasmáticos de dsRNA. Tal descoberta pode, no futuro, contribuir para o entendimento da evolução de toxinas *killer* em leveduras. Complementarmente, foi observado que a presença das toxinas estimula a produção de pseudohifa por *K. ohmeri*. O bloqueio de atividade *killer* pela produção de pseudohifa pode decorrer de alterações de organização na parede celular, dos receptores das toxinas, ou até uma resposta induzida por estresse. Apesar disso, os mecanismos de resistência e de atividade celular nesse caso ainda demandam mais estudos. Futuros estudos devem elucidar tais mecanismos, que são de interesse, uma vez que muitas leveduras patogênicas de humanos apresentam tal morfologia de crescimento. De modo geral, nosso estudo apresenta (i) uma exploração da diversidade e ecologia de leveduras *killer* em um ambiente ainda pouco explorado, apesar de sua importância, e (ii) pela descobrimento de uma nova toxina codificada cromossalmente, via mineração genômica, e que futuramente deve ser alvo de estudos de seu uso como agentes terapêuticos contra doenças fúngicas.

## 5. Figuras

**Figura 1.** Posicionamento filogenético das linhagens provenientes de jardins de formigas atíneas, pelo método de Máxima Verossimilhança. Espécies destacadas em azul foram identificadas como produtoras de toxinas *killer* frente a pelo menos uma linhagem de levedura suscetível avaliada. O clado CUG-Ser1 foi destacado na filogenia e *Schizosaccharomyces pombe* foi posicionada como grupo externo.

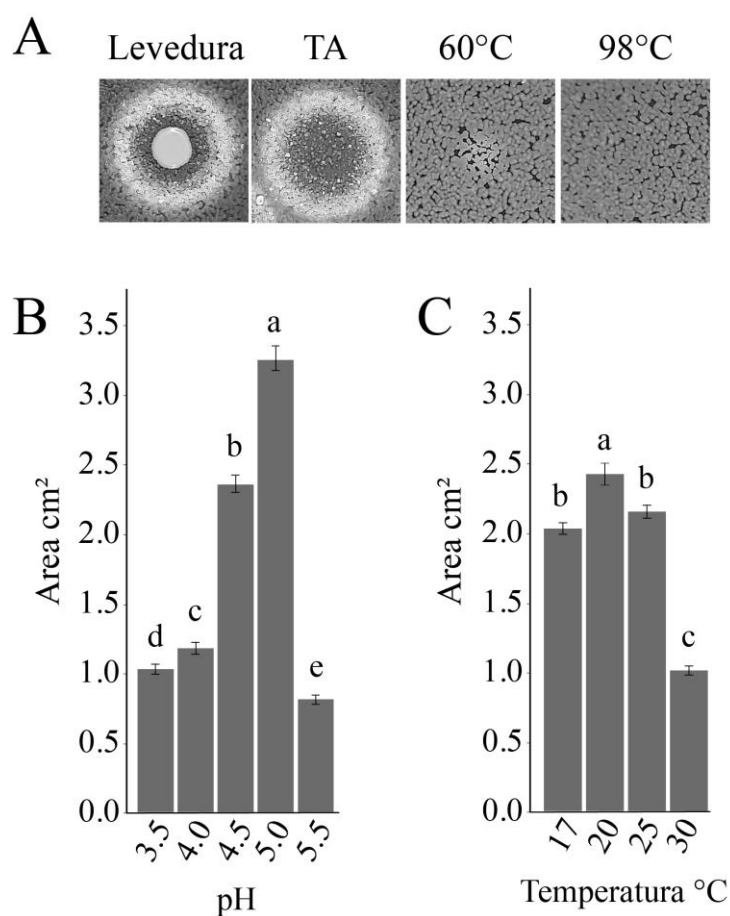


A

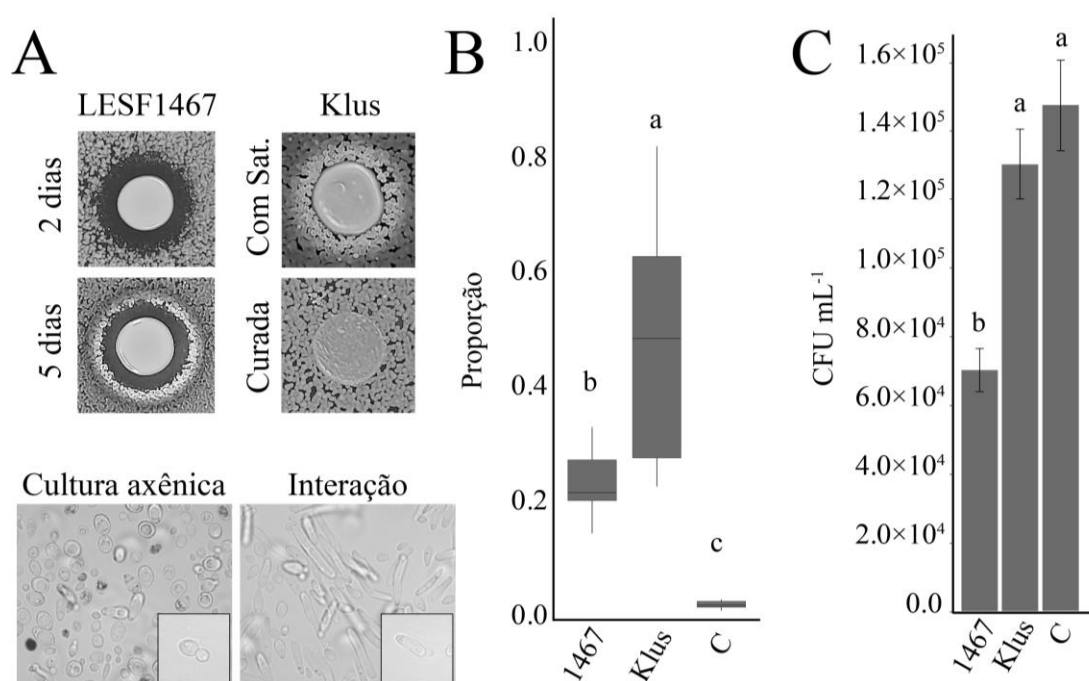




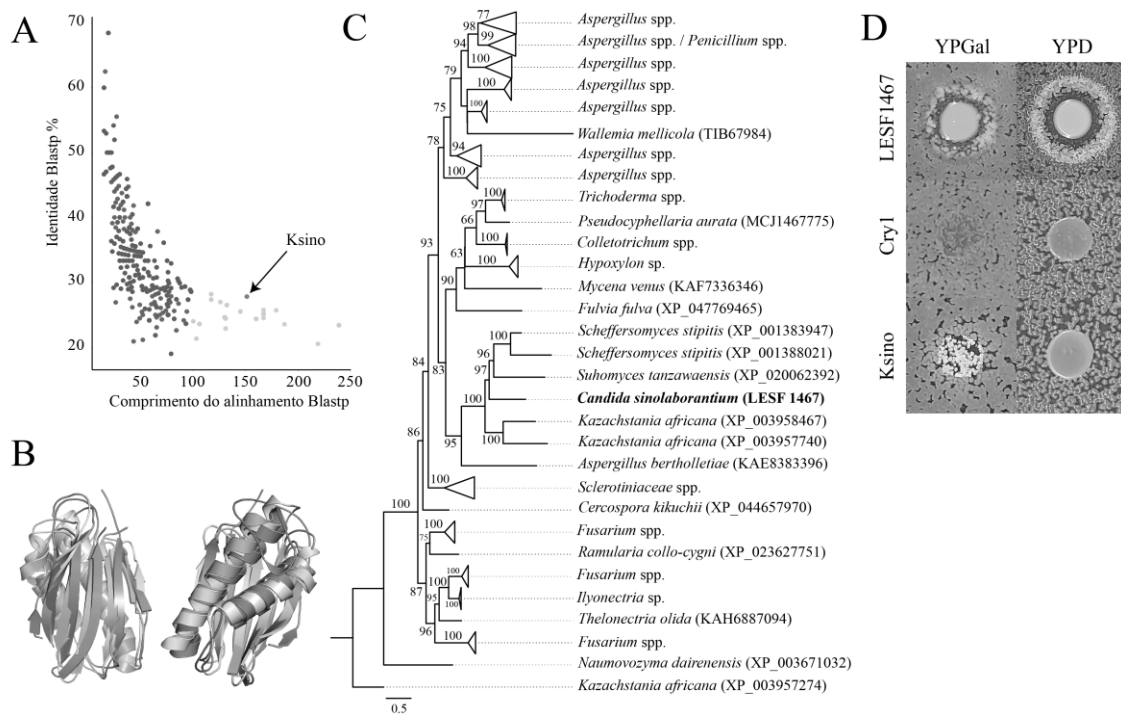
**Figura 3.** Características de toxinas produzidas por *Candida sinolaborantium* LESF 1467. **A.** O fenótipo observado pelas toxinas frente a *Kodamaea ohmeri* LESF 1474 indica diferenciação de células na presença da linhagem *killer*, dos seus precipitados em temperatura ambiente (i.e. TA), com perda de atividade quando as precipitações foram submetidas a altas temperaturas (i.e., 60 °C e 98 °C). **B.** Avaliação do fenótipo frente a diferentes condições de pH, com pH ótimo em torno de 5,0; com perda de atividade em condições neutras, como pH 6 e 6,5 (que não foram representados graficamente). **C.** Avaliação do fenótipo frente a diferentes condições de temperatura, com temperatura ótima de 20 °C, e com perda de atividade em temperatura de 35 °C (que não foi representada graficamente).



**Figura 4.** Avaliação do fenótipo observado por *Kodamaea ohmeri* LESF 1474, frente as toxinas produzidas por *Candida sinolaborantium* LESF 1467. **A.** O fenótipo foi observado após cinco dias de incubação em temperatura ambiente, com produção de células alongadas, em conformação de pseudohifas, na zona de interação entre linhagens, confirmadas por avaliações microscópicas e comparação com culturas axênicas nas mesmas condições. O isolado *Saccharomyces cerevisiae* DSM-70459, que secreta uma toxina *killer* conhecida (Klus) e mobilizada em satélites de Totivirus, apresenta fenótipo similar de alteração celular, porém sem inibição. A remoção dos satélites por cura da levedura leva a perda do fenótipo e da atividade *killer*. **B.** Proporção entre células alongadas e normais nas zonas de interação com os isolados *C. sinolaborantium* LESF 1467, DSM-70459 (Klus) e controle (i.e., levedura sensível LESF 1474, em condições axênicas). **C.** Avaliação de sobrevivência de células nas zonas de interação após 5 dias de incubação.



**Figura 5.** Mineração e expressão de uma toxina codificada por região genômica. **A.** Resultados de mineração de candidatos a toxinas, via Blastp com toxinas conhecidas. Os resultados foram filtrados por Identidade (%) e comprimento do alinhamento, um candidato similar a Klus, foi selecionado e denominado Ksino (potencial toxina proveniente de *C. sinolaborantium*). **B.** Estruturas preditas de Ksino, Klus e SMK (toxina cristalizada e depositada em banco de dados com coordenadas similares a Ksino, via alinhamento estrutural Dali). As estruturas das toxinas foram sobrepostas e são apresentadas expondo suas  $\beta$ -pleated sheets e  $\alpha$ -helix. **C.** Filogenia de proteínas semelhantes a Ksino (em negrito), obtidas por Blastp no GenBank. **D.** Expressão da região codificadora de Ksino em vetor indutor pAG306-GAL-ccdB integrado a linhagem Cry1. As avaliações foram conduzidas frente a espécie *Kodamaea ohmeri* LESF 1474, em dois meios de cultivo contendo galactose ou dextrose como fonte de carbono. Na presença de dextrose o vetor não é ativado e o fenótipo característico foi observado somente na presença de *Candida sinolaborantium* LESF 1467. Na presença de galactose, o fenótipo também foi observado na linhagem transformada de Cry1-Ksino, com o mesmo fenótipo sobrepondo a cultura na placa. Os controles negativos em ambos os meios não apresentam o fenótipo.



### Capítulo 3

#### **Mutualismo não simbiótico entre *Spermophthorus apuleiae* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) e uma levedura endofítica**

##### **1. Introdução**

Mutualismos desempenham papéis essenciais em ecossistemas (ASPLUND; WARDLE, 2017; LEAL et al., 2014; LEAL; OLIVEIRA, 1998; MEYER et al., 2011), impactando a diversidade de espécies (BEVER, 2002; CHOMICKI et al., 2019; SCHMITT; HOLBROOK, 2003) e levando a modificação de nicho (BUSER et al., 2014). Em alguns mutualismos, organismos são fisicamente conectados e sua associação é restrita a certos estágios do ciclo de vida dos parceiros (BOUCHER et al., 1982; RAFFERTY et al., 2015), como é o caso da polinização de plantas e dispersão de sementes (HOWE, 1984; RAFFERTY et al., 2015), interações formiga-nectário extrafloral (KEELER, 1981) e peixes que vivem associados a anêmonas (BOUCHER et al., 1982). Leveduras são frequentemente associadas a insetos e suas interações são geralmente denominadas de mutualismos difusos (STARMER; LACHANCE, 2011; MADDEN et al., 2018), uma vez que as comunidades de leveduras interagem com diferentes espécies de insetos. O mutualismo entre leveduras e *Drosophila* spp. é o caso mais estudado (BUSER et al., 2014; STARMER; FOGLEMAN, 1986), com as leveduras provendo nutrição para adultos e larvas (BELLUTTI et al., 2018; SPITALER et al., 2020; STARMER; FOGLEMAN, 1986) ou realizando a detoxificação de compostos nocivos (STARMER; FOGLEMAN, 1986).

Os intestinos de insetos são um ambiente favorável à presença de leveduras (STEFANINI et al., 2012, STEFANINI, 2018) e, em alguns casos, provêm condições favoráveis para acasalamento e hibridização (em *Drosophila*, COLUCCIO et al., 2008; REUTER et al., 2007; SEIKE et al., 2021; e em vespas sociais, STEFANINI et al., 2016), auxiliando a dispersão de leveduras. Metabólitos produzidos pelas leveduras provêm uma sinalização aos insetos da presença de açúcares, aumentando em consequência sua dispersão a novos ambientes (KOERTE et al., 2020; LJUNGGREN et al., 2019; MADDEN et al., 2018, SCHEIDLER et al., 2015). Besouros foram previamente reportados pois desempenham um papel na dispersão de leveduras (LACHANCE et al., 2001). A atração química por compostos voláteis de leveduras foi

demonstrada em diferentes espécies (em besouros frugívoros *Carpophilus*, BAIG et al., 2020; e no besouro de colmeia *Aethina tumida*, BENDA et al., 2008; TORTO et al., 2007, são alguns dos exemplos). Em alguns casos, mesmo estruturas nos corpos dos besouros (*i.e.*, denominadas micangia ou micetangia, VEJA; BIEDERMANN, 2020) podem hospedar células de leveduras (em besouros-veados, YAMAMOTO; TOKI, 2023; no besouro do pinheiro *Dendroctonus brevicomis*, DAVIS et al., 2011; no besouro-lagarto *Doubledaya bucculenta*, TOKI et al., 2012; e nos besouros de madeira de navio *Elateroides dermestoides*, TOKI, 2023), favorecendo sua dispersão.

Entre os benefícios proporcionados pelas leveduras a besouros, algumas espécies dependem de leveduras para nutrição (como é o caso de *Wickerhamomyces anomalus* que é fonte nutricional para larvas de besouros-lagarto *Doubledaya bucculenta*; TOKI et al., 2012). Outras, dependem de leveduras para a detoxificação ambiental (por exemplo *Cyberlindnera americana* associada a *Dendroctonus* spp. BRIONES-ROBLERO et al., 2017; LOU et al., 2014; RIVERA et al., 2009, com um suposto papel de detoxificação mediante dados genômicos e transcriptomas; SOTO-ROBLES et al., 2019). As leveduras também podem produzir moléculas semelhantes à ferormônios antiagregantes (como demonstrado no besouro do pinheiro *Dendroctonus ponderosae*, HUNT; BORDEN 1990) e, em alguns casos, interferindo no crescimento de fungos filamentosos associados aos besouros via produção de compostos voláteis (como no caso de besouros do pinheiro ocidentais *D. brevicomis*, DAVIS et al., 2011; no besouro do abeto *D. rufipennis*, na América do Norte, DAVIS et al., 2022; e no besouro do pinheiro *D. ponderosae*, ADAMS et al., 2008). Como por vezes besouros abrigam leveduras (NGUYEN et al., 2006; SUH; BLACKWELL, 2004, 2005; SUH et al., 2008), novas interações são esperadas, muitas das quais ainda não exploradas.

Durante um levantamento de leveduras associadas a besouros, encontramos uma grande densidade de leveduras em frutos de *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) quando infestados pelo besouro *Spermophthorus apuleiae* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). Esse besouro é conhecido por um estilo de vida frugívoro, construindo galerias no mesocarpo dos frutos, sem danificar suas sementes (SUESDEK; LIMA, 2011), e é um inseto comumente associado a essa espécie vegetal (COSTA-LIMA, 1959). *Libidibia ferrea* é uma planta nativa no Brasil (OLIVEIRA, 2023), popularmente conhecida como “Jucá” e “Pau-ferro”, essa espécie é usada em arborização urbana (ALMEIDA et al., 2021; DE CARVALHO MARIA, 2020). Cascas, folhas e frutos são amplamente empregados na medicina popular para diversos fins terapêuticos

(MACÊDO et al., 2020), incluindo por propriedades antifúngicas (BARIANI et al., 2012; SOARES et al., 2018a,b; MARTINS et al., 2014), sendo que compostos fenólicos, incluindo ácidos elágico e gálico estão entre os fitoquímicos mais frequentemente encontrados nos extratos dos frutos (FERREIRA et al., 2016; NAKAMURA et al., 2002; UEDA et al., 2001). Neste estudo, determinamos que os besouros *S. apuleiae* não interagem apenas com *L. ferrea* (Mart. ex Tul.), mas também com uma comunidade de leveduras dentro de suas galerias no mesocarpo dos frutos. Nossos resultados indicam que leveduras com afinidade ao gênero *Cyberlindnera* são frequentemente encontradas nesta associação, produzindo voláteis atrativos para os besouros e aumentando em densidade devido à construção de galerias pelos besouros. Propomos que essa interação besouro-levedura seja um caso de mutualismo não simbiótico, com um nicho específico e ocorrendo em um determinado tempo de interação entre os parceiros, com a produção de sinais atrativos pela levedura e pelo aumento da densidade das leveduras nos frutos, pela atividade dos besouros.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Isolamento das leveduras**

Para acessar a comunidade de leveduras associadas aos frutos de *L. ferrea*, foram amostrados frutos infestados e não infestados por *S. apuleiae*, em um total de 10 árvores, em três municípios do Estado de São Paulo (Brasil): Rio Claro, Limeira e Mogi-Guaçu (Tabela S1). Todas as amostras foram armazenadas em recipientes estéreis e transferidas para o laboratório para o isolamento das leveduras. Os frutos foram desinfetados superficialmente com etanol 70% e abertos com instrumentos estéreis. Para isolamento das leveduras dos frutos, com ou sem a presença dos besouros, coletamos o mesocarpo e suspendemos em PBS 1× (g L<sup>-1</sup>: 8 NaCl; 0,2 KCl; 1,44 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,24 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; final pH = 7,4), suplementado com 0,05% de Tween 80 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), diluídos a 1:100 e 1:1000. Das diluições, 100 µL foram espalhados na superfície de meio YPD (20 g L<sup>-1</sup> of dextrose; 20 g L<sup>-1</sup> of peptona; 10 g L<sup>-1</sup> extrato de levedura e 15 g L<sup>-1</sup> agar), suplementado com 150 µg mL<sup>-1</sup> de cloranfenicol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), e pH ajustado para 4,5, com 0,1 N HCl. Para confirmar a prevalência e distribuição de *Cyberlindnera* sp. nas galerias dos besouros, realizamos um segundo isolamento a partir de frutos infectados por besouros de outras 21 árvores, distribuídas em oito localidades do Estado de São Paulo (Tabela S1).

Foram coletados seis besouros machos e seis besouros fêmeas infestando frutos, os indivíduos foram lavados duas vezes com PBS 1× (suplementado com 0,05% de Tween 80), para isolamento de leveduras fortemente aderidas ao exoesqueleto, a lavagem final foi recuperada, diluída a 1:100 e 1:1000. Dessas diluições, 100 µL foram espalhados em YPD, como descrito anteriormente. Para isolamento de leveduras internas, desinfetamos os besouros por imersão em etanol 70% (30 s), lavamos três vezes em água estéril e depois trituramos os besouros em 1 mL de PBS 1×. A suspensão final foi diluída a 1:100 e 1:1000, sendo que 100 µL foram espalhados em YPD. O isolamento foi conduzido para os besouros machos e fêmeas.

Placas foram incubadas a 20 °C, no escuro, durante 14 dias, e colônias de leveduras foram purificadas em YPD para obtenção de culturas axênicas, registrando o número de unidades formadoras de colônias (UFCs). Culturas foram preservadas em glicerol 30% a -80 °C e em meio GYMP (20 g L<sup>-1</sup> de Dextrose; 10 g L<sup>-1</sup> de Extrato de malte; 5 g L<sup>-1</sup> de Extrato de levedura; 2 g L<sup>-1</sup> de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 15 g L<sup>-1</sup> de Agar) inclinado a 10°C. As culturas foram depositadas no acervo do Centro de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP: WDCM 1043).

## 2.2. Isolamento de fungos filamentosos

Para acessar a comunidade de fungos filamentosos nos frutos de *L. ferrea*, quando infestados por *S. apuleiae*, amostramos frutos de um total de 11 árvores no Estado de São Paulo, nos municípios de: Cordeirópolis (n= 3 indivíduos), em São Paulo (n= 3) e em Rio Claro (n= 5) (Tabela S1). Os frutos foram transferidos, desinfetados superficialmente e abertos conforme descrito anteriormente. Seis fragmentos do mesocarpo do fruto foram transferidos para os meios *Potato Dextrose Agar* (PDA: *Neogen*<sup>®</sup> *Culture Media*, Lansing, MI, EUA) e *Malt extract* (MA2%: 20 g L<sup>-1</sup> de Extrato de malte e 15 g L<sup>-1</sup> de ágar), ambos suplementados com 150 µg mL<sup>-1</sup> de cloranfericol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Placas foram incubadas a 25 °C, por 14 dias, no escuro. Colônias de fungos foram transferidas para novas placas de MA2% e agrupadas por morfotipos para delimitação das espécies. As culturas foram preservadas em glicerol 30% a -80 °C.

### 2.3. Identificação das leveduras

O DNA genômico foi extraído para todos os isolados de leveduras seguindo os métodos descritos por Sampaio et al. (2001), com modificações nas etapas de incubação e centrifugação. Resumidamente, culturas de leveduras em YPD foram suspendidas em 500 µL de tampão de lise estéril (50 mM Tris, 50 mM EDTA, 250 mM NaCl e 0,3% SDS; pH 8) com adição de esferas de vidro (425–600 µm de diâmetro, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Os tubos foram agitados durante 4 min e incubados a 65 °C por 1 h (etapa repetida duas vezes). As amostras foram centrifugadas a  $15,871 \times g$ , por 15 min, e 400 µL foram transferidos para microtubos estéreis. Reações em cadeia da polimerase iniciada por microssatélites (MSP-PCR) foram realizadas para cada isolado, seguindo os protocolos de Meyer et al. (1993), em reações de 25 µL com o oligonucleotídeo sintético (GTG)<sub>5</sub>. As reações incluíram 4 µL de dNTPs 1,25 mM (cada), 5 µL de tampão 5 ×, 2 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 1,5 µL de *primer* 10 µM (GTG)<sub>5</sub>, 7,3 µL de água estéril ultrapura, 0,2 µL 5 U µL<sup>-1</sup> Taq polimerase e 5 µL de DNA diluído (1:750 µL em água estéril ultrapura). As reações de MSP-PCR foram conduzidas da seguinte forma: 95 °C por 3 min, 40 ciclos a 93 °C por 45 s, 50 °C por 1 min, 72 °C por 1 min e uma etapa final de extensão a 72 °C por 6 min. Os amplicons foram visualizados por eletroforese utilizando gel de agarose 1,4% (p/v) preparado com tampão TBE 0,5% (Tris-Borato-EDTA), durante 3 h de corrida. Como marcador de tamanho de peso molecular, foi utilizado o 1kb DNA *Ladder* (Promega, Madison, WI, USA). Os géis de agarose foram corados com solução GelRed (16 µL 10.000 × GelRed, 0,56 g NaCl em 100 mL de água ultrapura) e visualizados sob UV. Para cada padrão de banda, pelo menos dois isolados representativos foram selecionados para sequenciamento de DNA, exceto *singletons*.

Para a identificação das espécies, a região D1/D2 da subunidade maior do gene do RNA ribossômico (LSU) foi amplificada, utilizando o par de *primers* NL1 e NL4 (KURTZMAN; ROBNETT, 1998), e a região do espaçador transcrito interno (ITS) foi amplificada usando o par de *primers* ITS5 e ITS4 (WHITE et al., 1990). As reações incluíram 4 µL de dNTPs 1,25 mM (cada), 5 µL de tampão 5 ×, 2 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 1,0 µL de *primers* 10 µM, 6,8 µL de água estéril ultrapura, 0,2 µL 5U µL<sup>-1</sup> Taq polimerase e 5 µL de DNA diluído (1:750 µL em água estéril ultrapura). As reações de PCR foram conduzidas da seguinte forma: LSU - 96 °C por 3 min, 35 ciclos a 96 °C por



30 s, 61 °C por 45 s e 72 °C por 1 min; ITS - 96°C por 3 min, 35 ciclos a 94°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 2 min.

Os amplicons foram purificados com *Wizard™ SV Gel e PCR Clean-Up System* (Promega, Madison, WI, EUA) e sequenciados com *BigDye® Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Os *amplicons* foram injetados em um analisador genético ABI 3500 Series (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e as sequências *forward* e *reverse* foram geradas e montadas usando *BioEdit v.7.0.5.3* (HALL, 1999). Sequências consenso dos táxons representativos foram comparadas com sequências tipo semelhantes depositadas no banco de dados, por análise com BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

## 2.4. Identificação dos fungos filamentosos

Para identificação dos fungos filamentosos, extraímos o DNA genômico seguindo os métodos descritos por Lacerda et al. (2018). Os micélios foram mecanicamente lisados em tampão de lise (100 mM Tris-HCL, 10 mM EDTA e 2% SDS; pH 8), suplementado com esferas de vidro (425–600 µm em diâmetro, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Proteinase K (20 mg mL<sup>-1</sup>, 5 µL) foi adicionada e as amostras foram incubadas a 65 °C por 30 min. Em seguida, 140 µL de 5 M NaCl e 64 µL de 10% CTAB foram adicionados e as amostras incubadas a 65 °C por 1 h. Tubos foram centrifugados a 10.000 rpm por 30 s e 600 µL de uma solução 24:1 de clorofórmio e álcool isoamílico foram adicionados. Os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 10 min e 450 µL do sobrenadante foram recuperados e precipitados por centrifugação a 10.000 rpm por 10 min (com 300 µL de isopropanol 100% e 50 µL de acetato de sódio 3M, pH 5,2). Os pellets foram lavados com 600 µL de etanol 70% por centrifugação a 10.000 rpm por 10 min, sendo o etanol 70% removido por inversão dos tubos. As amostras foram secas e suspensas em 30 µL de tampão Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl e 1 mM EDTA).

Para identificação, foram amplificadas a região ITS utilizando os *primers* ITS5 e ITS4 (WHITE et al., 1990) e para isolados pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, o gene da  $\beta$ -tubulina (Btub) foi amplificado com o par de iniciadores Bt2a e Bt2b (GLASS E DONALDSON 1995). Reações incluíram 4 µL de dNTPs 1,25 mM (cada), 5 µL de tampão 5 ×, 2 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 1 µL de 10 mg mL<sup>-1</sup> de albumina

de soro bovino, 1,0  $\mu\text{L}$  de *primers* 10  $\mu\text{M}$  cada, 8,8  $\mu\text{L}$  de água estéril ultrapura, 0,2  $\mu\text{L}$  de 5U  $\mu\text{L}^{-1}$  Taq polimerase e 2  $\mu\text{L}$  de DNA diluído (1:10  $\mu\text{L}$  em água estéril ultrapura). As reações de PCR foram conduzidas da seguinte forma: ITS - 96 °C por 3 min; 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min e 72 °C por 2 min; beta-tubulina - 94 °C por 3 min; 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 58 °C por 1:30 min e 72 °C por 2 min. Os amplicons foram purificados e sequenciados conforme descrito anteriormente. Sequências consenso dos táxons representativos foram comparadas com sequências tipo similares depositadas no banco de dados do NCBI-GenBank, por análise BLASTn.

## **2.5. Leveduras associadas às superfícies externas do besouro**

Para avaliar a presença de leveduras colonizando o tegumento do besouro e suas galerias nos frutos, besouros e amostras de frutos foram examinados com microscopia eletrônica de varredura (MEV). Machos, fêmeas e fragmentos de frutos infestados (*i.e.*, quadrados de 2  $\text{cm}^2$ ) foram fixados com vapor de tetróxido de ósmio e depois transferidos para stubs de alumínio. As amostras foram desidratadas em banhos de acetona com concentrações crescentes (ou seja, 50, 75, 90, 95 e 100%), até o ponto crítico (Balzers CPD030), o material foi colado com fita adesiva dupla em stubs, metalizado com pulverização por ouro (Balzers SCD050) e examinado em microscópio eletrônico de varredura (Hitachi TM3000). A presença de leveduras foi investigada principalmente na parte frontal dos machos, que por vezes acumula material do fruto em uma cavidade. O material acumulado também foi assepticamente removido, suspenso em PBS 1 $\times$ , e inoculado em 25 mL de YPD a 25 °C sob 120 rpm de agitação para isolamento de leveduras.

## **2.6. Assimilação de extratos dos frutos**

Avaliamos a capacidade das leveduras em assimilar extratos dos frutos como única fonte de carbono. Preparamos extratos de frutos utilizando 300 g em 1 litro de água, incubados por 2 dias a 4 °C. Em seguida, o pH foi medido (pH = 3,5), e os extratos foram filtrados com filtros de celulose de 0,22  $\mu\text{m}$ , diluídos em  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$  e  $\frac{1}{8}$ , e suplementados com ágar (15  $\text{g L}^{-1}$ ), suplementado com base nitrogenada de levedura (YNB, BD Diagnostic Systems, Sparks, MD), com ou sem adição de Dextrose (20  $\text{g L}^{-1}$ ). Placas sem extrato dos frutos, com ou sem adição de Dextrose (20  $\text{g L}^{-1}$ ) foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente. Um total de 48 isolados

de leveduras representativas da coleção (listadas na Tabela S2) foram cultivadas nos extratos dos frutos como única fonte de carbono. O isolado *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006 foi adicionado ao ensaio como uma levedura não associada a esse ambiente.

## 2.7. Ensaio de escolha de voláteis produzidos pelas leveduras

Para investigar a atração de besouros por voláteis das leveduras, suspendemos  $10^8$  células de leveduras  $\text{mL}^{-1}$  em PBS 1× e inoculamos as células em 30 mL de extratos de frutos (preparados como descrito anteriormente) em frascos Erlenmeyer de 125 mL, os quais foram incubados durante um dia, a 25 °C, sob 150 rpm de agitação, seguido de dois dias a 25 °C em condições estacionárias. Após a incubação, a densidade das suspensões de leveduras foram medidas em câmara de Neubauer. Preparamos uma arena caseira, a partir de placas de Petri de 9 cm de diâmetro, com armadilhas equidistantes entre si (Fig. S1). Utilizamos a base de pipetas Pasteur plásticas fixadas como armadilhas, que foram furadas lateralmente em ambas as direções com furos de 0,5 mm de diâmetro, e posicionadas a 0,5 de distância da base das placas de Petri, para que os besouros entrassem, mas não saíssem das armadilhas. Um furo de 0,5 mm de diâmetro foi feito nas tampas das placas de Petri e utilizado para introdução dos besouros no sistema, que foi mantido sem vedação para permitir a circulação de ar e disseminação de voláteis. Os extratos, preparados conforme descrito anteriormente, foram adicionados nas armadilhas em um volume de 300  $\mu\text{L}$ . Fêmeas e machos foram colocados ao mesmo tempo e mantidos em temperatura ambiente por 12 h, antes do registro da escolha. No primeiro ensaio foram utilizadas quatro armadilhas para comparar voláteis de duas leveduras diferentes, nas seguintes combinações: Armadilha 1 - levedura 1, Armadilha 2 - levedura 2, Armadilha 3 - extrato do fruto e Armadilha 4 - Água estéril. As seguintes leveduras foram utilizadas nos ensaios: *Cyberlindnera* sp. B56, *Yamadazyma riverae* B343, *Meyerozyma caribbica* B565, todas as combinações pareadas foram realizadas (i.e., *Cyberlindnera* / *Yamadazyma*, *Cyberlindnera* / *Meyerozyma*, e *Meyerozyma* / *Yamadazyma*). Um total de 7 fêmeas e 4 machos foram introduzidos no sistema e o ensaio foi realizado com cinco repetições técnicas para cada combinação.

No segundo experimento, utilizamos cinco armadilhas para comparar a atração dos besouros por metabólitos ou células de *Cyberlindnera* sp., com as seguintes

combinações: Armadilha 1 - caldo de cultura com células da levedura, Armadilha 2 - caldo de cultura esterilizado por filtração, Armadilha 3 - células de levedura suspensas em PBS 1×, Armadilha 4 - extrato do fruto, Armadilha 5 - água estéril. Os extratos de fruto foram preparados conforme descrito anteriormente e, para o preparo dos demais tratamentos, as células de levedura foram removidas com filtros de celulose de 0,22 µm ou recuperadas por centrifugação (Eppendorf 5424, 5.000 × g por 3 min), seguidas de lavagem e suspensão em PBS 1×. Um total de 9 fêmeas e 3 machos foram introduzidos no sistema e o ensaio realizado com oito repetições técnicas. A escolha do besouro foi registrada conforme descrito anteriormente.

## **2.8. Co-cultivos entre *Cyberlindnera* sp. e fungos filamentosos**

Para avaliar a competitividade de *Cyberlindnera* sp. frente aos fungos filamentosos mais recorrentes, conduzimos ensaios de co-cultivo entre o isolado B56 de *Cyberlindnera* sp. e os fungos: *Aspergillus aculeatus* - F2, *Penicillium herquei* - F4, *Penicillium brevicompactum* - F9. Para avaliar a competitividade, suspensão de esporos dos fungos filamentosos (3 µL de 5 × 10<sup>4</sup> células mL<sup>-1</sup>) foram incubados em meio YPD, previamente semeados com suspensão de leveduras (100 µl de 5 × 10<sup>4</sup> células mL<sup>-1</sup>) ou na sua ausência (seguindo protocolo descrito por HILBER-BODMER et al., 2017). Para avaliar o efeito dos voláteis, cultivamos as leveduras e fungos filamentosos em placas tripartidas com meio YPD. Para confirmar o efeito dos voláteis as placas foram vedadas com *Parafilm*, e os ensaios conduzidos com presença ou ausência de 6 g carvão ativado em um dos compartimentos, como controles, uma vez que os compostos voláteis são absorvidos pelo carvão ativado. Os ensaios foram conduzidos seguindo protocolos estabelecidos por Fernando et al., (2005). As placas foram incubadas a 25°C por até 5 dias até que o crescimento do fungo no grupo controle atingisse a borda da placa de Petri. A área de crescimento dos fungos foi mensurada em cm<sup>2</sup>.

## **2.9. Simulando a construção de galerias pelos besouros**

Para confirmar se as leveduras são endófitas nos frutos e não apenas transmitidas pelos besouros, simulamos a construção de galerias por esses insetos com uma broca de furadeira estéril. Os frutos foram coletados em Rio Claro-SP, desinfetados superficialmente com etanol 70% e furados com broca estéril (2 mm de diâmetro) em quatro furos em cada fruto (5 mm de profundidade). Os frutos foram colocados em

recipiente plástico com areia por 15 dias em temperatura ambiente e borrifados diariamente com água estéril, simulando as condições naturais a que os frutos são expostos quando infestados por besouros. Os frutos perfurados ou não, foram mantidos em regime de exposição à água ou mantidos secos, de modo a atender todas possíveis interações das variáveis. Um total de oito frutos foi utilizado por combinação. Após 15 dias, os frutos foram retirados, desinfetados superficialmente com etanol 70%, abertos com instrumentos estéreis, e o material interno de todos os frutos foi retirado, combinado e suspenso em 1 mL de PBS 1×. As amostras foram diluídas serialmente e 100 µL foram plaqueados em YPD, as suspensões também foram utilizadas como inóculo em 25 mL de YPD incubados a 25 °C sob 120 rpm de agitação. As leveduras foram isoladas, purificadas e as culturas axênicas foram identificadas conforme descrito anteriormente (isto é, DNA extraído, seguido de MSP-PCR e sequenciamento da região 26S).

#### **2.10. Análises estatísticas**

Para avaliar as diferenças nas UFCs de leveduras entre machos e fêmeas, os valores foram avaliados com o teste de *Mann-Whitney U*, com limiar alfa de 0,05, uma vez que os dados violam os pressupostos paramétricos (foram aplicados os testes de *Bartlett* e *Shapiro-Wilk* para verificar a homocedasticidade e normalidade dos dados, respectivamente). Para avaliar as diferenças nas preferências dos besouros, realizamos o teste *Chi-Square Goodness of Fit* comparando as escolhas registradas com a distribuição esperada de uma probabilidade estocástica. O teste binomial exato, com limiar alfa de 0,05, foi realizado como *post hoc* para comparar as preferências observadas com a distribuição estocástica esperada de cada escolha. Ausência de escolha pelos besouros foi considerada uma das possibilidades na configuração experimental.

Para avaliar as diferenças entre o crescimento dos fungos filamentosos na presença e na ausência de *Cyberlidnera* sp. ou de seus voláteis, as áreas dos micélios foram avaliadas para as premissas paramétricas conforme descrito previamente. As comparações pareadas foram realizadas com testes *Mann-Whitney U* e *Student's t-test*, com um limiar alfa de 0,05. Para comparação entre grupos, foi realizada análise de variância unidirecional seguida pelo teste *Tukey's HSD (honestly significant difference)* como um teste *post hoc*, com as ferramentas estatísticas fornecidas no pacote 'agricolae'

(DE MENDIBURU, 2021). As análises foram realizadas no *software Rstudio* (v. 1.4.1717) (RSTUDIO TEAM, 2021), no R v.4.1.0 (R CORE TEAM, 2021), e gráficos preparados com o pacote *ggplot2* (WICKHAM, 2016).

### 3. Resultados

#### 3.1. Frutos de *Libidibia ferrea* infestados por *Spermophthorus apuleiae* abrigam uma grande abundância de leveduras

Observamos que o mesocarpo do fruto é modificado pela escavação das galerias pelos besouros (Fig. 1A-G), sem danificar as sementes. As leveduras podem estar associadas ao tegumento externo dos besouros, fixadas nas cerdas e nos ornamentos do exoesqueleto (Fig. 1H-M). Embora a parte frontal dos machos acumule material do fruto (Fig. 1H), a presença de leveduras foi raramente observada por microscopia (Fig. 1I) e tentativas de cultivo do material acumulado nessa região não resultou em crescimento de leveduras. A alta densidade de leveduras nos frutos infestados observada nos isolamentos foi também confirmada pela microscopia eletrônica de varredura (Fig. 1N). As leveduras variam entre  $10^1$  a  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> no mesocarpo dos frutos, quando infestados pelos besouros, de 0 a  $10^2$  UFC mL<sup>-1</sup> nas superfícies externas dos besouros, e de 0 a  $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup> no material obtido internamente (Tabela S1, Fig. 2A-C). Fêmeas e machos não diferem na contagem de leveduras, tanto no isolamento interno, quanto no externo (*Mann-Whitney U test*,  $W = 51$ ,  $P = 0.97$ ). A maior discrepância observada entre machos e fêmeas nas amostras internas, se deu devido a uma amostra com abundância de  $9,13 \times 10^4$  UFC mL<sup>-1</sup> (Fig. 2B). Nenhuma levedura foi recuperada de amostras obtidas em frutos não infestados por besouros.

#### 3.2. *Cyberlindnera* sp. é a levedura predominante na associação com os frutos e besouros

A partir das amostras obtidas de 31 árvores e besouros, obtivemos 805 isolados de leveduras e fungos leveduriformes, compreendendo 16 espécies pertencentes a 13 gêneros (Fig. 2E). A maioria das leveduras recuperadas pertence ao filo *Ascomycota*, sendo *Saccharomycetales* a ordem mais frequente, com leveduras do subfilo *Saccharomycotina*. A levedura com afinidade ao gênero *Cyberlindnera* foi a mais recorrente, correspondendo a 79% dos isolados (635 de 805), sendo associada a 90%

das amostras de árvores (28 de 31). Em algumas amostras, *Cyberlindnera* sp. não foi isolada (por exemplo, na amostra proveniente de Mogi-Guaçu, Fig. 3A). Nesses casos, os táxons mais recorrentes em frutos infestados foram *Meyerozyma caribbica* (38 de 59 isolados; 64%, uma levedura da família *Debaryomycetaceae*), seguido por *Pseudosydowia eucalypti* (18 de 59 isolados; 31%, um fungo leveduriforme da família *Sacchotheciaceae*). Quando os frutos não infestados por besouros foram artificialmente perfurados, simulando a escavação de galerias por besouros, um total de  $6,7 \times 10^2$  UFC mL<sup>-1</sup> de *Cyberlindnera* sp. foi recuperado, apenas nos tratamentos que expuseram os frutos a água (i.e., simulando regimes de chuva, que coincidem com a frutificação de *L. ferrea*, Fig. 2D). As leveduras avaliadas são capazes de crescer utilizando somente extratos de frutos como fonte de carbono, em todas as concentrações avaliadas.

### **3.3. Eurotiales é a ordem mais recorrente entre os fungos filamentosos nesse ambiente**

Obtivemos 62 isolados de fungos a partir de amostras obtidas de 11 árvores (Tabela S3). Apesar dos esporos dos fungos terem sido observados no exoesqueleto do besouro (Fig. S1), o crescimento micelial nos frutos infestados somente foi observado ao final da estação de frutificação (observação pessoal de RB), com a senescência das populações de besouros. Os isolados de fungos incluem 16 espécies, pertencentes a 10 gêneros do subfilo *Pezizomycotina* (Tabela S3), com 69% dos isolados (43 de 62) pertencentes à ordem *Eurotiales* (gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces*). Durante nossas tentativas de manter os besouros *in vitro*, foi observado que o micélio dos fungos mais recorrentes leva ao decaimento de besouros e larvas (Fig. S1). Na presença da levedura, entretanto, há uma competição espacial pelo substrato (Fig. S1) e colônias de leveduras foram observadas demarcando o caminho performado pelos besouros no ensaio. Co-cultivos entre fungos filamentosos recorrentes e *Cyberlindnera* sp. indicam uma competição espacial entre organismos (Tabela S4; *Mann-Whitney U tests* e *Student's t-test*;  $P < 0.05$ ), e ausência de efeito de compostos voláteis no crescimento micelial dos fungos (Tabela S4; exceto por pequenas variações no crescimento *Penicillium brevicompactum*, análise de variância unidirecional,  $P < 0,05$ ; que devem ser cuidadosamente interpretados).

### 3.4. Besouros são atraídos por voláteis de *Cyberlindnera* sp.

Observamos que os besouros são atraídos por voláteis produzidos pela levedura a partir dos extratos dos frutos (Fig. 3B-D), com preferência aos voláteis de *Cyberlindnera* sp. Os extratos fermentados dos frutos, contendo ou não células de *Cyberlindnera* sp., foram os mais atrativos tanto para as fêmeas, quanto para os machos (Fig. 3C-D), atraindo 68,06% e 62,50% dos besouros, respectivamente (Tabela S5-S7; *Exact binomial test*,  $P < 0.05$ ). Os ensaios indicam que os besouros preferem os voláteis de *Cyberlindnera* sp. sobre os de *Yamadazyma riverae* e *Meyerozyma caribbica*, atraindo pelo menos 55% das fêmeas e machos em todas as combinações avaliadas (Tabela S5-S7; Fig. 3C, *Exact binomial test*,  $P < 0.05$ ). Quando *Cyberlindnera* sp. não foi fornecida como escolha, tratamentos que não continham as leveduras (*i.e.*, extrato do fruto, água ou ausência de escolha), atraíram 45,71% das fêmeas e 45,00% dos machos (Tabela S5-S7), sendo que apenas machos apresentaram preferência aos voláteis de *Meyerozyma caribbica* sobre os de *Yamadazyma riverae* (Tabela S5-S7; *Exact binomial test*,  $P < 0,05$ ).

## 4. Discussão

Algumas interações mutualísticas ocorrem apenas em determinados estágios da vida dos parceiros (BOUCHER et al., 1982; RAFFERTY et al., 2015), como a polinização e dispersão de sementes (HOWE, 1984; RAFFERTY et al., 2015). As interações levedura-inseto, eventualmente denominadas mutualismos difusos (MADDEN et al., 2018; STARMER; LACHANCE, 2011), tem na modificação de nicho pelos parceiros uma força motriz de seleção para a evolução do mutualismo (BUSER et al., 2014; CHAKRABORTY et al., 2022). Evidências indicam os *feedbacks* positivos das interações, pelo uso das leveduras como alimento pelos insetos (BELLUTTI et al., 2018; SPITALER et al., 2020; STARMER; FOGLEMAN, 1986; TOKI et al., 2012), para desintoxicação do ambiente (STARMER; FOGLEMAN, 1986) e pela dispersão das leveduras por insetos, com sinalização via produção de atrativos voláteis (BECHER et al., 2012; KOERTE et al., 2020; LACHANCE et al., 2001; LJUNGGREN et al., 2019), além do intestino de insetos, que em alguns casos, pode aumentar a chance de reprodução das leveduras (COLUCCIO et al., 2008, REUTER et



al., 2007, SEIKE et al., 2021, STEFANINI et al., 2016). Aqui fornecemos evidências da interação mutualística entre o besouro *S. apuleiae*, os frutos de *L. ferrea* (Mart. ex Tul.), e uma nova espécie de levedura com afinidades com o gênero *Cyberlindnera*. Demonstramos que os besouros não apenas têm um estilo de vida frugívoro, como postulado anteriormente (SUESDEK; LIMA, 2011), mas que também ingerem células de leveduras no processo. Ao escavar as galerias, os besouros alteram o nicho dos frutos, estimulando o aumento populacional de *Cyberlindnera* sp., que está presente originalmente nos frutos não infestados em baixa densidade, como endófito. Além disso, demonstramos que *Cyberlindnera* sp. produz voláteis atrativos e distintos ao besouro, utilizando os extratos do fruto como substrato. Coletivamente, nossos dados indicam uma interação entre dois organismos com *feedback* positivo, sob certas condições e durante uma determinada fase dos seus ciclos de vida, e com alterações mútuas do nicho compartilhado. Como ambos os parceiros foram encontrados na ausência um do outro (em apenas poucos casos para os besouros), definimos essa interação até o momento como um caso de mutualismo não simbiótico. Ensaios futuros do *fitness* dos parceiros, na interação ou na ausência um do outro, devem ser avaliados para determinar o impacto da ausência de um dos parceiros na sobrevivência do outro.

*Libidibia ferrea* é uma árvore nativa do Brasil (OLIVEIRA, 2023) que ocorre em diversos estados do território (CARVALHO, 2008) e amplamente utilizada na arborização urbana, como planta ornamental (ALMEIDA et al., 2021; DE CARVALHO MARIA, 2020). As amostras analisadas neste estudo são provenientes de árvores localizadas em ambientes urbanos, portanto, a natureza dessa interação em ambientes naturais ainda deve ser aprofundada. Da mesma forma, deve-se verificar se as variedades de *L. ferrea* influenciam na presença de *Cyberlindnera* sp., o que pode explicar a ausência dessa levedura em alguns casos. Diversos besouros foram relatados como pragas de *L. ferrea*, incluindo indivíduos das famílias *Scolytidae* (MACEDO, 1985), *Cerambycidae* (DE MORAES; BERTI FILHO, 1974) e *Curculionidae* (COSTA LIMA, 1956), porém sem dano ao fruto. *Spermophthorus apuleiae* (Scolytidae: Corthylini: Pityophthorina; WOOD, 1982) é conhecido por construir galerias em frutos de *L. ferrea* (COSTA LIMA, 1929; 1956) sem causar danos às sementes (SUESDEK; LIMA, 2011), porém seu papel ecológico é pouco conhecido, assim como o de *Spermophthorus caesalpiniae*, besouro relacionado que infesta *Libidibia paraguariensis* (sin. *Caesalpinia melanocarpa*; BLACKMAN, 1942). A levedura que encontramos com afinidades ao gênero *Cyberlindnera* é, até o momento, específica desse ambiente, não

sendo amostrada em outro ambiente. Tal levedura é membro da família *Phaffomycetaceae* (que inclui, dentre outros, os gêneros *Cyberlindnera* e *Wickerhamomyces*), que possuem vários membros associados a insetos ou aos ambientes em que os insetos vivem (KURTZMAN, 2011a,b; MESTRE et al., 2011; NUNDAENG et al. al., 2021). Interações com essas leveduras são marcantes para o besouro lagarto *Doubledaya bucculenta* (com o uso de *Wickerhamomyces anomalus* como alimento; TOKI et al., 2012), em diversas espécies de besouros *Dendroctonus* (com *Cyberlindnera* spp. e *C. americana* associada a diferentes estágios de desenvolvimento dos besouros; DOHET et al., 2016; BRIONES-ROBLERO et al., 2017), e nos besouros de madeira de navio *Elateroides* spp. (com *Cyberlindnera* spp. associada ao micetângio; TOKI, 2021, 2023).

A atração de insetos por voláteis de leveduras foi demonstrada para diferentes grupos de insetos, incluindo besouros (BAIG et al., 2020; BENDA et al., 2008; TORTO et al., 2007) e acredita-se que esses compostos funcionam como sinais químicos de fontes de açúcar, aumentando a dispersão das leveduras entre os ambientes com tal recurso (hipótese '*dispersal-encounter*', MADDEN et al., 2018). Demonstramos a especificidade da escolha dos besouros pelos voláteis de *Cyberlindnera* sp., o que provém elementos de uma interação intrínseca entre besouro-*Cyberlindnera*. Esforços futuros poderão elucidar o perfil químico dessas emissões e atratividade exclusiva ao besouro em questão. Um outro exemplo da contribuição de leveduras é a detoxificação do ambiente, também observada para besouros *Stegobium paniceum* e *Lasioderma serricorne*, e seus parceiros do gênero *Symbiotaphrina* (MARTINSON et al., 2020), que são fungos leveduriformes. Foi demonstrado que *S. kochii* associado ao besouro *L. serricorne* degrada vários aleloquímicos vegetais, toxinas, inseticidas e herbicidas (incluindo compostos fenólicos, como o ácido gálico; SHEN; DOWD, 1989), utilizando-os como fonte de carbono pela produção de enzimas de desintoxicação (SHEN; DOWD, 1991). Dessa forma, os fungos contribuem para a sobrevivência do hospedeiro, uma vez que na sua ausência os besouros enfrentam alta mortalidade e atraso no desenvolvimento larval (DOWD; SHEN, 1990). Nossos resultados indicam que as leveduras crescem e se utilizam dos extratos dos frutos como fonte principal de carbono, em todas as concentrações avaliadas. Tendo em vista que os ácidos elágico e gálico são os compostos fenólicos mais recorrentes nos estudos químicos da composição de frutos de *L. ferrea* (COMANDOLLI-WYREPKOWSKI et al., 2017; FERREIRA et al., 2016; NAKAMURA et al., 2002; UEDA et al., 2001) e que taninos

são amplamente conhecidos por um papel defensivo contra herbívoros (ANANTHAKRISHNAN, 1997), levantamos a hipótese de que as leveduras podem desempenhar um papel importante na desintoxicação dos compostos defensivos do fruto, tornando-a mais palatável ao besouro. Futuros ensaios com os besouros isentos da levedura alimentados com os frutos pré-digeridos pela mesma, bem como o perfil enzimático da levedura e o seu uso como fonte alimentar das larvas devem ser conduzidos.

O intestino de insetos de diferentes ordens é um habitat com condições favoráveis para a sobrevivência de leveduras (STEFANINI, 2018) e os materiais fecais também podem conter células viáveis de leveduras (como na mosca da fruta *Drosophila melanogaster*, CHO; ROHLFS, 2023). Em algumas espécies de besouros, as células de leveduras podem ser armazenadas em micetângios (DAVIS et al., 2011; TOKI et al., 2012, 2021, 2023; YAMAMOTO; TOKI, 2023), apesar de termos isolado leveduras internas, os esforços não foram direcionados a uma região do corpo específica, como intestino ou outros órgãos, esforços futuros poderão elucidar se *Cyberlindnera* sp. se mantém associada ao besouro por alguma dessas abordagens de transmissão. Recentemente, exploramos os rearranjos dos genes de rDNA nessa levedura em particular (BIZARRIA et al., 2023b). Em algumas leveduras, a hibridização entre espécies pode resultar na aquisição unilateral (*Pichia sorbitophila*, LOUIS et al., 2012) ou de ambas as cópias parentais (*Zygosaccharomyces rouxii*, GORDON; WOLFE, 2008) das unidades repetidas dos rDNAs. Uma vez que o acasalamento e hibridização são benefícios de leveduras quando associadas ao intestino de alguns insetos (COLUCCIO et al., 2008; REUTER et al., 2007; SEIKE et al., 2021; STEFANINI et al., 2016), levantamos a hipótese de que a reprodução sexuada de *Cyberlindnera* sp. nesse ambiente pode ter um papel nos polimorfismos observados para os genes do rDNA. Acreditamos que esses, e eventualmente outros rearranjos genômicos da levedura, merecem ser futuramente investigados à luz das interações inseto-levedura.

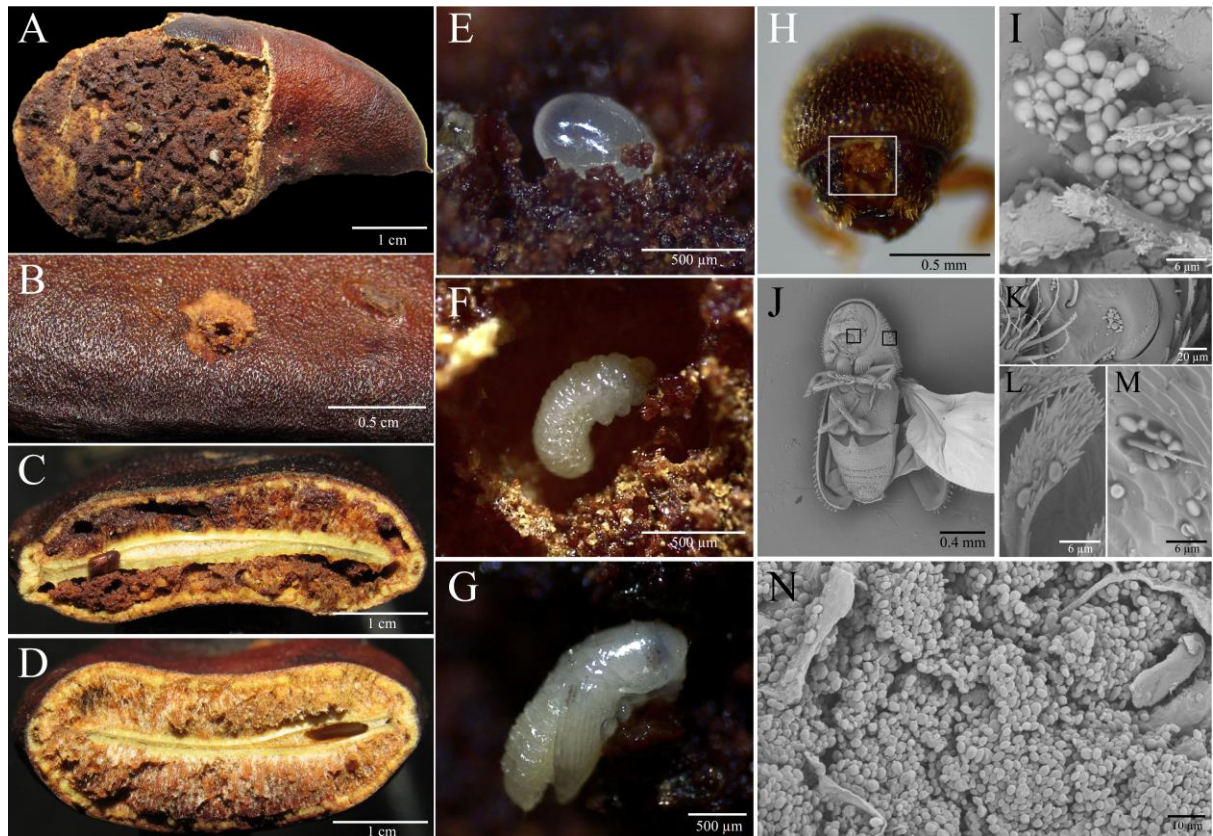
Sabe-se que além dos sinais voláteis das leveduras serem atrativos e afetarem o comportamento dos insetos (por exemplo, oviposição na mosca da fruta *Drosophila melanogaster*, BECHER et al., 2012; antiagregação no besouro do pinheiro da montanha *Dendroctonus ponderosae*, HUNT; BORDEN, 1990; e oviposição na mariposa *Cydia pomonella*, WITZGALL et al., 2012, dentre outros), eles também podem afetar os microrganismos associados (ADAMS et al., 2008; CHAKRABORTY et al., 2022; DAVIS et al., 2011; DAVIS et al., 2022). Outra possibilidade, é que os

compostos voláteis sejam subprodutos metabólicos que atuam indiretamente na construção de nicho (BUSER et al., 2014 e demais referências contidas), levando por consequência o estabelecimento dessas interações. Nesse estudo, encontramos uma clara preferência dos besouros pelos metabólitos voláteis da espécie mais recorrente, porém nenhuma evidência sugere que os voláteis possam impactar o desenvolvimento micelial ou a esporulação dos fungos filamentosos, e os achados indicam que a interação pode estar envolvida em uma competição nutricional e espacial. Dessa forma, acreditamos que a atratividade dos voláteis possa estar associada a uma alteração do nicho realizada pela levedura no substrato dos frutos, que impulsiona a manutenção da interação, aos moldes de uma interação por alteração de nicho (BUSER et al., 2014), o que também é evidenciado pela contrapartida dos besouros, que alteram a estrutura do mesocarpo dos frutos, impulsionando a densidade populacional das leveduras nesse ambiente.

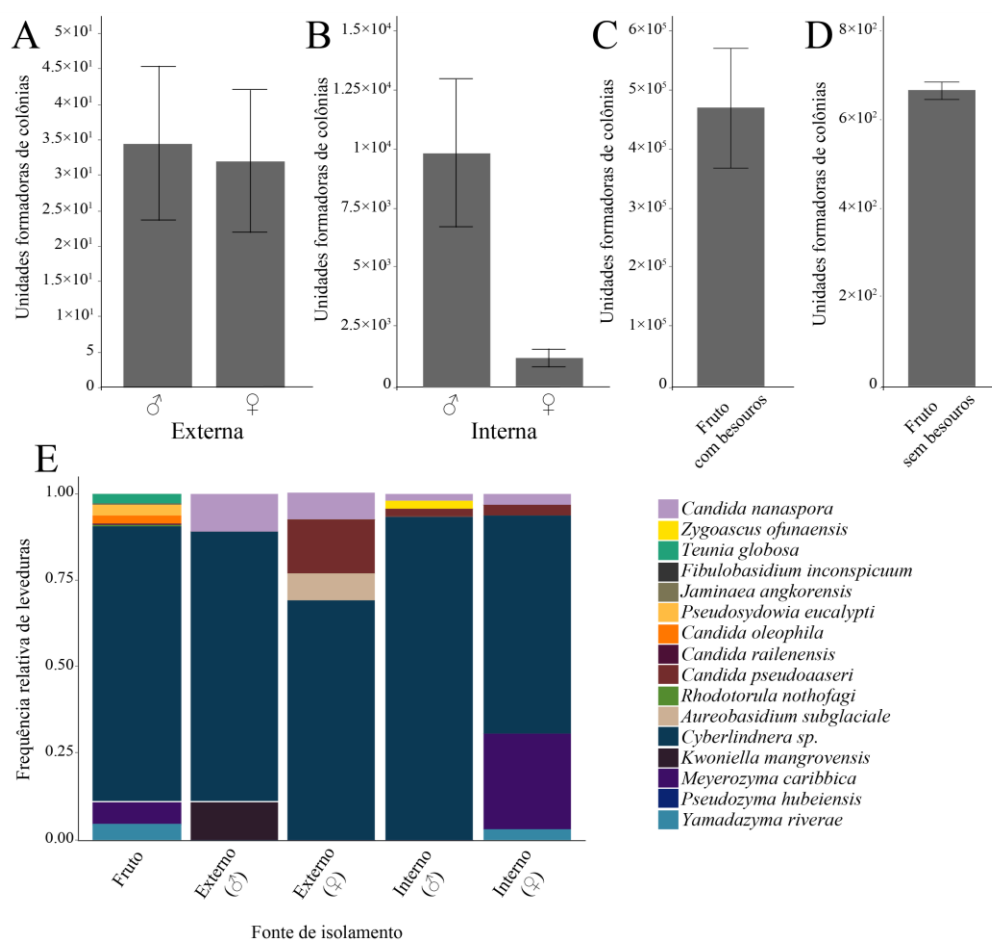
Considerando que *L. ferrea* é uma planta amplamente distribuída no Brasil, possuindo regimes de frutificação específicos, e que as interações entre *Cyberlindnera* sp. e o besouro *S. apuleiae* em frutos de *L. ferrea* possui características rastreáveis a luz das interações inseto-levedura, consideramos que esse é um modelo proeminente para estudos da ecologia e evolução de interações inseto-levedura.

## 5. Figuras

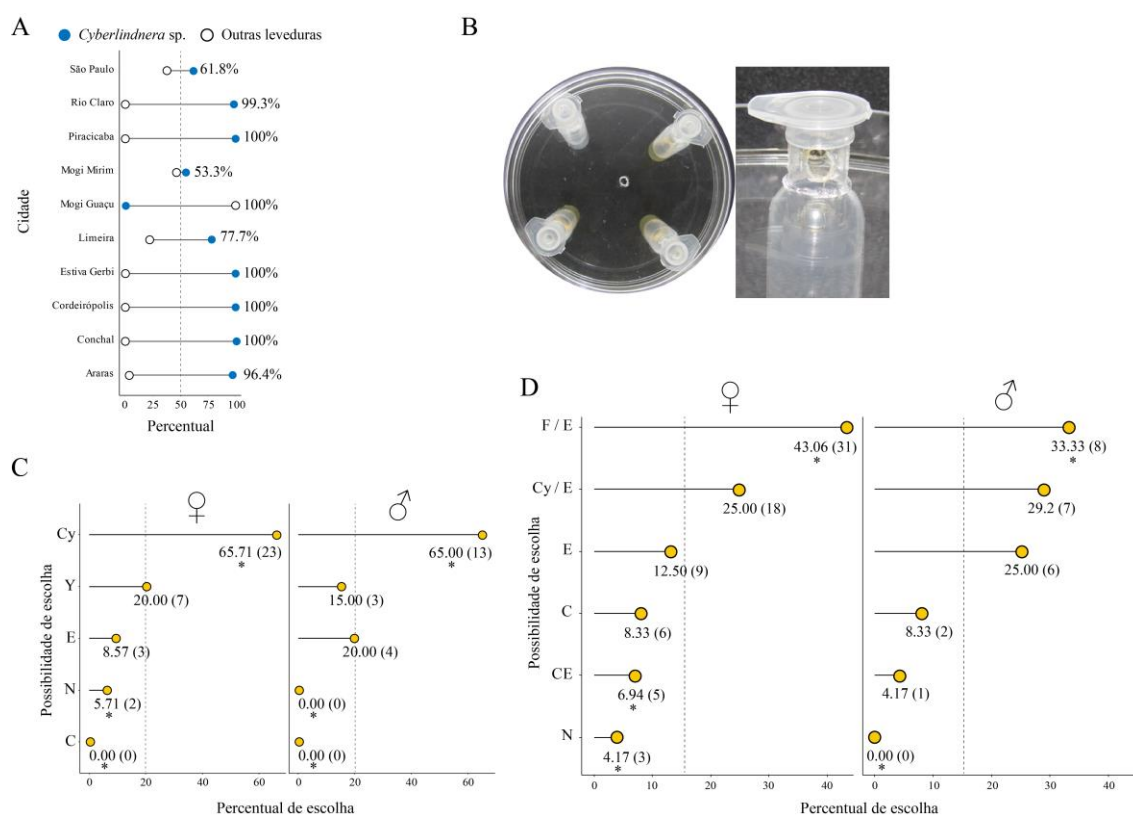
**Figura 1.** Interação entre besouros *Spermophthorus apuleiae* e leveduras em frutos de *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) (pau-ferro). **A-C.** Alterações estruturais no fruto em decorrência da atividade de escavação dos besouros. **D.** Fruto sem presença dos besouros. **E-G.** Ovo, larva e pupa encontradas no mesocarpo do fruto. **H.** Escavação frontal em macho contendo material do fruto acumulado. **I.** Leveduras encontradas na escavação frontal do macho por microscopia eletrônica de varredura (MEV). **J-M.** Leveduras encontradas por MEV em diferentes ornamentações externas do corpo dos besouros. **N.** Leveduras observadas em mesocarpo do fruto infestado por besouros, em galerias ativas.



**Figura 2.** Abundância de leveduras encontradas nas diferentes técnicas de isolamento empregadas. **A.** Abundância encontrada na parte externa do corpo dos besouros. **B.** Abundância encontrada na parte interna do corpo dos besouros. **C.** Abundância encontrada nos frutos infestados por besouros. **D.** Abundância encontrada nos frutos submetidos à construção artificial de galerias. **E.** Frequência relativa de táxons de leveduras e fungos leveduriformes isolados a partir dos diferentes métodos empregados.



**Figura 3.** Predominância de *Cyberlindnera* sp. nos frutos infestados e preferência dos besouros aos metabólitos da levedura. **A.** Percentual de *Cyberlindnera* sp. em relação aos demais táxons fúngicos em plantas amostradas em diferentes localidades do estado de São Paulo. **B.** Equipamento utilizado na avaliação da preferência dos besouros. **C-D.** Preferência dos besouros aos metabólitos de *Cyberlindnera* sp. (os números absolutos de preferência são apresentados em parênteses). Sendo, Cy - *Cyberlindnera* sp. B56 (em extrato do fruto fermentado), Y - *Yamadazyma riverae* B343 (em extrato do fruto fermentado), E – Extrato dos frutos, C – Água estéril, N – Ausência de escolha, CE – Células de *Cyberlindnera* sp. B56 recuperadas e suspensas em PBS 1×, Cy/E – Extrato do fruto fermentado contendo células de *Cyberlindnera* sp. B56 e F/E – Extrato do fruto fermentado filtrado (sem células).



## Capítulo 4

### Polimorfismos em genes de rDNAs de *Cyberlindnera* sugerem eventos de evolução por *birth and death*<sup>3</sup>

#### 1. Introdução

Os genes que codificam o RNA ribossômico (rRNA) são amplamente utilizados na taxonomia moderna de leveduras e outros organismos (MARKMANN; TAUTZ, 2005; SCHÖCH et al., 2012; STOECK et al., 2014). Em eucariotos, os *tandem arrays* ribossômicos incluem a subunidade maior (LSU) contendo os 26/28S, 5.8S, e 5S rRNAs, a subunidade menor (SSU) contendo o 18S rRNA, além dos dois espaçadores internos transcritos (ITS1 e ITS2). Em leveduras, os domínios 1 e 2 (D1/D2) da subunidade 26S LSU e as regiões ITS1-5.8S-ITS2 são utilizadas como *barcodes* universais (KURTZMAN; ROBNETT, 1998; SCHÖCH et al., 2012; VU et al., 2016). Devido a sua função essencial de moléculas de rRNAs, presume-se que essas regiões sejam idênticas ou quase idênticas nas diferentes cópias de um organismo, em decorrência da evolução concertada (GANLEY; KOBAYASHI, 2007; HILLIS et al., 1991; HILLIS; DIXON, 1991).

Apesar desse tipo evolução, heterogeneidade entre cópias de rDNA foram encontradas em diferentes espécies de fungos e outros organismos (CARRANZA et al., 1996; LACHANCE et al., 2003; LI et al., 2013; MYLVAGANAM; DENNIS, 1992; ROSCINI et al., 2018; SIMON; WEIß, 2008; WANG et al., 1997). A presença de polimorfismos nos rDNA podem ser explicados por eventos de evolução por reticulação, hibridização e/ou recombinação (CHAND et al., 2016; SIPICZKI et al., 2013, 2018), e sua evolução impulsionada por outros modelos evolutivos, diferentes da evolução concertada, como mecanismos de *birth-and-death* (ROONEY, 2004; ROONEY; WARD, 2005; SIPICZKI et al., 2018), com duplicação, inativação ou deleção de genes (NEI; ROONEY, 2005).

Durante uma extensa busca por leveduras em frutos de *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.), uma árvore nativa do Brasil (MACÊDO et al., 2020), encontramos uma nova espécie de levedura com afinidades com o gênero *Cyberlindnera*. Frutos contendo essa

---

<sup>3</sup> O texto a seguir foi publicado em Bizarria Jr, R., de Castro Pietrobon, T., Ferreira, H., & Rodrigues, A. (2023b). Polymorphisms of rDNA genes in *Cyberlindnera* yeast suggest birth and death evolution events. *FEMS Yeast Research*, foad032.



levedura também eram infestados pelo besouro *Spermophthorus apuleiae*, um besouro associado a essa espécie de planta (SUESDEK; LIMA, 2011). A maioria dos isolados de *Cyberlindnera* sp. possuía um alto grau de heterogeneidade nas regiões de rRNA (69 de 70 isolados avaliados), sendo o primeiro caso desse fenômeno no clado *Cyberlindnera*. Os polimorfismos foram confirmados pelo sequenciamento das regiões que codificam os rRNAs em diferentes isolados dessa levedura. Esses polimorfismos podem estar relacionados a eventos de reticulação levando a diversificação dos rDNAs nessa particular espécie de levedura.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Crescimento e esporulação das leveduras**

As leveduras foram obtidas de frutos de *L. ferrea* (Mart. ex Tul.) infestadas com besouros *S. apuleiae* (Tabela S1) durante um período de dois anos. As culturas axênicas das leveduras foram crescidas em *Yeast Peptone Dextrose Agar* (YPD em g L<sup>-1</sup>: 10 extrato de levedura, 20 peptona, 20 dextrose e 15 ágar) por 2 dias antes da extração do DNA genômico. Quatro isolados foram selecionados para estudo dos polimorfismos das regiões de rDNA com base na sua fonte de isolamento, que inclui o corpo dos besouros (parte externa e interna), pela localidade das árvores hospedeiras (Tabela 1) e pela ausência de polimorfismos no caso do isolado B620 (com apenas um único nucleotídeo ambíguo nos rDNAs e seus espaçadores). O termo polimorfismo será utilizado daqui em diante para se referir a uma variação no rDNA entre isolados e heterogeneidade para se referir à variação entre cópias de rDNA de um único isolado.

Para investigar a sexualidade dessa espécie, a esporulação foi induzida pelo cultivo dos isolados em *Sodium Acetate Agar* (SAA in g L<sup>-1</sup>: 0.4 dextrose, 1.4 acetato de sódio e 15 g ágar; FOWELL, 1952), *Potassium Acetate Agar* (PAA in g L<sup>-1</sup>: 0.5 dextrose, 10 acetato de potássio, 1 extrato de levedura, e 15 g ágar), 5% *Malt Extract Agar* (KURTZMAN, 2011a). Os quatro isolados (*i.e.*, B56, B131, B350, B620) foram cultivados em culturas axênicas e pareadas (*i.e.*, em um total de 10 combinações) nos meios de cultivo. Placas foram incubadas por 14 dias, a 25 °C, e as células foram avaliadas com microscopia.

## 2.2. Extração de DNA, amplificação, clonagem e sequenciamento

O DNA genômico foi extraído seguindo o protocolo descrito em Sampaio et al. (2001), com modificações nas etapas de incubação e centrifugação. Aproximadamente 0.1 g de células foram suspensas em 500 µL de tampão de lise (Tris 50 mM, EDTA 50 mM, NaCl 250 mM e SDS 0.3%; pH 8) com acréscimo de 0.3 g esferas de vidro (425–600 µm, Sigma-Aldrich, St. Louis, MI). Células foram lisadas sob agitação durante 4 min a 2.500 RPM e incubadas a 65 °C durante 1 h. O procedimento foi repetido duas vezes. Os tubos foram centrifugados a 15.000 RPM (Eppendorf 5424) por 15 min e 400 µL foram transferidos para microtubos estéreis.

As regiões hipervariáveis (D1/D2) do gene LSU rRNA e da região ITS foram amplificadas, utilizando os pares de *primers* NL1/NL4 (NL-1: 5'-GCATATCAATAAGCGGAGGA, NL-4: 5'-TTGGTCCGTGTTTCAAGACG; KURTZMAN; ROBNETT, 1998) e ITS5/ITS4 (ITS-5: 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG, ITS-4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC; WHITE et al., 1990), respectivamente. As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas da seguinte forma: 8 mM dNTPs, tampão para 1×, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1U da *Taq polymerase* (Promega, Madison, WI), 0.4 µM *forward primer*, 0.4 µM *reverse primer* (IDT, Coralville, IW), 2-5 ng uL<sup>-1</sup> DNA diluído, e água ultrapura estéril para um volume final de 25 µL. As condições de PCR de cada conjunto de *primers* são as seguintes: NL1/NL4 – 96 °C por 3 min, 35 ciclos a 96 °C por 30 s, 61 °C por 45 s e uma etapa de extensão final a 72 °C por 1 min; ITS5/ITS4 – 96 °C por 3 min, 35 ciclos a 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min e uma etapa de extensão final a 72 °C por 2 min. Os *amplicons* foram purificados com o kit *Wizard™ SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Madison, WI), ligados ao vetor *pJET 1.2/blunt* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), e transformado em *Escherichia coli* linhagem DH10B.

Transformantes contendo os fragmentos alvos foram escolhidos e suas inserções foram verificadas em relação ao tamanho esperado para a amplificação com o par de *primers* original. O sequenciamento Sanger foi realizado utilizando o kit *BigDye® Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), seguindo as recomendações do fabricante, e os *amplicons* injetados no ABI 3500 *Series Genetic Analyzer* (Life Technologies, Carlsbad, CA). Sequências *forward* e *reverse* foram montadas em BioEdit v.7.2.5 (HALL, 1999). Sequências consenso foram depositadas no GenBank sob os acessos #OQ268217, #OQ253431, #OQ268178-

OQ268202, #OQ253418-OQ253427; e comparadas com sequências tipo similares depositadas no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) por BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

### 2.3. Análise filogenética

Utilizamos múltiplas abordagens filogenéticas para descrever a relação entre as sequências obtidas por clonagem dos diferentes isolados de *Cyberlindnera* sp. As regiões ITS1, 5.8S, e ITS2 foram extraídas pelo *software* ITSx (BENGTSSON-PALME et al., 2013). Sequências de cada partição (*i.e.*, ITS1, 5.8S, ITS2 e D1/D2) foram alinhadas com sequências de leveduras similares, utilizando o *software* MAFFT v.7. (KATO et al., 2019), com o alinhamento automático padrão (as métricas de cada alinhamento estão listadas na Tabela S2). Substituições e padrões de inserção/deleção foram identificados a partir dos alinhamentos das partições ITS1, ITS2 e LSU, entre os clones obtidos e as sequências do isolado B620 como referência.

Árvores filogenéticas de máxima verossimilhança (ML) foram reconstruídas com aproximação *bootstrap* ultrarrápida no *software* IQTREE2 (NGUYEN et al., 2015; o número de acesso das sequências utilizadas na análise filogenética estão listadas na Tabela S3). Os modelos de substituição de nucleotídeos foram calculados para cada conjunto usando o critério de informação bayesiano (BIC), seguindo protocolos padrões do IQ-TREE2 (modelos de cada partição estão listados na Tabela S2). Para cada reconstrução filogenética de ML, definimos 10.000 réplicas de *bootstrap* e 20.000 iterações. A relação filogenética também foi reconstruída usando análise de *Neighbor-joining*, com 1000 *bootstrap*, número de diferenças como critério e o modelo de substituição mais simples (ou seja, transições e transversões, com taxas uniformes). As árvores finais foram editadas nos *softwares* FigTree v.1.4.3 (RAMBAUT, 2016) e TreeGraph 2.15.0-887 (STÖVER et al., 2010), utilizando a topologia da reconstrução ML. A análise de rede filogenética foi realizada utilizando o *software* SplitsTree4 (HUSON; BRYANT, 2006) utilizando os *splits* gerados pelo IQTREE2 (NGUYEN et al., 2015) e a interação entre clones foi explorada graficamente usando *Cluster networks* com configuração de ângulo igual.

## 2.4. Análise estrutural de rRNA

Para confirmar se os polimorfismos codificam alterações nas estruturas secundárias das moléculas de rRNA, as *hairpin loops* foram preditas para ambas as regiões, ITS e LSU, usando os parâmetros padrões no *software* RNAstructure 6.4 (MATHEWS, 2014). A predição de estrutura do rRNA foi realizada dobrando-se a 37 °C (ou seja, 310,15 K) e com 30 nucleotídeos não pareados como tamanho máximo de alças internas e protuberantes, que são considerados parâmetros padrões e de relevância biológica (MATHEWS, 2006). Estruturas da região ITS (*i.e.*, ITS1-5.8S-ITS2) foram preditas em conjunto. O isolado B620 foi excluído dessa análise, uma vez que contém um único nucleotídeo ambíguo em ambas as regiões ITS e D1/D2.

## 2.5. Análise estatística

Para confirmar se a recombinação poderia ser um fator relevante na evolução das diferentes partições, uma análise estatística foi realizada utilizando o pacote de análises do *software* PhiPack (BRUEN; BRUEN, 2005), que inclui o *Pairwise Homoplasy Index*, *Maximum  $\chi^2$* , e *Neighbour Similarity Score*. Todas as análises foram realizadas usando os parâmetros padrões. Para identificar as homoplasias, calculamos o *Consistency Index* (CI) de cada posição no alinhamento de cada partição utilizando os parâmetros padrões do *software* HomoplasyFinder (CRISPELL et al., 2019). Valores de CI inferiores a 0,5 foram considerados como significativos para homoplasia.

## 3. Resultados

Em frutos de *L. ferrea* (Mart. ex Tul.) infestados por brocas *S. apuleiae*, encontramos uma levedura ainda não descrita contendo heterogeneidades nos genes do rDNA. As análises filogenéticas indicam que essa levedura é filogeneticamente relacionada aos gêneros *Cyberlindnera* e *Wickerhamomyces* (Fig. 1). A afinidade filogenética com *Cyberlindnera* se mantém para ambas as reconstruções de ML e NJ (Fig. 1, Fig. S1-S4) e, portanto, para fins taxonômicos neste estudo, nós a identificamos como uma nova espécie de *Cyberlindnera*, mas futuros esforços taxonômicos são necessários para avaliar se trata de um gênero novo. As reconstruções filogenéticas de cada partição indicam incongruência da posição da espécie e outras espécies de

*Cyberlindnera* spp. (Fig. S2-S4). Os *amplicons* das regiões D1/D2 e ITS revelaram que uma cepa de uma coleção de 70 não possuía heterogeneidades em ambas as regiões. Um total de 35 clones de rDNA foi obtido de três isolados provenientes do corpo dos besouros e das galerias dos frutos: 10 clones de D1/D2 e 25 de ITS. Padrões de inserção, deleção e substituição foram observados entre os clones, exceto para o isolado B620, o qual possuía somente uma posição ambígua em cada região analisada. Culturas axênicas e pareadas nos ensaios de esporulação revelaram que o estado sexual dessa espécie em meio MA5%, apresenta ascósporos no formato *hat-shaped* na maioria das combinações avaliadas (Fig. S5).

Incongruências entre sequências variam de 0 a 18 polimorfismos de nucleotídeos em um total de 591 posições para a região D1/D2, de 0 a 17 de um total de 192 para ITS1, de 0 a 3 de um total de 158 para 5.8S, e de 0 a 15 de um total de 220 para ITS2 (Fig. S6). Em alguns casos, diferenças entre clones atingem até 3% na região D1/D2, 8,8% e 6,8% entre clones do mesmo isolado para ITS1 e ITS2, respectivamente. Regiões variáveis foram observadas em todas as partições (Tabela S4), exceto para a região 5.8S, que é muito conservada entre clones e com substituições únicas em poucas posições. Os clones se agrupam em diferentes *clusters*, tanto nas árvores filogenéticas, quanto nas redes (Fig. 2-4). Enquanto alguns ramos indicam as divergências entre as linhagens, alguns agrupamentos incluem clones de diferentes isolados, indicando uma similaridade inter-genômica entre as sequências de rDNA. Agrupamentos obtidos nas árvores também foram observados nas redes (Fig. 2-4), interligados por arestas de rede, por vezes paralelas formando estruturas de caixa (Fig. 2-4), ao invés de padrões bifurcados comumente observados em árvores filogenéticas.

As redes apresentaram interações entre clones de diferentes isolados e que podem estar associados a processos evolutivos por reticulação, ao invés de diversificação com padrões de bifurcação. Tais resultados também são estatisticamente suportados para a região D1/D2 em todos os testes ( $P < 0,05$ ; Tabela S5). Enquanto, para ITS1 e ITS2, apenas alguns dos testes indicam a chance de eventos de reticulação ( $P < 0,05$ ; Tabela S5). Homoplasia também é uma alternativa que explica as variantes ao longo dos alinhamentos de ITS1, ITS2 e LSU rDNAs (Tabela S6; *i.e.*, com *consistency index* abaixo de 0,5). Em relação às estruturas secundárias de rRNAs, foram observadas diferenças nos *hairpin loops* dos clones (exemplos nas Fig. 2-4). Mesmo clones que formam um agrupamento coeso nas análises filogenéticas apresentam diferenças em estruturas preditas (Fig. 2-4, estruturas completas nas Fig. S7-8, Tabelas S7-8). Em

alguns casos, posições variáveis dobram-se em estruturas comuns de gancho, formando domínios estruturais conservados com alterações discretas (Fig. 3-4), mas com a forma geral das estruturas de rRNAs alterada (Fig. S7-8). Em outros casos, locais variáveis entre clones dobram-se formando estruturas alteradas (Fig. 2). A predição de estruturas de ITS1-5.8-ITS2 indica que a região ITS2 se dobra em estruturas mais conservadas em relação a ITS1 (Fig. 3, Fig. S7), mesmo considerando as incompatibilidades entre os clones (Fig. S6). Isso também foi observado para a região D2 do LSU, que é mais conservada em relação à região D1 (Fig. 4, Fig. S8).

#### 4. Discussão

Polimorfismos e regiões ambíguas em rDNAs são frequentemente encontrados em diferentes formas de vida (CARRANZA et al., 1996; MYLVAGANAM; DENNIS, 1992; WANG et al., 1997), incluindo fungos (LACHANCE et al., 2003; LI et al., 2013). Nesse estudo, relatamos polimorfismos em *Cyberlindnera* sp. com diferentes versões não idênticas de domínios de genes de rDNAs e seus espaçadores internos, impulsionados por eventos de reticulação. Essa heterogeneidade contradiz os resultados esperados de similaridade entre unidades de genes *tandem arrays* guiados por evolução concertada (LIAO, 1999), com seleção purificadora por *crossover* desigual ou outros mecanismos de conversão genética (LIAO et al. 1997; NEI; ROONEY, 2005; SMITH, 1976). As diferenças entre clones variam de 3 a 8,8%, excedendo os limites taxonômicos sugeridos para delimitar espécies de leveduras (*i.e.*, usualmente 1% para LSU e 1,59% para ITS; KURTZMAN; ROBNETT, 1998, VU et al., 2016). Nossos resultados reforçam a presença de variações em algumas linhagens do subfilo *Saccharomycotina*, incluindo *Ogataea uvarum* com 3,1% e 5% nos espaçadores ITS1 e ITS2, respectivamente (ROSCINI et al., 2018), *Pichia membranifaciens* com 15,6% e 20,5% nos espaçadores ITS1 e ITS2, respectivamente (WU et al., 2016) e *Metschnikowia* spp. com 3,6% e 5% no D1/D2 (SIPICZKI et al., 2013) e 14,7% no ITS (SIPICZKI et al., 2018). As diferenças entre as regiões ITS1 e ITS2 foram previamente abordadas em fungos (MULLINEUX; HAUSNER, 2009) e outros eucariotos (HERSHKOVITZ; ZIMMER, 1996). Nossos dados também sugerem diferenças de taxas evolutivas entre ITS1 e ITS2, com dissimilaridades entre clones (8,8% e 6,8%, respectivamente), porém com um dobramento estrutural mais conservado de estruturas de ITS2 em relação a ITS1. Os polimorfismos e heterogeneidades interferem na

resolução e reconstrução de relações filogenéticas e que podem ser intensificadas por eventos de reticulação e homoplasia.

A hibridização entre espécies e trocas genômicas são eventos importantes na evolução de leveduras (MORALES; DUJON, 2012), levando a processos moleculares que podem incluir, no caso de repetições de unidades de rDNAs, a aquisição unilateral de genes (*Pichia sorbitophila*, LOUIS et al., 2012) ou inerência de duas unidades repetidas de ambos os parentais (*Zygosaccharomyces rouxii*, GORDON; WOLFE, 2008). Interações insetos-levedura foram previamente indicadas por favorecer eventos de hibridização e acasalamento (REUTER et al., 2007; SEIKE et al., 2021; STEFANINI et al., 2016), como uma recompensa benéfica para as leveduras. Apesar de *Cyberlindnera* sp. estar frequentemente associada com o besouro *S. apuleiae*, em frutos de *L. ferrea* (Mart. ex Tul.), a ecologia dessa interação ainda é elusiva. Considerando os rearranjos das unidades de rDNAs em leveduras híbridas e a recorrência das associações com insetos, sugerimos a hipótese de que o estado sexual de *Cyberlidnera* sp. encontrada nesse estudo pode estar relacionada aos polimorfismos de rDNAs e sua interação com o inseto, o que deve ser futuramente investigado. Alternativamente, as variedades de rDNAs também poderiam ser explicadas por diferentes intensidades de seleção purificadora, permitindo o acúmulo de variantes de rRNAs presumidamente inativas no genoma da levedura. As variações de rDNA também podem ser causadas por homoplasia, devido à convergência ou paralelismo das unidades de rDNAs, como previamente evidenciado para outros fungos (O'DONNELL et al., 1998), sendo processos que podem interferir na acurácia de inferências filogenéticas.

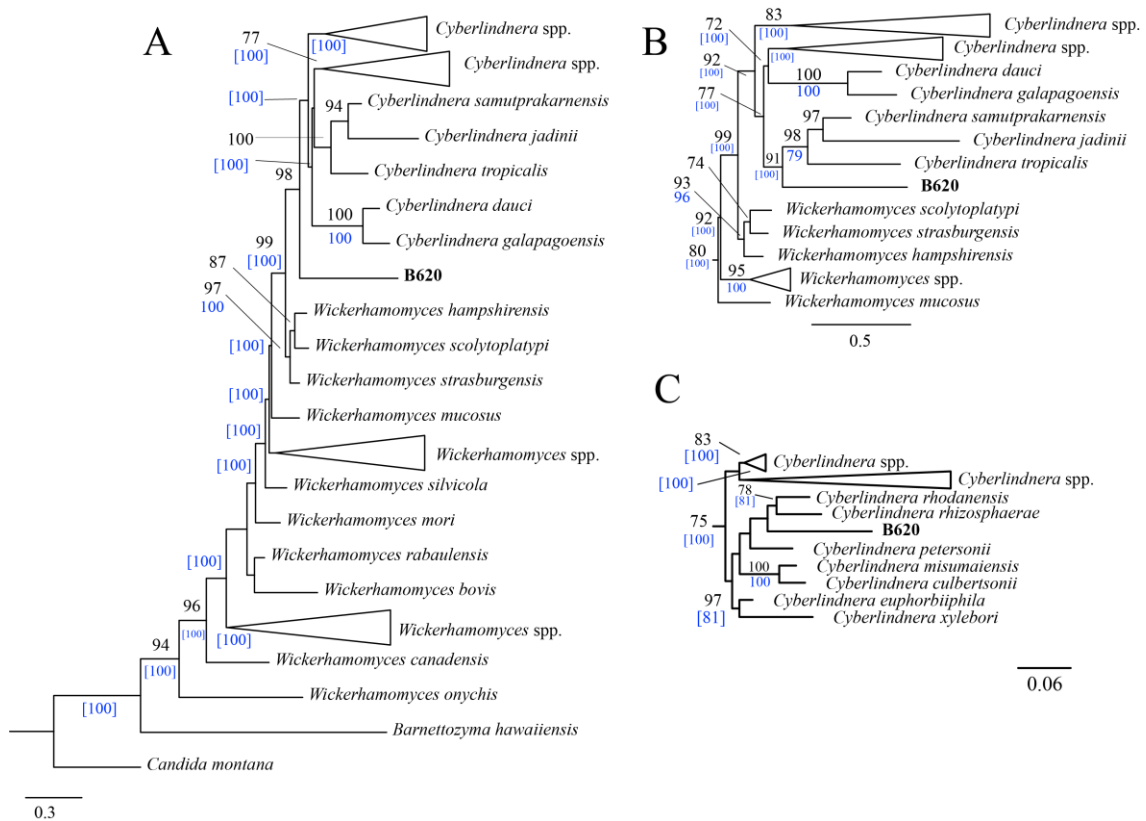
As diferenças observadas entre as estruturas preditas de rRNA dos diferentes clones, variam, com regiões conservadas e com poucas variações, até grandes variações na conformação da estrutura completa. Conforme previamente questionado por Sipiczki et al. (2013), rRNAs múltiplos e diversos podem resultar em redução de *fitness* e, uma hipótese é que as variantes divergentes possam remanesecer silenciadas e não-funcionais. Uma importante premissa dessa hipótese é que em *Saccharomyces cerevisiae* (um organismo modelo) nem todas as cópias de rRNAs são ativamente transcritas (DAMMANN et al., 1993; French et al. 2003) e cópias nucleossômicas de rRNA são inativas (DAMMANN et al., 1993). A seleção purificadora e evolução concertada podem explicar a evolução de genes essenciais, como os rDNAs, mantendo a uniformidade (LIAO, 1999; NEI; ROONEY, 2005). Entretanto, em alguns casos os rDNAs também podem ser fragmentados, contendo pseudogenes (*i.e.*, como o caso de

*Metschnikowia fructicola*, SIPICZKI et al., 2018), que pode ser explicado por outros mecanismos evolutivos, como os de *birth-and-death*. A estruturas de rRNAs variáveis preditas para *Cyberlindnera* sp. sugere que os rDNAs estão sujeitos a mecanismos outros que a evolução concertada, por exemplo, modelos de *birth-and-death*, com manutenção de duplicatas que podem ser inativadas por mutações deletérias formando pseudogenes não funcionais. Nossos resultados indicam que posições variáveis, por inserção, deleção e substituição podem modificar as estruturas secundárias de rRNAs, ou manter as estruturas conservadas no dobramento (como em alguns casos de *hairpin loops*). Futuramente, novos esforços no estudo da organização desses genes, utilizando sequenciamento genômico de alta qualidade, permitirão avançar nossa compreensão da origem e evolução de polimorfismos de rDNAs em leveduras e outros eucariotos.

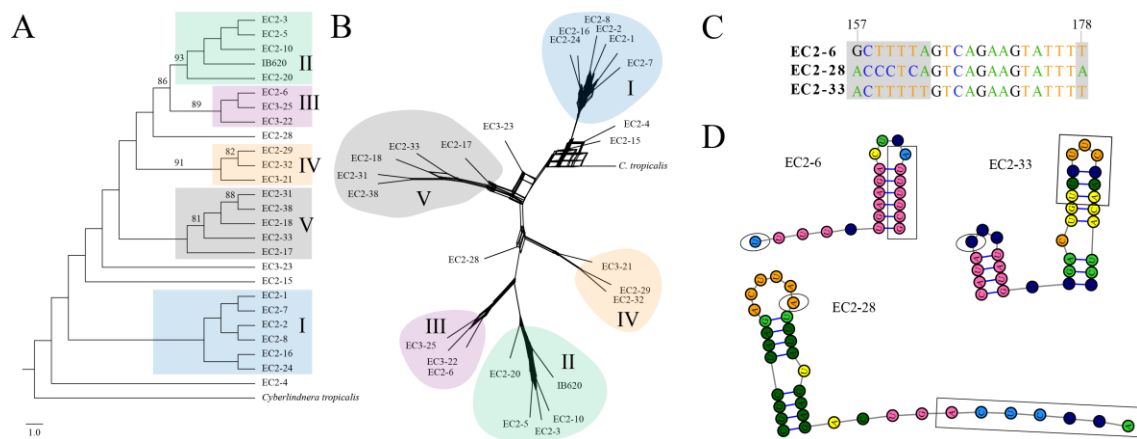


## 5. Figuras

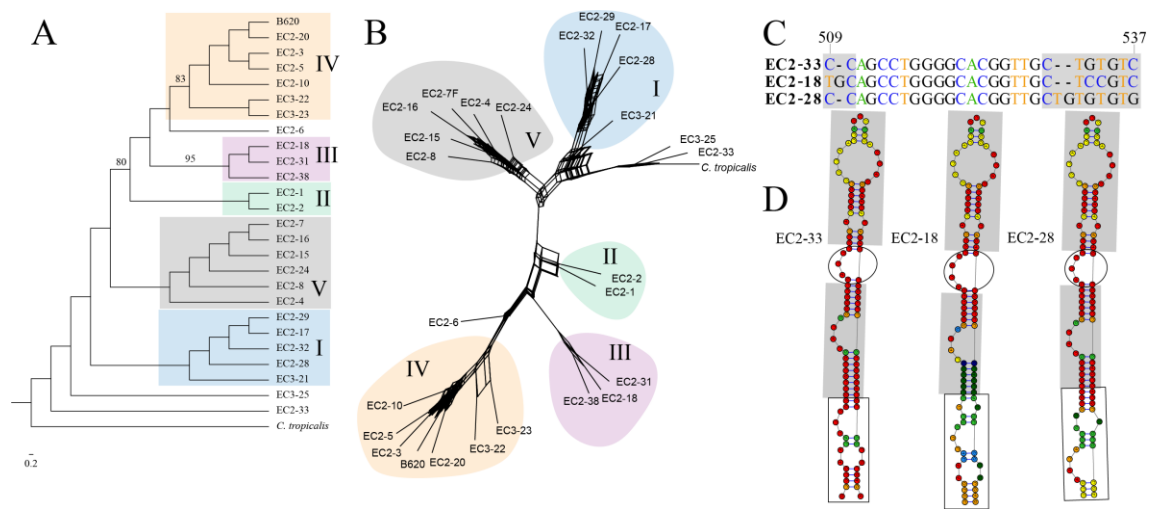
**Figura 1.** Posicionamento filogenético de *Cyberlindnera* sp. B620 (em negrito) baseado em ITS (*i.e.*, ITS1, 5.8S, and ITS2) e LSU, como partições. **A.** Filogenia inferida com 1430 nucleotídeos no alinhamento final (74 sequências). Árvore inferida com critérios de máxima verossimilhança (ML) e *neighbor-joining* (NJ). A inferência ML foi selecionada como topologia principal. Os valores de suporte de *bootstrap* ML e NJ (em azul) são apresentados acima e abaixo dos ramos, respectivamente. Para fins gráficos, apenas os *bootstraps* superiores a 80 foram apresentados e alguns ramos da árvore foram colapsados. Para a reconstrução ML, 225 iterações foram examinadas e a probabilidade logarítmica (*i.e.*, LogL) da árvore consenso foi de -21.801,273. *Candida montana* foi definida como grupo externo. **B.** Uma sessão da filogenia com posicionamento de *Cyberlindnera* sp. B620 baseado em ITS (*i.e.*, ITS1, 5.8S, and ITS2) como partição. A filogenia foi inferida com 809 nucleotídeos no alinhamento final (66 sequências). Para a reconstrução ML, 150 iterações foram examinadas, e um LogL de -14126.921 foi obtido. **C.** Uma sessão da filogenia com posicionamento de *Cyberlindnera* sp. B620 baseado em LSU. A filogenia foi inferida com 621 nucleotídeos no alinhamento final (74 sequências). Para a reconstrução ML, 351 iterações foram examinadas e um LogL de -7360.203 foi obtido. Versões completas das filogenias apresentadas em A-C podem ser encontradas no material de apoio, Fig. S1-S3.



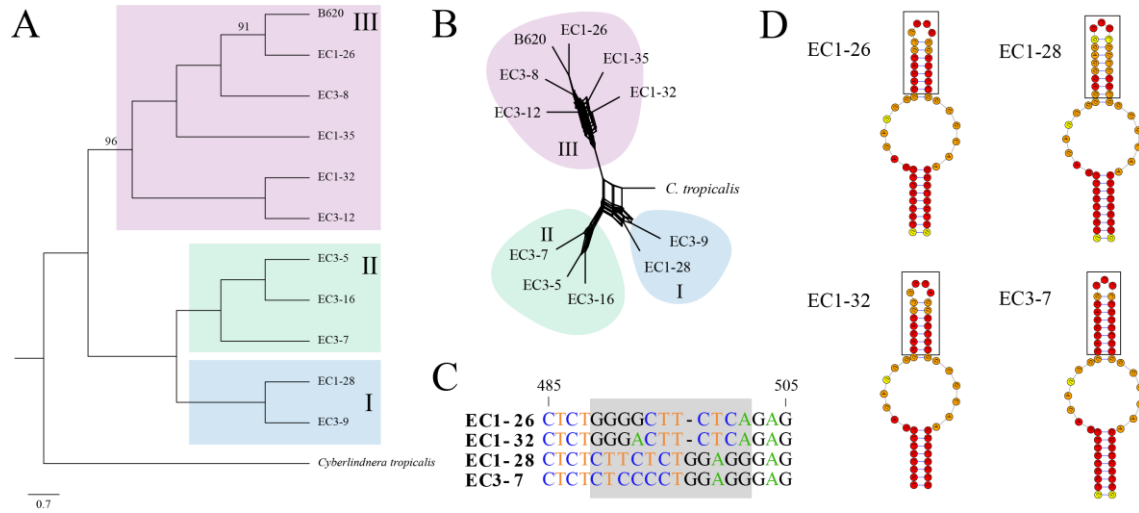
**Figura 2.** Análise filogenética e estrutural comparativa da região ITS1 dos clones de *Cyberlindnera* sp. **A.** Árvore filogenética de clones obtidos de *Cyberlindnera* sp. apresentando cinco agrupamentos. **B.** Rede filogenética dos clones. **C.** Posições variáveis do rDNA (região 157-178, Tabela S4), destacadas em cinza no alinhamento. **D.** Exemplos de estruturas de rRNA com posições variáveis de ITS1 (*i.e.*, elipses e quadrados sequeem as regiões marcadas em cinza em C). Cores indicam limites de probabilidade de acordo com a predição da estrutura do rRNA (sendo: 99% em vermelho, 95% em laranja, 90% em amarelo, 80% em verde escuro, 70% em verde claro, 60% em azul claro, 50% em azul escuro, 0% em rosa). Exemplos de estruturas completas são apresentados na Fig. S7.



**Figura 3.** Análise filogenética e estrutural comparativa da região ITS2 dos clones de *Cyberlindnera* sp. **A.** Árvore filogenética de clones obtidos de *Cyberlindnera* sp. apresentando cinco agrupamentos. **B.** Rede filogenética dos clones. **C.** Posições variáveis do rDNA (região 509-537, Tabela S4), destacadas em cinza no alinhamento. **D.** Exemplos de estruturas de rRNA com posições variáveis de ITS2. Elipses e quadrados indicam alterações na forma dos *hairpin loops* e destaques em cinza indicam posições preservadas da estrutura de rRNA. Cores indicam limites de probabilidade de acordo com a predição da estrutura do rRNA (sendo: 99% em vermelho, 95% em laranja, 90% em amarelo, 80% em verde escuro, 70% em verde claro, 60% em azul claro, 50% em azul escuro). Exemplos de estruturas completas são apresentados na Fig. S7.



**Figura 4.** Análise filogenética e estrutural comparativa do domínio D1/D2 dos clones de *Cyberlindnera* sp. **A.** Árvore filogenética de clones obtidos de *Cyberlindnera* sp. apresentando três agrupamentos. **B.** Rede filogenética dos clones. **C.** Posições variáveis do rDNA (região 485-505, Tabela S4), destacadas em cinza no alinhamento. **D.** Exemplos de estruturas de rRNA com posições variáveis de LSU (destaques com quadrados seguem a região em C.), com alterações discretas na forma das pontas dos *hairpin loops*. Cores indicam limites de probabilidade de acordo com a predição da estrutura do rRNA (sendo: 99% em vermelho, 95% em laranja, 90% em amarelo). Exemplos de estruturas completas são apresentados na Fig. S8.



## CONCLUSÃO

Nesse estudo, exploramos dois modelos de interações inseto-levedura, os jardins de fungo de formigas atíneas e os besouros associados aos frutos de pau-ferro. Nossos resultados indicam que os jardins de fungo abrigam uma grande diversidade de leveduras oriundas do forrageamento das formigas, e que as comunidades de leveduras são dissimilares mesmo entre colônias da mesma espécie de formiga. Nos jardins de fungo, identificamos que algumas leveduras produzem toxinas antifúngicas, com atividade frente a uma coleção de leveduras sensíveis, que incluem leveduras patogênicas de interesse clínico. Em particular, em um isolado de *Candida sinolaborantium*, identificamos elementos codificadores de uma nova toxina por mineração genômica, que possui similaridade com toxinas codificadas por elementos de dsRNA em *Saccharomyces cerevisiae*. Futuramente, as toxinas poderão ser uma alternativa aos medicamentos empregados no combate de infecções fúngicas, que por vezes são ineficazes frente a patógenos resistentes. Durante a busca por leveduras associadas a insetos, identificamos uma nova interação entre uma espécie endofítica de *Cyberlindnera* e um besouro que infesta os frutos de pau-ferro. Observamos que a levedura produz metabólitos voláteis atrativos e distinguíveis pelos besouros, e que aumentam em densidade no fruto em decorrência da escavação de galerias pelos besouros. Além disso, observamos que a levedura possui rearranjos nos genes ribossomais, e que acreditamos ser resultado da interação com os besouros. De modo geral, expandimos nosso conhecimento sobre a ecologia e evolução de interações inseto-levedura, e os resultados encorajam a investigação de novas interações na prospecção de leveduras de interesse biotecnológico.

## APÊNDICE

### Capítulo 1 - Explorando a comunidade de leveduras associada a jardins de fungo de formigas cultivadoras de fungos

**Tabela S1.** Dados das colônias de formigas. Para colônias de *Acromyrmex coronatus*, jardins novos e antigos são indicados como N e O, respectivamente. Um total de 50 amostras de jardim de fungos foi utilizado para cultivo.

| Colônia     | Espécie de formiga                        | Coordenadas   |              | Cidade-Estado               |
|-------------|-------------------------------------------|---------------|--------------|-----------------------------|
| RB190909-01 | <i>Acromyrmex coronatus</i> <sup>NO</sup> | S22°23'41.5"  | W47°32'42.2" | Rio Claro - SP <sup>1</sup> |
| RB190919-01 | <i>Acromyrmex coronatus</i> <sup>NO</sup> | S22°23'40.7"  | W47°32'44.0" | Rio Claro - SP              |
| RB191007-01 | <i>Acromyrmex coronatus</i> <sup>NO</sup> | S22°23'43.7"  | W47°32'44.5" | Rio Claro - SP              |
| RB200104-01 | <i>Acromyrmex coronatus</i> <sup>NO</sup> | S22°22'35.7"  | W46°55'37.4" | Mogi-Guaçu - SP             |
| RB200104-02 | <i>Acromyrmex coronatus</i> <sup>NO</sup> | S22°22'35.1"  | W46°55'37.6" | Mogi-Guaçu - SP             |
| RB200104-03 | <i>Acromyrmex coronatus</i> <sup>NO</sup> | S22°22'34.7"  | W46°55'37.8" | Mogi-Guaçu - SP             |
| RB200104-04 | <i>Acromyrmex coronatus</i> <sup>NO</sup> | S22°22'35.5"  | W46°55'37.2" | Mogi-Guaçu - SP             |
| RB200507-01 | <i>Acromyrmex coronatus</i> <sup>N</sup>  | S22°23'43.2"  | W47°32'44.9" | Rio Claro - SP              |
| RB200507-02 | <i>Acromyrmex coronatus</i> <sup>O</sup>  | S22°23'45.7"  | W47°32'44.2" | Rio Claro - SP              |
| RB200507-03 | <i>Acromyrmex coronatus</i> <sup>NO</sup> | S22°23'45.5"  | W47°32'43.8" | Rio Claro - SP              |
| AR201207-01 | <i>Mycetomoellerius tucumanus</i>         | S22°23'33.2"  | W47°32'38.8" | Rio Claro - SP              |
| AR201207-02 | <i>Mycetomoellerius tucumanus</i>         | S22°23'33.1"  | W47°32'38.9" | Rio Claro - SP              |
| AR201207-03 | <i>Mycetomoellerius tucumanus</i>         | S22°23'33.1"  | W47°32'38.7" | Rio Claro - SP              |
| LV201207-01 | <i>Mycetomoellerius tucumanus</i>         | S22°23'33.0"  | W47°32'38.8" | Rio Claro - SP              |
| RB201207-01 | <i>Mycetomoellerius tucumanus</i>         | S22°23'33.1"  | W47°32'38.9" | Rio Claro - SP              |
| RB201207-02 | <i>Mycetomoellerius tucumanus</i>         | S22°23'33.01" | W47°32'38.9" | Rio Claro - SP              |
| RB201207-03 | <i>Mycetomoellerius tucumanus</i>         | S22°23'33.0"  | W47°32'38.8" | Rio Claro - SP              |
| RB201207-04 | <i>Mycetomoellerius tucumanus</i>         | S22°23'32.9"  | W47°32'38.8" | Rio Claro - SP              |
| AR210126-01 | <i>Mycetophylax</i> sp.                   | S22°27'16.6"  | W44°36'30.5" | Itatiaia - RJ <sup>2</sup>  |
| AR210126-02 | <i>Mycetophylax</i> sp.                   | S22°27'18.6"  | W44°36'31.8" | Itatiaia - RJ               |
| AR210126-03 | <i>Mycetophylax</i> sp.                   | S22°27'17.7"  | W44°36'33.7" | Itatiaia - RJ               |
| AR210126-04 | <i>Mycetophylax</i> sp.                   | S22°27'17.5"  | W44°36'34.7" | Itatiaia - RJ               |
| AR210126-05 | <i>Mycetophylax</i> sp.                   | S22°27'17.5"  | W44°36'33.8" | Itatiaia - RJ               |
| PK210126-03 | <i>Mycetophylax</i> sp.                   | S22°27'19.3"  | W44°36'36.1" | Itatiaia - RJ               |
| PK210128-01 | <i>Mycetophylax</i> sp.                   | S22°27'17.6"  | W44°36'33.4" | Itatiaia - RJ               |
| RB210126-02 | <i>Mycetophylax</i> sp.                   | S22°27'17.9"  | W44°36'33.6" | Itatiaia - RJ               |
| AR210127-02 | <i>Apterostigma</i> sp.                   | S22°27'18.5"  | W44°36'28.8" | Itatiaia - RJ               |
| RB210126-03 | <i>Apterostigma</i> sp.                   | S22°27'15.9"  | W44°36'25.9" | Itatiaia - RJ               |
| RB210430-04 | <i>Mycocepurus goeldii</i>                | S22°55'23.3"  | W48°14'42.3" | Anhembi - SP                |
| RB210501-06 | <i>Mycocepurus goeldii</i>                | S22°55'29.5"  | W48°14'37.1" | Anhembi - SP                |
| RB210430-13 | <i>Mycocepurus goeldii</i>                | S22°55'27.3"  | W48°14'38.5" | Anhembi - SP                |
| RB210501-03 | <i>Mycocepurus goeldii</i>                | S22°55'28.3"  | W48°14'38.0" | Anhembi - SP                |

|             |                             |              |              |              |
|-------------|-----------------------------|--------------|--------------|--------------|
| RB210501-04 | <i>Mycocephalus goeldii</i> | S22°55'28.9" | W48°14'37.4" | Anhembi - SP |
| RB210430-05 | <i>Mycocephalus goeldii</i> | S22°55'24.0" | W48°14'41.6" | Anhembi - SP |
| RB210501-12 | <i>Mycocephalus goeldii</i> | S22°55'31.1" | W48°14'36.4" | Anhembi - SP |
| RB210501-05 | <i>Mycocephalus goeldii</i> | S22°55'29.1" | W48°14'37.5" | Anhembi - SP |
| RB210430-06 | <i>Mycocephalus goeldii</i> | S22°55'24.0" | W48°14'41.6" | Anhembi - SP |
| RB210501-11 | <i>Mycocephalus goeldii</i> | S22°55'31.1" | W48°14'36.4" | Anhembi - SP |
| RB210430-03 | <i>Mycocephalus goeldii</i> | S22°55'23.1" | W48°14'42.9" | Anhembi - SP |
| RB210430-02 | <i>Mycocephalus goeldii</i> | S22°55'21.2" | W48°14'44.5" | Anhembi - SP |
| RB210430-11 | <i>Mycocephalus goeldii</i> | S22°55'25.2" | W48°14'40.6" | Anhembi - SP |
| RB210501-02 | <i>Mycocephalus goeldii</i> | S22°55'27.9" | W48°14'38.1" | Anhembi - SP |

---

<sup>1</sup>SP: Estado de São Paulo

<sup>2</sup>RJ: Estado do Rio de Janeiro

**Tabela S2.** Leveduras e fungos leveduriformes recuperados de jardins de fungos de diferentes formigas cultivadoras. O número de isolados obtidos é mostrado em cada fungicultura, juntamente com o número de colônias de formigas nas quais cada espécie foi encontrada (entre parênteses). Jardins novos de *Acromyrmex coronatus* (AcN), jardins velhos de *Acromyrmex coronatus* (AcO), *Mycetomoellerius tucumanus* (Mt), *Mycetophylax* sp. (Ms), *Mycocephurus goeldii* (Mg) e *Apterostigma* sp. (Apto).

| Posição taxonômica       | Cepa  | Espécie                           | AcN    | AcO   | Mt    | Ms     | Mg     | Apto |
|--------------------------|-------|-----------------------------------|--------|-------|-------|--------|--------|------|
| <i>Ascomycota</i>        |       |                                   |        |       |       |        |        |      |
| <i>Coniochaetales</i>    |       |                                   |        |       |       |        |        |      |
| <i>Coniochaetaceae</i>   |       |                                   |        |       |       |        |        |      |
|                          | YA110 | <i>Coniochaeta</i> sp.            | 0      | 0     | 0     | 0      | 2 (2)  | 0    |
| <i>Dothideales</i>       |       |                                   |        |       |       |        |        |      |
| <i>Sacotheciaceae</i>    |       |                                   |        |       |       |        |        |      |
|                          | YA47  | <i>Aureobasidium leucospermi</i>  | 0      | 0     | 2 (1) | 0      | 65 (3) | 0    |
|                          | YA48  | <i>Aureobasidium namibiae</i>     | 0      | 0     | 1 (1) | 0      | 0      | 0    |
|                          | YA37  | <i>Aureobasidium thailandense</i> | 1 (1)  | 0     | 0     | 0      | 0      | 0    |
| <i>Helotiales</i>        |       |                                   |        |       |       |        |        |      |
| <i>Tympanidaceae</i>     |       |                                   |        |       |       |        |        |      |
|                          | YA6   | <i>Vexillomyces</i> sp.           | 1 (1)  | 2 (1) | 0     | 0      | 0      | 0    |
| <i>Hypocreales</i>       |       |                                   |        |       |       |        |        |      |
| <i>Bionectriaceae</i>    |       |                                   |        |       |       |        |        |      |
|                          | YA41  | <i>Stilbocrea walteri</i>         | 0      | 1 (1) | 0     | 0      | 0      | 0    |
| <i>Saccharomycetales</i> |       |                                   |        |       |       |        |        |      |
| <i>Debaryomycetaceae</i> |       |                                   |        |       |       |        |        |      |
|                          | YA18  | <i>Meyerozyma caribbica</i>       | 3 (2)  | 1 (1) | 0     | 0      | 0      | 0    |
|                          | YA11  | <i>Meyerozyma carpophila</i>      | 1 (1)  | 0     | 0     | 0      | 0      | 0    |
|                          | YA16  | <i>Meyerozyma guilliermondii</i>  | 10 (1) | 0     | 0     | 0      | 0      | 0    |
|                          | YA42  | <i>Priceomyces</i> sp.            | 1 (1)  | 0     | 0     | 0      | 0      | 0    |
|                          | YA73  | <i>Scheffersomyces</i> sp.        | 0      | 0     | 0     | 20 (3) | 0      | 0    |



*Dipodascaceae*

Incertae sedis

|       |                                                            |        |        |        |        |        |       |
|-------|------------------------------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|
| YA17  | <i>Yarrowia lipolytica</i>                                 | 11 (1) | 1 (1)  | 0      | 0      | 0      | 0     |
| YA29  | <i>Candida albicans</i>                                    | 1 (1)  | 0      | 0      | 0      | 0      | 0     |
| YA50  | <i>Candida blattae</i>                                     | 0      | 0      | 0      | 8 (1)  | 0      | 1 (1) |
| YA1   | <i>Candida margitis</i>                                    | 29 (1) | 0      | 0      | 0      | 0      | 0     |
| YA14  | <i>Candida orthopsilosis</i>                               | 8 (1)  | 49 (1) | 0      | 0      | 0      | 0     |
| YA81  | <i>Candida parapsilosis</i>                                | 0      | 0      | 0      | 0      | 2 (2)  | 0     |
| YA21  | <i>Candida railenensis</i>                                 | 11 (1) | 9 (2)  | 0      | 0      | 28 (1) | 0     |
| YA56  | <i>Candida sinolaborantium</i>                             | 0      | 0      | 0      | 1 (1)  | 0      | 0     |
| YA46  | <i>Candida</i> sp. (closest to <i>C. intermedia</i> )      | 3 (1)  | 0      | 0      | 0      | 0      | 0     |
| YA51  | <i>Candida</i> sp. (closest to <i>C. membranifaciens</i> ) | 0      | 0      | 0      | 13 (1) | 0      | 0     |
| YA52  | <i>Candida</i> sp. (closest to <i>C. auris</i> )           | 0      | 0      | 0      | 1 (1)  | 0      | 0     |
| YA57  | <i>Candida</i> sp. (closest to <i>C. temnochilae</i> )     | 0      | 0      | 0      | 5 (2)  | 0      | 0     |
| YA59  | <i>Candida</i> sp. (closest to <i>C. vriesiae</i> )        | 0      | 0      | 0      | 7 (1)  | 0      | 2 (1) |
| YA60  | <i>Cyberlindnera</i> sp.                                   | 0      | 0      | 0      | 1 (1)  | 0      | 0     |
| YA24  | <i>Diutina catenulata</i>                                  | 9      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0     |
| YA63  | <i>Hyphopichia burtonii</i>                                | 0      | 0      | 18 (2) | 0      | 0      | 0     |
| YA64  | <i>Hyphopichia</i> sp.                                     | 0      | 0      | 0      | 1 (1)  | 0      | 0     |
| YA66  | <i>Kodamaea ohmeri</i>                                     | 0      | 0      | 0      | 7 (1)  | 0      | 0     |
| YA109 | <i>Limtongozyma cylindracea</i>                            | 0      | 0      | 0      | 3 (1)  | 0      | 0     |
| YA111 | <i>Limtongozyma</i> sp.                                    | 0      | 0      | 0      | 7 (2)  | 0      | 0     |
| YA2   | <i>Starmerella bombicola</i>                               | 0      | 5 (1)  | 0      | 0      | 0      | 0     |
| YA35  | <i>Starmerella etchellsii</i>                              | 63 (1) | 0      | 0      | 0      | 0      | 0     |
| YA36  | <i>Starmerella meliponinorum</i>                           | 4 (1)  | 0      | 0      | 0      | 0      | 0     |
| YA4   | <i>Starmerella</i> sp.                                     | 5 (2)  | 0      | 0      | 0      | 0      | 0     |

|                           |                   |                                        |       |       |       |        |       |        |
|---------------------------|-------------------|----------------------------------------|-------|-------|-------|--------|-------|--------|
|                           | YA8               | <i>Starmerella</i> sp.                 | 3 (1) | 0     | 0     | 0      | 0     | 0      |
|                           | YA49              | <i>Yamadazyma paraaseri</i>            | 0     | 0     | 0     | 1 (1)  | 0     | 0      |
|                           | YA58              | <i>Yamadazyma</i> sp.                  | 0     | 0     | 0     | 7 (1)  | 0     | 2 (1)  |
|                           | YA10              | <i>Saccharomycetales</i> sp.           | 1 (1) | 0     | 0     | 0      | 0     | 0      |
| <i>Metschnikowiaceae</i>  |                   |                                        |       |       |       |        |       |        |
|                           | YA68              | <i>Metschnikowia koreensis</i>         | 0     | 0     | 2 (1) | 0      | 0     | 0      |
|                           | YA69 <sup>1</sup> | <i>Metschnikowia</i> sp.               | 0     | 0     | 0     | 1 (1)  | 0     | 0      |
|                           | YA103             | <i>Metschnikowia</i> sp.               | 0     | 0     | 0     | 0      | 2 (2) | 0      |
|                           | YA104             | <i>Metschnikowia</i> sp.               | 0     | 0     | 2 (2) | 0      | 0     | 0      |
| <i>Saccharomycetaceae</i> |                   |                                        |       |       |       |        |       |        |
|                           | YA15              | <i>Debaryomyces hansenii</i>           | 1 (1) | 0     | 0     | 0      | 0     | 0      |
|                           | YA106             | <i>Grigorovia</i> sp.                  | 0     | 0     | 0     | 0      | 1 (1) | 0      |
|                           | YA65              | <i>Kazachstania spencerorum</i>        | 0     | 0     | 0     | 1 (1)  | 0     | 0      |
|                           | YA54              | <i>Kurtzmaniella quercitrusa</i>       | 0     | 0     | 0     | 1 (1)  | 0     | 45 (2) |
|                           | YA53              | <i>Kurtzmaniella</i> sp.               | 0     | 0     | 0     | 1 (1)  | 0     | 0      |
|                           | YA80              | <i>Kurtzmaniella</i> sp.               | 0     | 0     | 0     | 7 (1)  | 0     | 0      |
|                           | YA13              | <i>Lodderomyces elongisporus</i>       | 0     | 7 (1) | 0     | 0      | 0     | 0      |
|                           | YA30              | <i>Pichia kudriavzevii</i>             | 1 (1) | 0     | 0     | 0      | 0     | 0      |
|                           | YA74              | <i>Schwanniomyces vanrijiae</i>        | 0     | 0     | 0     | 17 (3) | 0     | 1 (1)  |
| <i>Saccharomycodaceae</i> |                   |                                        |       |       |       |        |       |        |
|                           | YA28              | <i>Hanseniaspora opuntiae</i>          | 0     | 3 (1) | 0     | 0      | 0     | 0      |
|                           | YA22              | <i>Hanseniaspora thailandica</i>       | 2 (2) | 6 (2) | 0     | 0      | 0     | 0      |
| <i>Trichomonascaceae</i>  |                   |                                        |       |       |       |        |       |        |
|                           | YA7               | <i>Blastobotrys proliferans</i>        | 0     | 1 (1) | 0     | 0      | 0     | 0      |
|                           | YA75              | <i>Sugiyamaella bonitensis</i>         | 0     | 0     | 0     | 1 (1)  | 0     | 0      |
|                           | YA108             | <i>Sugiyamaella boreocaroliniensis</i> | 0     | 0     | 0     | 0      | 2 (1) | 0      |

|                             |       |                                        |       |        |        |       |        |   |
|-----------------------------|-------|----------------------------------------|-------|--------|--------|-------|--------|---|
|                             | YA76  | <i>Sugiyamaella carassensis</i>        | 0     | 0      | 0      | 2 (1) | 1 (1)  | 0 |
|                             | YA77  | <i>Sugiyamaella ligni</i>              | 0     | 0      | 0      | 5 (1) | 0      | 0 |
|                             | YA107 | <i>Sugiyamaella smithiae</i>           | 0     | 0      | 0      | 0     | 91 (1) | 0 |
|                             | YA20  | <i>Wickerhamiella occidentalis</i>     | 1 (1) | 0      | 0      | 2 (1) | 0      | 0 |
|                             | YA40  | <i>Wickerhamiella</i> sp.              | 0     | 11 (1) | 0      | 0     | 0      | 0 |
|                             | YA105 | <i>Wickerhamiella</i> sp.              | 0     | 0      | 0      | 0     | 2 (2)  | 0 |
| <i>Wickerhamomycetaceae</i> |       |                                        |       |        |        |       |        |   |
|                             | YA79  | <i>Wickerhamomyces ciferrii</i>        | 0     | 0      | 52 (2) | 0     | 0      | 0 |
|                             | YA55  | <i>Wickerhamomyces</i> sp.             | 0     | 0      | 0      | 7 (1) | 0      | 0 |
| <i>Basidiomycota</i>        |       |                                        |       |        |        |       |        |   |
| <i>Erythrobasidiales</i>    |       |                                        |       |        |        |       |        |   |
| <i>Erythrobasidiaceae</i>   |       |                                        |       |        |        |       |        |   |
|                             | YA44  | <i>Erythrobasidium</i> sp.             | 1 (1) | 0      | 0      | 0     | 0      | 0 |
| <i>Filobasidiales</i>       |       |                                        |       |        |        |       |        |   |
| <i>Filobasidiaceae</i>      |       |                                        |       |        |        |       |        |   |
|                             | YA90  | <i>Filobasidiaceae</i> sp.             | 0     | 0      | 0      | 0     | 1 (1)  | 0 |
|                             | YA61  | <i>Filobasidium</i> sp.                | 0     | 0      | 1 (1)  | 0     | 0      | 0 |
|                             | YA91  | <i>Heterocephalacria mucosa</i>        | 0     | 0      | 0      | 0     | 6 (3)  | 0 |
|                             | YA62  | <i>Heterocephalacria</i> sp.           | 0     | 0      | 3 (1)  | 0     | 0      | 0 |
|                             | YA12  | <i>Naganishia</i> sp.                  | 0     | 1 (1)  | 0      | 0     | 0      | 0 |
| <i>Incertae sedis</i>       |       |                                        |       |        |        |       |        |   |
| <i>Colacogloeaceae</i>      |       |                                        |       |        |        |       |        |   |
|                             | YA98  | <i>Colacogloea foliorum</i>            | 0     | 0      | 0      | 0     | 1 (1)  | 0 |
|                             | YA99  | <i>Colacogloea</i> sp.                 | 0     | 0      | 0      | 0     | 1 (1)  | 0 |
| <i>Incertae sedis</i>       |       |                                        |       |        |        |       |        |   |
|                             | YA71  | <i>Curvibasidium pallidicorallinum</i> | 0     | 0      | 3 (1)  | 0     | 0      | 0 |

|                           |       |                                    |        |       |       |   |        |   |
|---------------------------|-------|------------------------------------|--------|-------|-------|---|--------|---|
|                           | YA95  | <i>Cystobasidiomycetes</i> sp.     | 0      | 0     | 0     | 0 | 3 (1)  | 0 |
|                           | YA43  | <i>Microbotryomycetes</i> sp.      | 1 (1)  | 0     | 0     | 0 | 0      | 0 |
|                           | YA96  | <i>Microbotryomycetes</i> sp.      | 0      | 0     | 0     | 0 | 1 (1)  | 0 |
|                           | YA97  | <i>Microbotryomycetes</i> sp.      | 0      | 0     | 0     | 0 | 1 (1)  | 0 |
|                           | YA100 | <i>Microbotryomycetes</i> sp.      | 0      | 0     | 0     | 0 | 1 (1)  | 0 |
|                           | YA102 | <i>Microbotryomycetes</i> sp.      | 0      | 0     | 0     | 0 | 2 (2)  | 0 |
|                           | YA101 | <i>Pseudohyphozyma bogoriensis</i> | 0      | 0     | 0     | 0 | 1 (1)  | 0 |
| <i>Symmetrosporaceae</i>  |       |                                    |        |       |       |   |        |   |
|                           | YA45  | <i>Symmetrospora suhii</i>         | 0      | 1 (1) | 0     | 0 | 0      | 0 |
| <i>Sporidiobolales</i>    |       |                                    |        |       |       |   |        |   |
| <i>Sporidiobolaceae</i>   |       |                                    |        |       |       |   |        |   |
|                           | YA9   | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>    | 1 (1)  | 0     | 0     | 0 | 1 (1)  | 0 |
| <i>Tremellales</i>        |       |                                    |        |       |       |   |        |   |
| <i>Bulleribasidiaceae</i> |       |                                    |        |       |       |   |        |   |
|                           | YA87  | <i>Hannaella kunmingensis</i>      | 0      | 0     | 0     | 0 | 15 (3) | 0 |
|                           | YA89  | <i>Hannaella luteola</i>           | 0      | 0     | 0     | 0 | 9 (2)  | 0 |
|                           | YA86  | <i>Hannaella pagnoccae</i>         | 0      | 0     | 0     | 0 | 9 (2)  | 0 |
|                           | YA31  | <i>Hannaella phetchabunensis</i>   | 1 (1)  | 1 (1) | 0     | 0 | 0      | 0 |
|                           | YA88  | <i>Hannaella phyllophila</i>       | 0      | 0     | 0     | 0 | 8 (1)  | 0 |
|                           | YA3   | <i>Vishniacozyma alagoana</i>      | 3 (2)  | 5 (1) | 0     | 0 | 0      | 0 |
|                           | YA39  | <i>Vishniacozyma</i> sp.           | 13 (1) | 6 (1) | 0     | 0 | 0      | 0 |
| <i>Cryptococcaceae</i>    |       |                                    |        |       |       |   |        |   |
|                           | YA67  | <i>Kwoniella dendrophila</i>       | 0      | 0     | 2 (1) | 0 | 0      | 0 |
|                           | YA25  | <i>Kwoniella heveanensis</i>       | 5 (2)  | 0     | 0     | 0 | 0      | 0 |
| <i>Cuniculitremaeae</i>   |       |                                    |        |       |       |   |        |   |
|                           | YA38  | <i>Fellomyces</i> sp.              | 1 (1)  | 0     | 0     | 0 | 0      | 0 |

|                            |      |                                         |       |       |        |       |        |    |
|----------------------------|------|-----------------------------------------|-------|-------|--------|-------|--------|----|
| Incertae sedis             |      |                                         |       |       |        |       |        |    |
| <i>Rhynchogastremaceae</i> | YA83 | <i>Tremellales</i> sp.                  | 0     | 0     | 0      | 0     | 2 (2)  | 0  |
|                            | YA82 | <i>Papiliotrema flavescens</i>          | 0     | 0     | 0      | 0     | 36 (3) | 0  |
|                            | YA33 | <i>Papiliotrema laurentii</i>           | 7 (2) | 0     | 0      | 0     | 0      | 0  |
|                            | YA34 | <i>Papiliotrema rajasthanensis</i>      | 1 (1) | 0     | 0      | 0     | 0      | 0  |
|                            | YA5  | <i>Papiliotrema</i> sp.                 | 2 (2) | 1 (1) | 0      | 0     | 0      | 0  |
|                            | YA70 | <i>Papiliotrema</i> sp.                 | 1 (1) | 0     | 10 (1) | 0     | 0      | 0  |
|                            | YA32 | <i>Papiliotrema terrestris</i>          | 0     | 0     | 1 (1)  | 0     | 0      | 0  |
| <i>Trimorphomycetaceae</i> |      |                                         |       |       |        |       |        |    |
|                            | YA85 | <i>Saitozyma ninhbinhensis</i>          | 0     | 0     | 0      | 0     | 1 (1)  | 0  |
|                            | YA72 | <i>Saitozyma podzolica</i>              | 0     | 0     | 22 (5) | 0     | 2 (1)  | 0  |
|                            | YA84 | <i>Saitozyma</i> sp.                    | 0     | 0     | 0      | 0     | 2 (2)  | 0  |
| <i>Trichosporonales</i>    |      |                                         |       |       |        |       |        |    |
| <i>Trichosporonaceae</i>   |      |                                         |       |       |        |       |        |    |
|                            | YA27 | <i>Cutaneotrichosporon jirovecii</i>    | 4 (1) | 9 (2) | 0      | 0     | 0      | 0  |
|                            | YA19 | <i>Effuseotrichosporon vanderwaltii</i> | 1 (1) | 0     | 0      | 0     | 0      | 0  |
|                            | YA26 | <i>Trichosporon coremiiforme</i>        | 4 (2) | 0     | 0      | 0     | 1 (1)  | 0  |
|                            | YA23 | <i>Trichosporon insectorum</i>          | 2 (1) | 1 (1) | 0      | 0     | 0      | 0  |
|                            | YA78 | <i>Vanrija humicola</i>                 | 0     | 0     | 0      | 1 (1) | 0      | 0  |
| <i>Ustilaginales</i>       |      |                                         |       |       |        |       |        |    |
| <i>Ustilaginaceae</i>      |      |                                         |       |       |        |       |        |    |
|                            | YA93 | <i>Anomalomyces</i> sp.                 | 0     | 0     | 0      | 0     | 2 (2)  | 0  |
|                            | YA92 | <i>Langdonia jejuensis</i>              | 0     | 0     | 0      | 0     | 4 (1)  | 0  |
|                            | YA94 | <i>Moesziomyces</i> sp.                 | 0     | 0     | 0      | 0     | 3 (3)  | 0  |
| Total                      |      |                                         | 218   | 121   | 119    | 128   | 309    | 51 |

**Tabela S3.** Parâmetros de diversidade de cada fungicultura. Jardins novos de *Acromyrmex coronatus* (AcN), Jardins velhos de *A. coronatus* (AcO), *Mycetomoellerius tucumanus* (Mt), *Mycetophylax* sp. (Ms), *Mycocephurus goeldii* (Mg), *Apterostigma* sp. (Apto).

| Fungicultura | Richness | Abundance | Rarefy | Shannon | Simpson | Evenness | Jack - 1 | Jack - 2 |
|--------------|----------|-----------|--------|---------|---------|----------|----------|----------|
| AcN          | 38       | 218       | 19,34  | 2,78    | 0,88    | 0,42     | 64,67    | 82,56    |
| AcO          | 20       | 121       | 14,05  | 2,21    | 0,8     | 0,46     | 35,11    | 46,3     |
| Mt           | 13       | 119       | 9,62   | 1,75    | 0,74    | 0,44     | 21,75    | 27,96    |
| Ms           | 26       | 128       | 18,13  | 2,81    | 0,92    | 0,64     | 45,25    | 60,46    |
| Mg           | 34       | 309       | 14,35  | 2,38    | 0,84    | 0,32     | 55,36    | 69,53    |
| Apto         | 5        | 51        | 5,00   | 0,52    | 0,22    | 0,34     | 7        | 7        |

| Fungicultura | Chao - 1 | Chao - 2 | ACE   | Boot  | CFUmax   | CFUmin   | pH   | Max. Rich | Min Rich |
|--------------|----------|----------|-------|-------|----------|----------|------|-----------|----------|
| AcN          | 72       | 88       | 62,59 | 49,23 | 5,07E+06 | 0,00E+00 | 5,27 | 9         | 1        |
| AcO          | 38       | 62,82    | 30,47 | 26,20 | 9,76E+04 | 0,00E+00 | 5,37 | 6         | 0        |
| Mt           | 13,6     | 34,88    | 16,82 | 16,64 | 2,62E+06 | 0,00E+00 | 5,36 | 4         | 1        |
| Ms           | 44,33    | 131,88   | 37,41 | 33,81 | 6,10E+07 | 1,30E+03 | 5,14 | 6         | 3        |
| Mg           | 40       | 69,09    | 50,44 | 43,1  | 5,91E+04 | 0,00E+00 | 5,13 | 12        | 0        |
| Apto         | 5,33     | 9        | 7     | 6     | 3,45E+05 | 2,10E+05 | 5,36 | 5         | 1        |

**Tabela S4.** Leveduras com fenótipo *killer* positivo frente a isolados sensíveis (*Saccharomyces cerevisiae* 1006, *Candida glabrata* Y55, *Candida albicans* 12A, *Pichia* sp. CAY-15, *Cryptococcus neoformans* HLS3). O número de leveduras com atividade positiva é mostrado seguido pelo número total de isolados avaliados (entre parênteses).

| Espécies                        | Nº de isolados | Formiga <sup>1</sup> | NCYC |       |     |      |      |
|---------------------------------|----------------|----------------------|------|-------|-----|------|------|
|                                 |                |                      | 1006 | Y55   | 12A | CAYI | HSL3 |
| <i>Blastobotrys proliferans</i> | 1              | AcO                  |      |       |     |      |      |
| <i>Candida albicans</i>         | 1              | AcN                  |      |       |     |      |      |
| <i>Candida blattae</i>          | 3              | Ms                   | 3(3) | 3(3)  |     |      |      |
| <i>Candida blattae</i>          | 1              | Apto                 | 1(1) | 1(1)  |     |      |      |
| <i>Candida margitis</i>         | 6              | AcN                  |      |       |     |      |      |
| <i>Candida orthopsilosis</i>    | 10             | AcO                  |      | 1(10) |     |      |      |
| <i>Candida orthopsilosis</i>    | 4              | AcN                  |      |       |     |      |      |
| <i>Candida parapsilosis</i>     | 2              | Mg                   |      |       |     |      |      |
| <i>Candida railenensis</i>      | 5              | AcN                  | 2(5) | 2(5)  |     |      |      |
| <i>Candida railenensis</i>      | 5              | AcO                  |      |       |     |      |      |
| <i>Candida railenensis</i>      | 2              | Mg                   |      |       |     |      |      |
| <i>Candida sinolaborantium</i>  | 1              | Ms                   | 1(1) | 1(1)  |     |      |      |
| <i>Candida</i> sp.              | 2              | AcN                  |      |       |     |      |      |
| <i>Candida</i> sp.              | 1              | Ms                   |      |       |     |      |      |
| <i>Candida</i> sp.              | 1              | Apto                 |      |       |     |      |      |
| <i>Candida</i> sp.              | 1              | Ms                   |      |       |     |      |      |
| <i>Candida</i> sp.              | 1              | Ms                   |      |       |     |      |      |
| <i>Candida</i> sp.              | 2              | Ms                   |      | 1(2)  |     |      | 1(2) |
| <i>Cyberlindnera</i> sp.        | 1              | Ms                   |      |       |     |      |      |
| <i>Debaryomyces hansenii</i>    | 1              | AcN                  |      |       |     |      |      |
| <i>Diutina catenulata</i>       | 6              | AcN                  |      | 2(6)  |     |      | 6(6) |

|                                  |   |      |      |      |
|----------------------------------|---|------|------|------|
| <i>Grigorovia</i> sp.            | 1 | Mg   |      |      |
| <i>Hanseniaspora opuntiae</i>    | 3 | AcO  |      |      |
| <i>Hanseniaspora thailandica</i> | 3 | AcO  |      |      |
| <i>Hanseniaspora thailandica</i> | 2 | AcN  |      |      |
| <i>Hyphopichia burtonii</i>      | 4 | Mt   |      |      |
| <i>Hyphopichia</i> sp.           | 1 | Ms   |      |      |
| <i>Kazachstania spencerorum</i>  | 1 | Ms   | 1(1) |      |
| <i>Kodamaea ohmeri</i>           | 1 | Ms   |      | 1(1) |
| <i>Kurtzmaniella quercitrusa</i> | 1 | Ms   |      |      |
| <i>Kurtzmaniella quercitrusa</i> | 5 | Apto |      |      |
| <i>Kurtzmaniella</i> sp.         | 1 | Ms   |      |      |
| <i>Kurtzmaniella</i> sp.         | 1 | Ms   |      |      |
| <i>Limtongozyma cylindracea</i>  | 1 | Ms   |      |      |
| <i>Limtongozyma</i> sp.          | 2 | Ms   |      |      |
| <i>Lodderomyces elongisporus</i> | 4 | AcO  |      |      |
| <i>Metschnikowia koreensis</i>   | 1 | Mt   |      |      |
| <i>Metschnikowia</i> sp.         | 2 | Mt   |      |      |
| <i>Metschnikowia</i> sp.         | 1 | Ms   |      |      |
| <i>Metschnikowia</i> sp.         | 2 | Mg   |      |      |
| <i>Meyerozyma caribbica</i>      | 1 | AcO  |      |      |
| <i>Meyerozyma caribbica</i>      | 3 | AcN  |      |      |
| <i>Meyerozyma carpophila</i>     | 1 | AcN  |      |      |
| <i>Meyerozyma guilliermondii</i> | 3 | AcN  |      |      |
| <i>Pichia kudriavzevii</i>       | 1 | AcN  |      |      |
| <i>Priceomyces</i> sp.           | 1 | AcN  |      |      |
| <i>Saccharomycetales</i> sp.     | 1 | AcN  |      |      |



|                                    |    |      |      |      |
|------------------------------------|----|------|------|------|
| <i>Scheffersomyces</i> sp.         | 4  | Ms   |      |      |
| <i>Schwanniomyces vanrijiae</i>    | 7  | Ms   | 3(7) |      |
| <i>Schwanniomyces vanrijiae</i>    | 1  | Apto |      |      |
| <i>Starmerella bombicola</i>       | 4  | AcO  |      |      |
| <i>Starmerella etchellsii</i>      | 9  | AcN  |      |      |
| <i>Starmerella meliponinorum</i>   | 3  | AcN  | 2(3) | 3(3) |
| <i>Starmerella</i> sp.             | 2  | AcN  |      |      |
| <i>Starmerella</i> sp.             | 3  | AcN  |      |      |
| <i>Sugiyamaella bonitensis</i>     | 1  | Ms   |      |      |
| <i>Sugiyamaella</i>                |    |      |      |      |
| <i>boreocaroliniensis</i>          | 1  | Mg   |      |      |
| <i>Sugiyamaella carassensis</i>    | 2  | Ms   |      |      |
| <i>Sugiyamaella carassensis</i>    | 1  | Mg   |      |      |
| <i>Sugiyamaella ligni</i>          | 3  | Ms   |      |      |
| <i>Sugiyamaella smithiae</i>       | 15 | Mg   |      |      |
| <i>Wickerhamiella occidentalis</i> | 1  | AcN  |      |      |
| <i>Wickerhamiella occidentalis</i> | 1  | Ms   |      |      |
| <i>Wickerhamiella</i> sp.          | 2  | AcO  |      |      |
| <i>Wickerhamiella</i> sp.          | 2  | Mg   |      |      |
| <i>Wickerhamomyces ciferrii</i>    | 6  | Mt   | 6(6) | 5(6) |
| <i>Wickerhamomyces</i> sp.         | 2  | Ms   |      |      |
| <i>Yamadazyma paraaseri</i>        | 1  | Ms   |      |      |
| <i>Yamadazyma</i> sp.              | 2  | Ms   | 1(2) |      |
| <i>Yamadazyma</i> sp.              | 1  | Apto |      |      |
| <i>Yarrowia lipolytica</i>         | 1  | AcO  |      |      |
| <i>Yarrowia lipolytica</i>         | 2  | AcN  |      |      |

<sup>1</sup> Jardins novos de *Acromyrmex coronatus* (AcN), Jardins velhos de *Acromyrmex coronatus* (AcO), *Mycetomoellerius*

---

*tucumanus* (Mt), *Mycetophylax* sp. (Ms), *Mycocephurus goeldii* (Mg), *Apterostigma* sp. (Apto).

## Figuras

**Figura S1.** Árvore filogenética de Ascomicetos. *Maximum likelihood-like* (ML-like) como árvore de referência. Valores dos nós: valores de *bootstrap* ML-L (parte superior), valores de *bootstrap* de *Maximum likelihood* (canto inferior esquerdo) e valores de probabilidades de inferência bayesiana (canto inferior direito). Os valores de suporte laranja representam os valores conflitantes em relação aos clados de ML-L. As sequências deste estudo estão em negrito. Foram utilizados como grupos externos para enraizamento da árvore: *Rhodotorula glutinis* (AY646097) e *Mucor lusitanicus* (FN650664).

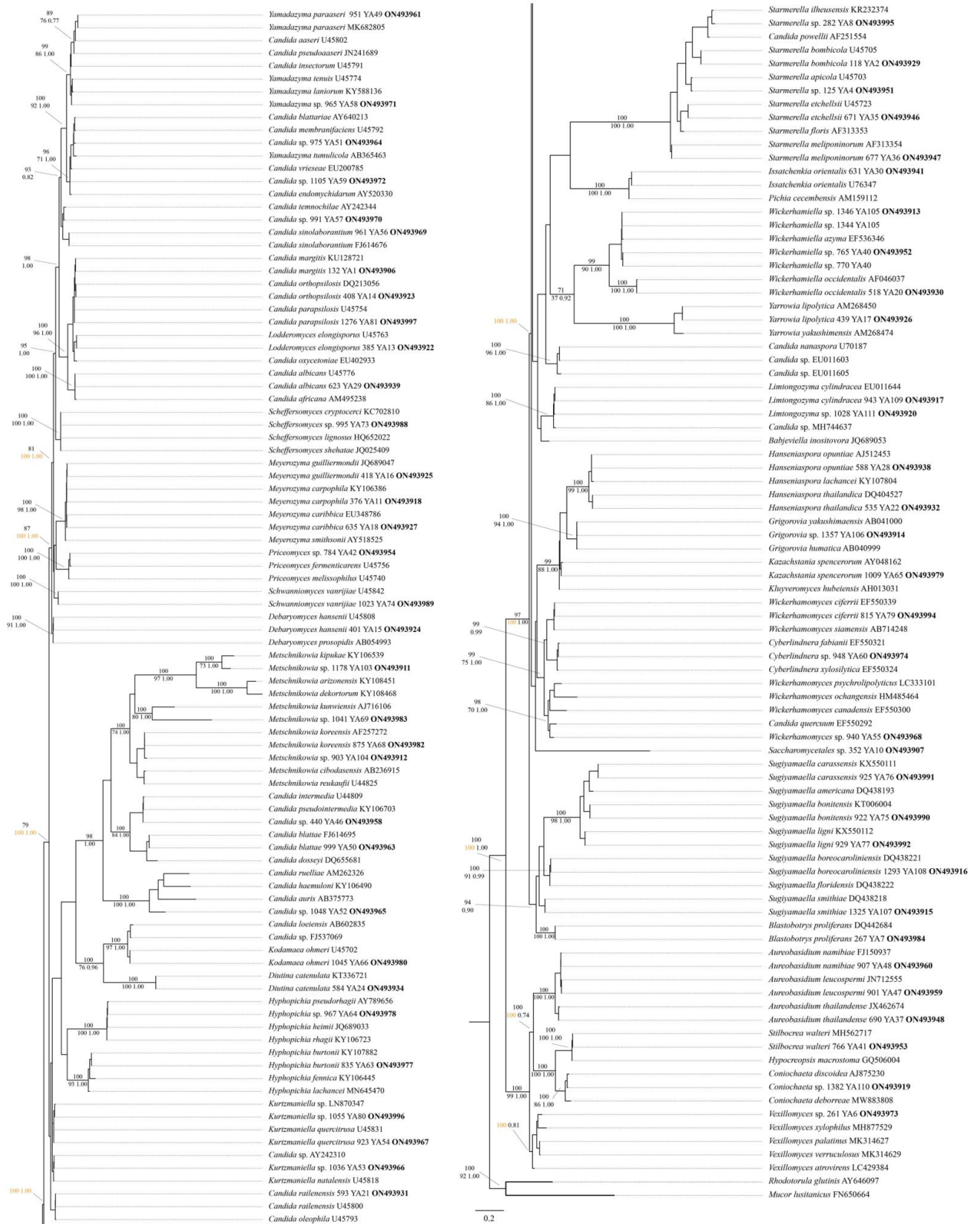
**Figura S2.** Árvores filogenéticas de Basidiomicetos. *Maximum likelihood-like* (ML-like) como árvore de referência. Valores dos nós: valores de *bootstrap* ML-L (parte superior), valores de *bootstrap* de *Maximum likelihood* (canto inferior esquerdo) e valores de probabilidades de inferência bayesiana (canto inferior direito). Os valores de suporte laranja representam os valores conflitantes em relação aos clados de ML-L. *Aureobasidium leucospermi* (JN712555) foi utilizado como grupo externo.

**Figura S3. A.** Análise de Coordenadas Principais (PCoA) com dissimilaridade entre colônias da mesma fungicultura. **B.** Uma segunda análise de ordenação PCoA foi realizada excluindo as colônias mais diferentes (mantendo as do quadrado tracejado na primeira ordenação). Em ambas as ordenações, baixas representatividades de variâncias foram obtidas para cada eixo. **AcN.** Jardim novo de *Acromyrmex coronatus*, **AcO.** Jardim velho de *A. coronatus*, **Mt.** *Mycetomoellerius tucumanus*, **Ms.** *Mycetophylax* sp., **Mg.** *Mycocephurus goeldii*, **Apto.** *Apterostigma* sp.

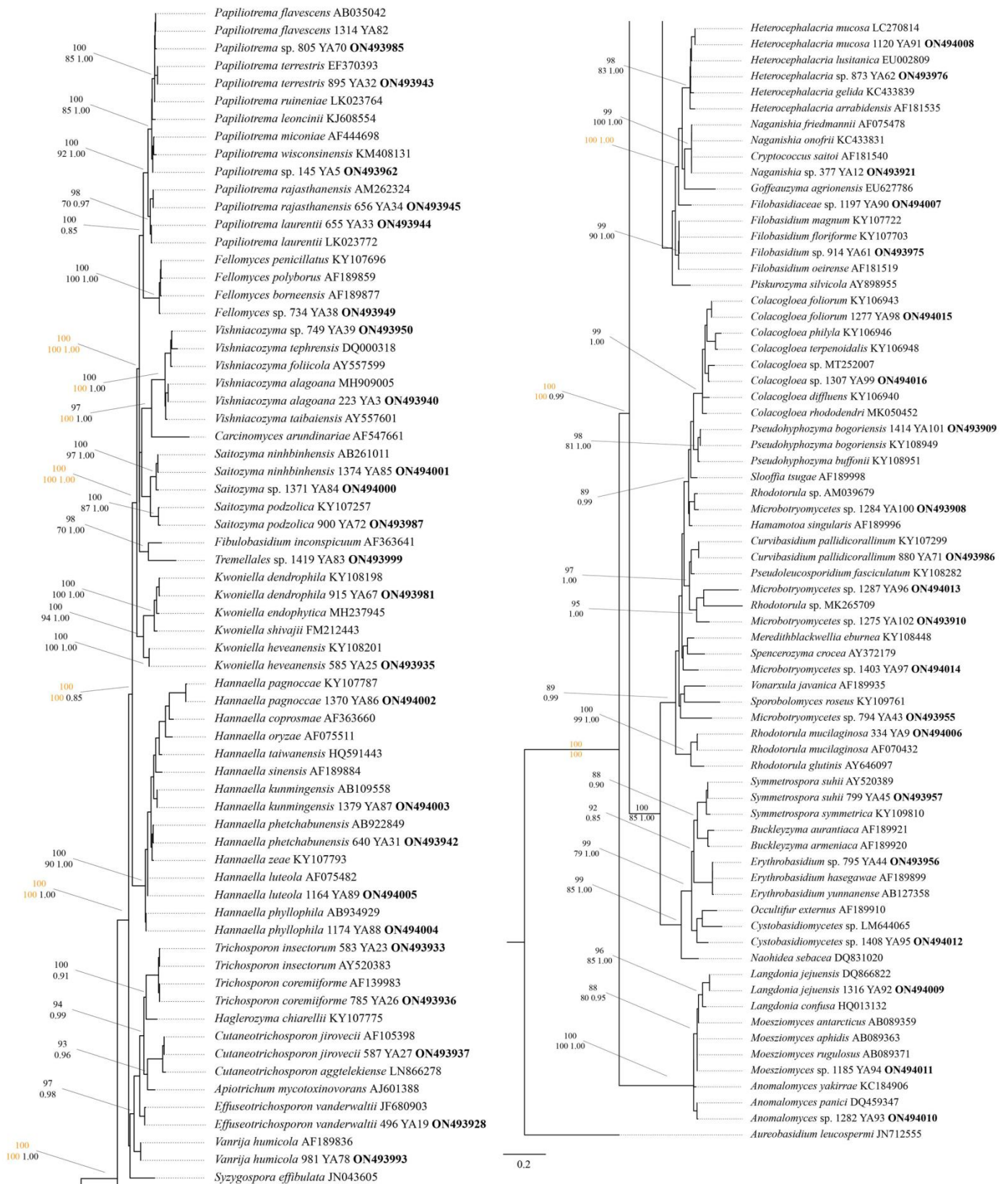
**Figura S4.** Dissimilaridade entre colônias da mesma fungicultura na ausência dos *singletons*. **A.** Análise de ordenação nMDS (estresse: 0,000; distância de *Bray-Curtis*). **B.** Análise de ordenação nMDS (stress: 0,147; distância euclidiana). **C.** Análise de Coordenadas Principais (PCoA) com distância de *Bray-Curtis*. **D.** PCoA com distância euclidiana. **AcN.** Jardim novo de *Acromyrmex coronatus*, **AcO.** Jardim velho de *A. coronatus*, **Mt.** *Mycetomoellerius tucumanus*, **Ms.** *Mycetophylax* sp., **Mg.** *Mycocephurus goeldii*, **Apto.** *Apterostigma* sp.

**Figura S5.** Dissimilaridade entre colônias da mesma fungicultura considerando a abundância relativa de leveduras. **A.** Análise de ordenação nMDS (stress: 0,002; distância de *Bray-Curtis*). **B.** Análise de ordenação nMDS (stress: 0,230; distância euclidiana). **C.** Análise de Coordenadas Principais (PCoA) com distância de *Bray-Curtis*. **D.** PCoA com distância euclidiana. **AcN.** Jardim novo de *Acromyrmex coronatus*, **AcO.** Jardim velho de *A. coronatus*, **Mt.** *Mycetomoellerius tucumanus*, **Ms.** *Mycetophylax* sp., **Mg.** *Mycocephurus goeldii*, **Apto.** *Apterostigma* sp.

**Figura S1.**



**Figura S2.**



FiguraS3.

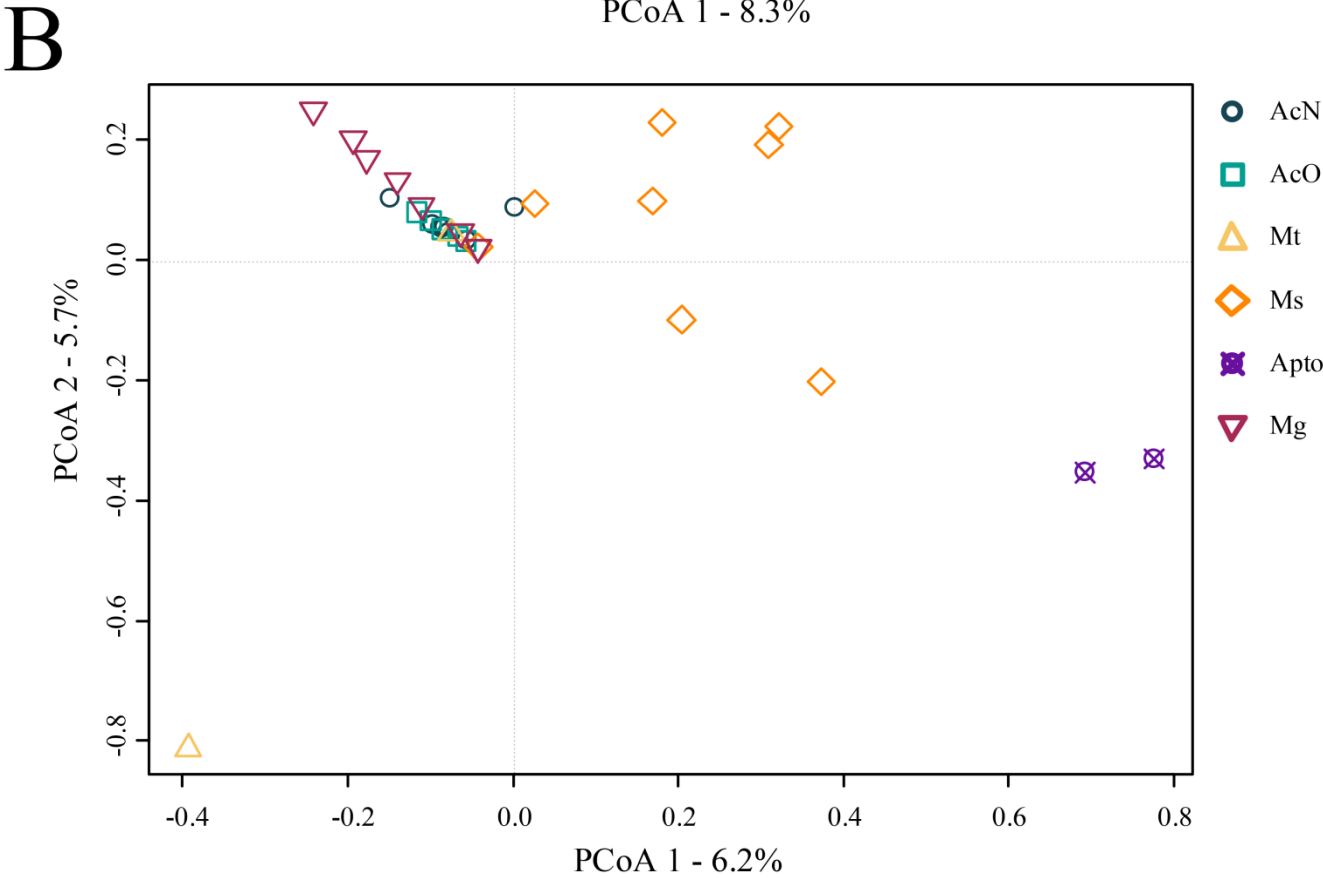
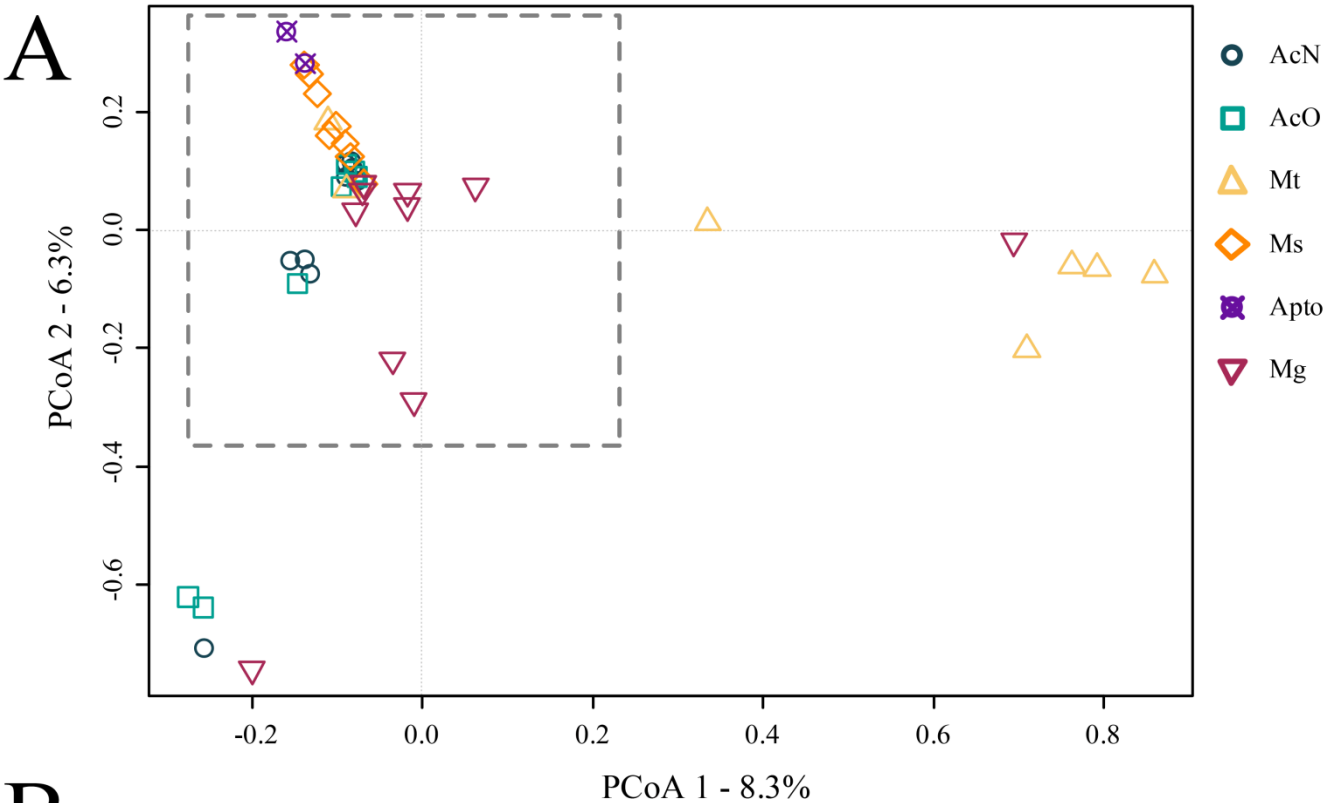


Figura S4.

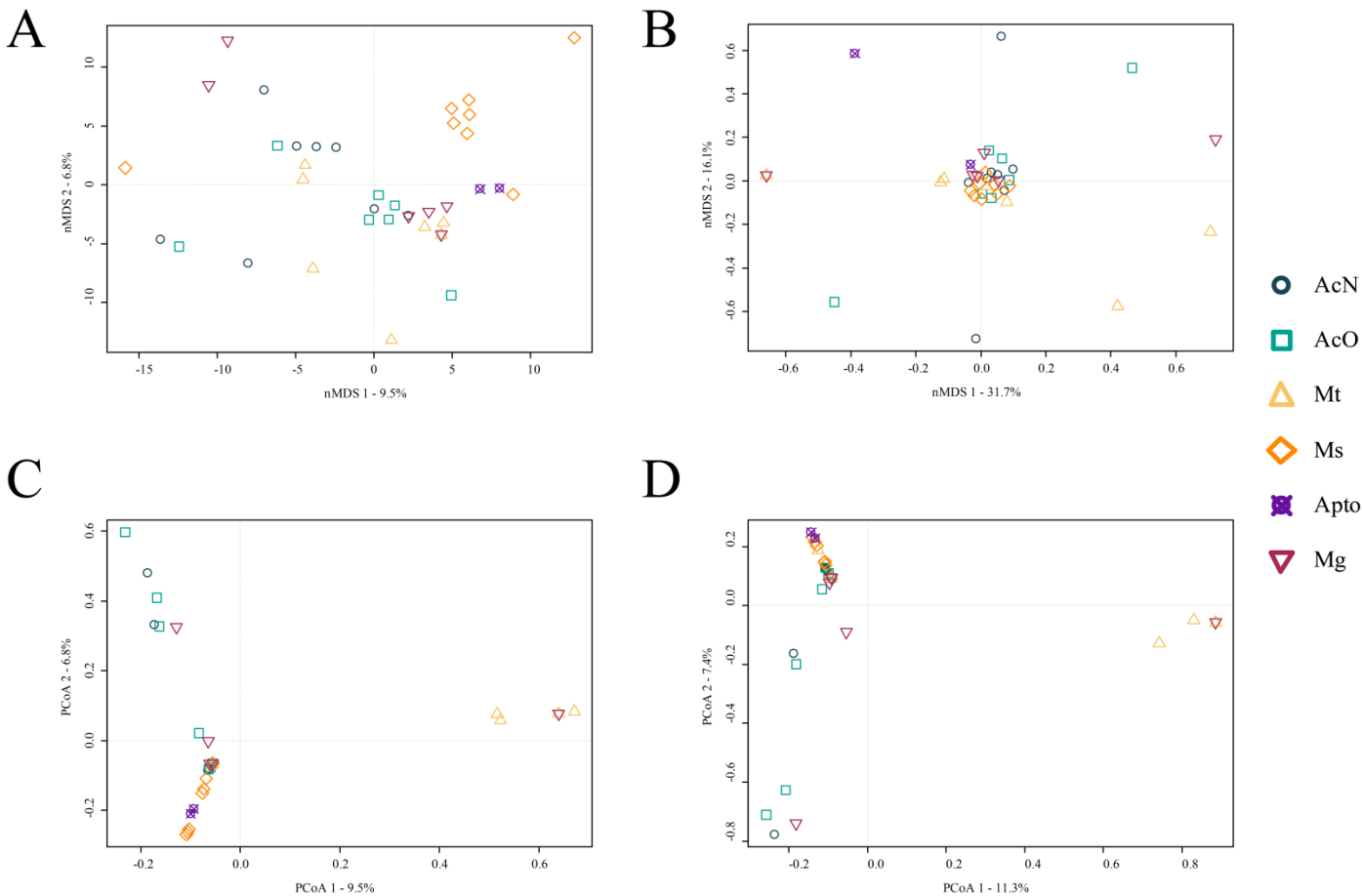
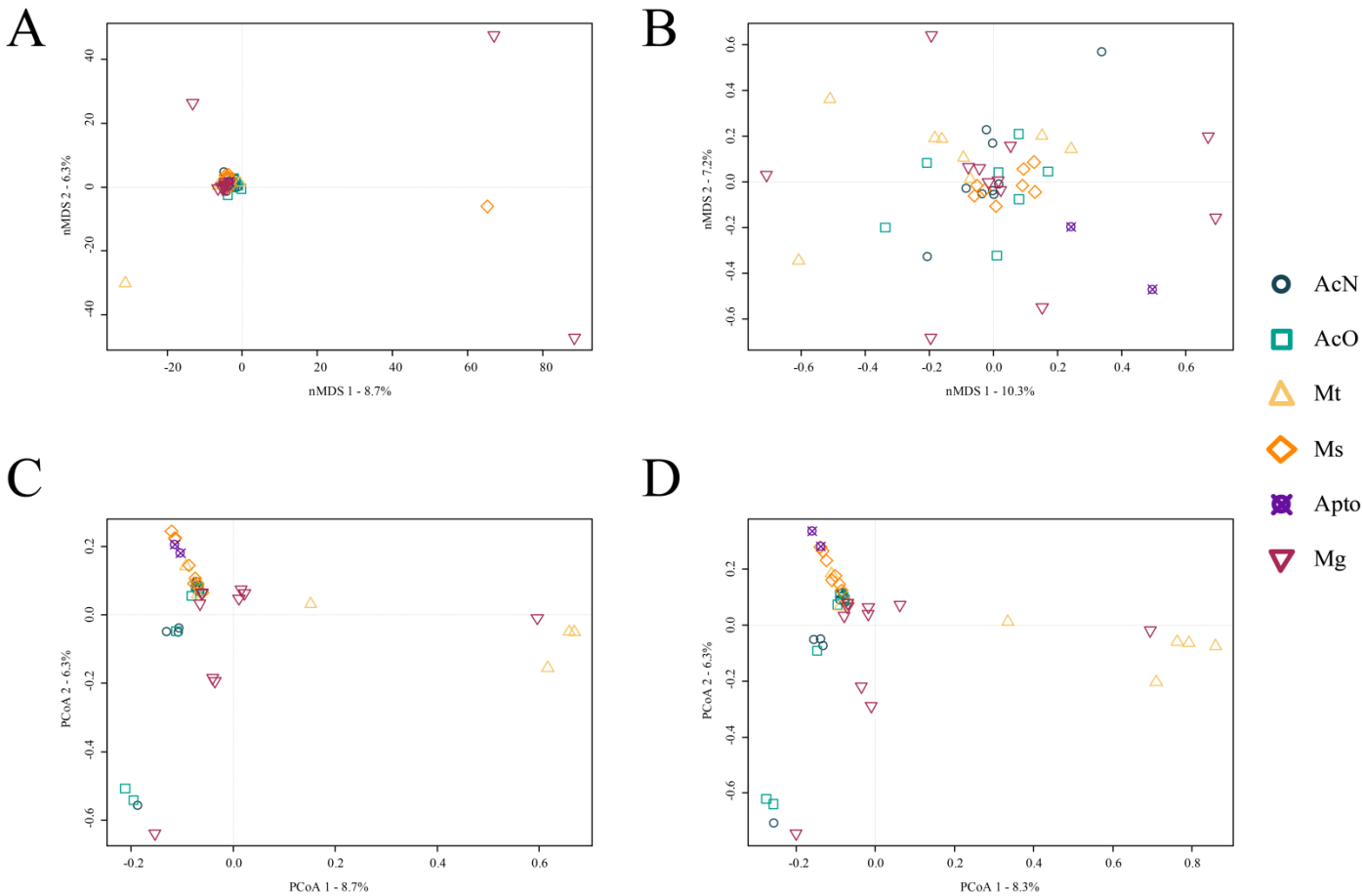


Figura S5.





## Capítulo 2 - Leveduras *killer* em jardins de atíneas: mineração de genoma em busca de novas toxinas

**Tabela S1.** Dados da coleção de leveduras avaliadas no estudo.

| <b>Isolado</b> | <b>Espécie</b>                   | <b>Formiga</b>              | <b>Localidade</b>    |
|----------------|----------------------------------|-----------------------------|----------------------|
| LESF 1450      | <i>Candida margitis</i>          | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1451      | <i>Candida margitis</i>          | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1453      | <i>Candida margitis</i>          | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Rio Claro-SP, Brazil |
| LESF 1472      | <i>Starmerella bombicola</i>     | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1376      | <i>Starmerella bombicola</i>     | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1293      | <i>Starmerella</i> sp.           | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1377      | <i>Candida margitis</i>          | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1378      | <i>Candida margitis</i>          | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1476      | <i>Starmerella bombicola</i>     | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1381      | <i>Candida margitis</i>          | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1471      | <i>Starmerella bombicola</i>     | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1481      | <i>Blastobotrys proliferans</i>  | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1454      | <i>Starmerella</i> sp.           | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1294      | <i>Starmerella</i> sp.           | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1445      | <i>Saccharomycetales</i> sp.     | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1295      | <i>Starmerella</i> sp.           | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1389      | <i>Meyerozyma carpophila</i>     | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1368      | <i>Lodderomyces elongisporus</i> | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1360      | <i>Lodderomyces elongisporus</i> | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Rio Claro-SP, Brasil |

|           |                                  |                             |                      |
|-----------|----------------------------------|-----------------------------|----------------------|
| LESF 1364 | <i>Candida orthopsilosis</i>     | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1362 | <i>Lodderomyces elongisporus</i> | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1365 | <i>Lodderomyces elongisporus</i> | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1394 | <i>Candida orthopsilosis</i>     | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1405 | <i>Debaryomyces hansenii</i>     | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1406 | <i>Meyerozyma guilliermondii</i> | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1402 | <i>Candida orthopsilosis</i>     | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1403 | <i>Candida orthopsilosis</i>     | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1477 | <i>Candida orthopsilosis</i>     | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1444 | <i>Meyerozyma guilliermondii</i> | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1363 | <i>Candida orthopsilosis</i>     | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1407 | <i>Candida orthopsilosis</i>     | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1373 | <i>Candida orthopsilosis</i>     | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1385 | <i>Yarrowia lipolytica</i>       | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1395 | <i>Candida</i> sp.               | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1392 | <i>Candida orthopsilosis</i>     | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1358 | <i>Yarrowia lipolytica</i>       | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1359 | <i>Candida</i> sp.               | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1374 | <i>Candida orthopsilosis</i>     | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1379 | <i>Meyerozyma guilliermondii</i> | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1380 | <i>Candida orthopsilosis</i>     | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1375 | <i>Meyerozyma caribbica</i>      | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1447 | <i>Yarrowia lipolytica</i>       | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1382 | <i>Meyerozyma caribbica</i>      | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1390 | <i>Candida orthopsilosis</i>     | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1371 | <i>Candida orthopsilosis</i>     | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Rio Claro-SP, Brasil |

|           |                                    |                             |                       |
|-----------|------------------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| LESF 1370 | <i>Candida orthopsilosis</i>       | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Rio Claro-SP, Brasil  |
| LESF 1296 | <i>Wickerhamiella occidentalis</i> | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Mogi-Guaçu-SP, Brasil |
| LESF 1384 | <i>Candida railenensis</i>         | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Mogi-Guaçu-SP, Brasil |
| LESF 1386 | <i>Candida railenensis</i>         | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Mogi-Guaçu-SP, Brasil |
| LESF 1387 | <i>Candida railenensis</i>         | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Mogi-Guaçu-SP, Brasil |
| LESF 1456 | <i>Candida railenensis</i>         | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Mogi-Guaçu-SP, Brasil |
| LESF 1297 | <i>Hanseniaspora thailandica</i>   | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Mogi-Guaçu-SP, Brasil |
| LESF 1388 | <i>Candida railenensis</i>         | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Mogi-Guaçu-SP, Brasil |
| LESF 1455 | <i>Candida railenensis</i>         | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Mogi-Guaçu-SP, Brasil |
| LESF 1393 | <i>Candida railenensis</i>         | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Mogi-Guaçu-SP, Brasil |
| LESF 1298 | <i>Hanseniaspora thailandica</i>   | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Mogi-Guaçu-SP, Brasil |
| LESF 1341 | <i>Candida railenensis</i>         | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Mogi-Guaçu-SP, Brasil |
| LESF 1446 | <i>Diutina catenulata</i>          | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Mogi-Guaçu-SP, Brasil |
| LESF 1470 | <i>Hanseniaspora opuntiae</i>      | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Mogi-Guaçu-SP, Brasil |
| LESF 1437 | <i>Candida railenensis</i>         | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Mogi-Guaçu-SP, Brasil |
| LESF 1442 | <i>Candida albicans</i>            | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Mogi-Guaçu-SP, Brasil |
| LESF 1439 | <i>Diutina catenulata</i>          | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Mogi-Guaçu-SP, Brasil |
| LESF 1396 | <i>Diutina catenulata</i>          | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Mogi-Guaçu-SP, Brasil |
| LESF 1416 | <i>Diutina catenulata</i>          | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Mogi-Guaçu-SP, Brasil |
| LESF 1483 | <i>Hanseniaspora thailandica</i>   | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Mogi-Guaçu-SP, Brasil |
| LESF 1443 | <i>Meyerozyma caribbica</i>        | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Mogi-Guaçu-SP, Brasil |
| LESF 1411 | <i>Issatchenkia orientalis</i>     | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Mogi-Guaçu-SP, Brasil |
| LESF 1501 | <i>Diutina catenulata</i>          | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Mogi-Guaçu-SP, Brasil |
| LESF 1452 | <i>Meyerozyma caribbica</i>        | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Mogi-Guaçu-SP, Brasil |
| LESF 1419 | <i>Diutina catenulata</i>          | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Mogi-Guaçu-SP, Brasil |
| LESF 1449 | <i>Candida railenensis</i>         | <i>Acromyrmex coronatus</i> | Mogi-Guaçu-SP, Brasil |

|           |                                  |                                   |                       |
|-----------|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------|
| LESF 1435 | <i>Hanseniaspora thailandica</i> | <i>Acromyrmex coronatus</i>       | Mogi-Guaçu-SP, Brasil |
| LESF 1488 | <i>Hanseniaspora opuntiae</i>    | <i>Acromyrmex coronatus</i>       | Mogi-Guaçu-SP, Brasil |
| LESF 1486 | <i>Hanseniaspora thailandica</i> | <i>Acromyrmex coronatus</i>       | Mogi-Guaçu-SP, Brasil |
| LESF 1484 | <i>Hanseniaspora opuntiae</i>    | <i>Acromyrmex coronatus</i>       | Mogi-Guaçu-SP, Brasil |
| LESF 1487 | <i>Starmerella etchellsii</i>    | <i>Acromyrmex coronatus</i>       | Rio Claro-SP, Brasil  |
| LESF 1299 | <i>Starmerella etchellsii</i>    | <i>Acromyrmex coronatus</i>       | Rio Claro-SP, Brasil  |
| LESF 1300 | <i>Starmerella etchellsii</i>    | <i>Acromyrmex coronatus</i>       | Rio Claro-SP, Brasil  |
| LESF 1496 | <i>Starmerella meliponinorum</i> | <i>Acromyrmex coronatus</i>       | Rio Claro-SP, Brasil  |
| LESF 1485 | <i>Starmerella etchellsii</i>    | <i>Acromyrmex coronatus</i>       | Rio Claro-SP, Brasil  |
| LESF 1301 | <i>Starmerella etchellsii</i>    | <i>Acromyrmex coronatus</i>       | Rio Claro-SP, Brasil  |
| LESF 1304 | <i>Starmerella etchellsii</i>    | <i>Acromyrmex coronatus</i>       | Rio Claro-SP, Brasil  |
| LESF 1420 | <i>Starmerella meliponinorum</i> | <i>Acromyrmex coronatus</i>       | Rio Claro-SP, Brasil  |
| LESF 1302 | <i>Starmerella etchellsii</i>    | <i>Acromyrmex coronatus</i>       | Rio Claro-SP, Brasil  |
| LESF 1418 | <i>Starmerella meliponinorum</i> | <i>Acromyrmex coronatus</i>       | Rio Claro-SP, Brasil  |
| LESF 1303 | <i>Starmerella etchellsii</i>    | <i>Acromyrmex coronatus</i>       | Rio Claro-SP, Brasil  |
| LESF 1508 | <i>Starmerella etchellsii</i>    | <i>Acromyrmex coronatus</i>       | Rio Claro-SP, Brasil  |
| LESF 1431 | <i>Starmerella</i> sp.           | <i>Acromyrmex coronatus</i>       | Rio Claro-SP, Brasil  |
| LESF 1506 | <i>Wickerhamiella</i> sp.        | <i>Acromyrmex coronatus</i>       | Rio Claro-SP, Brasil  |
| LESF 1441 | <i>Wickerhamiella</i> sp.        | <i>Acromyrmex coronatus</i>       | Rio Claro-SP, Brasil  |
| LESF 1391 | <i>Priceomyces</i> sp.           | <i>Acromyrmex coronatus</i>       | Rio Claro-SP, Brasil  |
| LESF 1397 | <i>Wickerhamomyces ciferrii</i>  | <i>Mycetomoellerius tucumanus</i> | Rio Claro-SP, Brasil  |
| LESF 1436 | <i>Wickerhamomyces ciferrii</i>  | <i>Mycetomoellerius tucumanus</i> | Rio Claro-SP, Brasil  |
| LESF 1503 | <i>Hyphopichia burtonii</i>      | <i>Mycetomoellerius tucumanus</i> | Rio Claro-SP, Brasil  |
| LESF 1505 | <i>Hyphopichia burtonii</i>      | <i>Mycetomoellerius tucumanus</i> | Rio Claro-SP, Brasil  |
| LESF 1504 | <i>Hyphopichia burtonii</i>      | <i>Mycetomoellerius tucumanus</i> | Rio Claro-SP, Brasil  |
| LESF 1409 | <i>Wickerhamomyces ciferrii</i>  | <i>Mycetomoellerius tucumanus</i> | Rio Claro-SP, Brasil  |

|           |                                  |                                         |                      |
|-----------|----------------------------------|-----------------------------------------|----------------------|
| LESF 1410 | <i>Wickerhamomyces ciferrii</i>  | <i>Mycetomoellerius tucumanus</i>       | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1339 | <i>Wickerhamomyces ciferrii</i>  | <i>Mycetomoellerius tucumanus</i>       | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1422 | <i>Metschnikowia koreensis</i>   | <i>Mycetomoellerius tucumanus</i>       | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1466 | <i>Wickerhamomyces ciferrii</i>  | <i>Mycetomoellerius tucumanus</i>       | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1499 | <i>Hyphopichia burtonii</i>      | <i>Mycetomoellerius tucumanus</i>       | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1343 | <i>Metschnikowia</i> sp.         | <i>Mycetomoellerius tucumanus</i>       | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1415 | <i>Metschnikowia</i> sp.         | <i>Mycetomoellerius tucumanus</i>       | Rio Claro-SP, Brasil |
| LESF 1465 | <i>Sugiyamaella bonitensis</i>   | <i>Mycetophylax</i> aff. <i>auritus</i> | Itatiaia-RJ, Brasil  |
| LESF 1421 | <i>Kurtzmaniella quercitrusa</i> | <i>Mycetophylax</i> aff. <i>auritus</i> | Itatiaia-RJ, Brasil  |
| LESF 1463 | <i>Sugiyamaella carassensis</i>  | <i>Mycetophylax</i> aff. <i>auritus</i> | Itatiaia-RJ, Brasil  |
| LESF 1459 | <i>Sugiyamaella ligni</i>        | <i>Mycetophylax</i> aff. <i>auritus</i> | Itatiaia-RJ, Brasil  |
| LESF 1338 | <i>Sugiyamaella carassensis</i>  | <i>Mycetophylax</i> aff. <i>auritus</i> | Itatiaia-RJ, Brasil  |
| LESF 1414 | <i>Sugiyamaella ligni</i>        | <i>Mycetophylax</i> aff. <i>auritus</i> | Itatiaia-RJ, Brasil  |
| LESF 1462 | <i>Sugiyamaella ligni</i>        | <i>Mycetophylax</i> aff. <i>auritus</i> | Itatiaia-RJ, Brasil  |
| LESF 1460 | <i>Wickerhamomyces</i> sp.       | <i>Mycetophylax</i> aff. <i>auritus</i> | Itatiaia-RJ, Brasil  |
| LESF 1500 | <i>Limtongozyma cylindracea</i>  | <i>Mycetophylax</i> aff. <i>auritus</i> | Itatiaia-RJ, Brasil  |
| LESF 1458 | <i>Wickerhamomyces</i> sp.       | <i>Mycetophylax</i> aff. <i>auritus</i> | Itatiaia-RJ, Brasil  |
| LESF 1438 | <i>Cyberlindnera</i> sp.         | <i>Mycetophylax</i> aff. <i>auritus</i> | Itatiaia-RJ, Brasil  |
| LESF 1412 | <i>Yamadazyma paraaseri</i>      | <i>Mycetophylax</i> aff. <i>auritus</i> | Itatiaia-RJ, Brasil  |
| LESF 1434 | <i>Yamadazyma</i> sp.            | <i>Mycetophylax</i> aff. <i>auritus</i> | Itatiaia-RJ, Brasil  |
| LESF 1467 | <i>Candida sinolaborantium</i>   | <i>Mycetophylax</i> aff. <i>auritus</i> | Itatiaia-RJ, Brasil  |
| LESF 1490 | <i>Yamadazyma</i> sp.            | <i>Mycetophylax</i> aff. <i>auritus</i> | Itatiaia-RJ, Brasil  |
| LESF 1344 | <i>Hyphopichia</i> sp.           | <i>Mycetophylax</i> aff. <i>auritus</i> | Itatiaia-RJ, Brasil  |
| LESF 1433 | <i>Candida</i> sp.               | <i>Mycetophylax</i> aff. <i>auritus</i> | Itatiaia-RJ, Brasil  |
| LESF 1497 | <i>Schwanniomyces vanrijiae</i>  | <i>Mycetophylax</i> aff. <i>auritus</i> | Itatiaia-RJ, Brasil  |
| LESF 1475 | <i>Schwanniomyces vanrijiae</i>  | <i>Mycetophylax</i> aff. <i>auritus</i> | Itatiaia-RJ, Brasil  |

|           |                                    |                                         |                     |
|-----------|------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------|
| LESF 1461 | <i>Candida</i> sp.                 | <i>Mycetophylax</i> aff. <i>auritus</i> | Itatiaia-RJ, Brasil |
| LESF 1457 | <i>Scheffersomyces</i> sp.         | <i>Mycetophylax</i> aff. <i>auritus</i> | Itatiaia-RJ, Brasil |
| LESF 1417 | <i>Candida blattae</i>             | <i>Mycetophylax</i> aff. <i>auritus</i> | Itatiaia-RJ, Brasil |
| LESF 1440 | <i>Candida blattae</i>             | <i>Mycetophylax</i> aff. <i>auritus</i> | Itatiaia-RJ, Brasil |
| LESF 1401 | <i>Candida blattae</i>             | <i>Mycetophylax</i> aff. <i>auritus</i> | Itatiaia-RJ, Brasil |
| LESF 1335 | <i>Schwanniomyces vanrijiae</i>    | <i>Mycetophylax</i> aff. <i>auritus</i> | Itatiaia-RJ, Brasil |
| LESF 1468 | <i>Kazachstania spencerorum</i>    | <i>Mycetophylax</i> aff. <i>auritus</i> | Itatiaia-RJ, Brasil |
| LESF 1482 | <i>Schwanniomyces vanrijiae</i>    | <i>Mycetophylax</i> aff. <i>auritus</i> | Itatiaia-RJ, Brasil |
| LESF 1480 | <i>Schwanniomyces vanrijiae</i>    | <i>Mycetophylax</i> aff. <i>auritus</i> | Itatiaia-RJ, Brasil |
| LESF 1478 | <i>Schwanniomyces vanrijiae</i>    | <i>Mycetophylax</i> aff. <i>auritus</i> | Itatiaia-RJ, Brasil |
| LESF 1479 | <i>Schwanniomyces vanrijiae</i>    | <i>Mycetophylax</i> aff. <i>auritus</i> | Itatiaia-RJ, Brasil |
| LESF 1448 | <i>Scheffersomyces</i> sp.         | <i>Mycetophylax</i> aff. <i>auritus</i> | Itatiaia-RJ, Brasil |
| LESF 1408 | <i>Scheffersomyces</i> sp.         | <i>Mycetophylax</i> aff. <i>auritus</i> | Itatiaia-RJ, Brasil |
| LESF 1404 | <i>Limtongozyma</i> sp.            | <i>Mycetophylax</i> aff. <i>auritus</i> | Itatiaia-RJ, Brasil |
| LESF 1464 | <i>Scheffersomyces</i> sp.         | <i>Mycetophylax</i> aff. <i>auritus</i> | Itatiaia-RJ, Brasil |
| LESF 1502 | <i>Wickerhamiella occidentalis</i> | <i>Mycetophylax</i> aff. <i>auritus</i> | Itatiaia-RJ, Brasil |
| LESF 1473 | <i>Kurtzmaniella</i> sp.           | <i>Mycetophylax</i> aff. <i>auritus</i> | Itatiaia-RJ, Brasil |
| LESF 1383 | <i>Metschnikowia</i> sp.           | <i>Mycetophylax</i> aff. <i>auritus</i> | Itatiaia-RJ, Brasil |
| LESF 1372 | <i>Candida</i> sp.                 | <i>Mycetophylax</i> aff. <i>auritus</i> | Itatiaia-RJ, Brasil |
| LESF 1474 | <i>Kodamaea ohmeri</i>             | <i>Mycetophylax</i> aff. <i>auritus</i> | Itatiaia-RJ, Brasil |
| LESF 1413 | <i>Candida</i> sp.                 | <i>Mycetophylax</i> aff. <i>auritus</i> | Itatiaia-RJ, Brasil |
| LESF 1491 | <i>Kurtzmaniella</i> sp.           | <i>Mycetophylax</i> aff. <i>auritus</i> | Itatiaia-RJ, Brasil |
| LESF 1492 | <i>Limtongozyma</i> sp.            | <i>Mycetophylax</i> aff. <i>auritus</i> | Itatiaia-RJ, Brasil |
| LESF 1489 | <i>Kurtzmaniella quercitrusa</i>   | <i>Apterostigma goniodes</i>            | Itatiaia-RJ, Brasil |
| LESF 1398 | <i>Kurtzmaniella quercitrusa</i>   | <i>Apterostigma goniodes</i>            | Itatiaia-RJ, Brasil |
| LESF 1400 | <i>Kurtzmaniella quercitrusa</i>   | <i>Apterostigma goniodes</i>            | Itatiaia-RJ, Brasil |

|           |                                        |                              |                     |
|-----------|----------------------------------------|------------------------------|---------------------|
| LESF 1498 | <i>Kurtzmaniella quercitrusa</i>       | <i>Apterostigma goniodes</i> | Itatiaia-RJ, Brasil |
| LESF 1399 | <i>Kurtzmaniella quercitrusa</i>       | <i>Apterostigma goniodes</i> | Itatiaia-RJ, Brasil |
| LESF 1493 | <i>Candida</i> sp.                     | <i>Apterostigma goniodes</i> | Itatiaia-RJ, Brasil |
| LESF 1507 | <i>Yamadazyma</i> sp.                  | <i>Apterostigma goniodes</i> | Itatiaia-RJ, Brasil |
| LESF 1521 | <i>Schwanniomyces vanrijiae</i>        | <i>Apterostigma goniodes</i> | Itatiaia-RJ, Brasil |
| LESF 1494 | <i>Candida blattae</i>                 | <i>Apterostigma goniodes</i> | Itatiaia-RJ, Brasil |
| LESF 1349 | <i>Candida railenensis</i>             | <i>Mycocephurus goeldii</i>  | Anhembi-SP, Brasil  |
| LESF 1356 | <i>Sugiyamaella carassensis</i>        | <i>Mycocephurus goeldii</i>  | Anhembi-SP, Brasil  |
| LESF 1351 | <i>Sugiyamaella smithiae</i>           | <i>Mycocephurus goeldii</i>  | Anhembi-SP, Brasil  |
| LESF 1352 | <i>Sugiyamaella smithiae</i>           | <i>Mycocephurus goeldii</i>  | Anhembi-SP, Brasil  |
| LESF 1355 | <i>Metschnikowia</i> sp.               | <i>Mycocephurus goeldii</i>  | Anhembi-SP, Brasil  |
| LESF 1354 | <i>Candida railenensis</i>             | <i>Mycocephurus goeldii</i>  | Anhembi-SP, Brasil  |
| LESF 1353 | <i>Sugiyamaella smithiae</i>           | <i>Mycocephurus goeldii</i>  | Anhembi-SP, Brasil  |
| LESF 1334 | <i>Sugiyamaella smithiae</i>           | <i>Mycocephurus goeldii</i>  | Anhembi-SP, Brasil  |
| LESF 1357 | <i>Sugiyamaella smithiae</i>           | <i>Mycocephurus goeldii</i>  | Anhembi-SP, Brasil  |
| LESF 1347 | <i>Candida parapsilosis</i>            | <i>Mycocephurus goeldii</i>  | Anhembi-SP, Brasil  |
| LESF 1348 | <i>Sugiyamaella smithiae</i>           | <i>Mycocephurus goeldii</i>  | Anhembi-SP, Brasil  |
| LESF 1366 | <i>Sugiyamaella boreocaroliniensis</i> | <i>Mycocephurus goeldii</i>  | Anhembi-SP, Brasil  |
| LESF 1369 | <i>Sugiyamaella smithiae</i>           | <i>Mycocephurus goeldii</i>  | Anhembi-SP, Brasil  |
| LESF 1367 | <i>Sugiyamaella smithiae</i>           | <i>Mycocephurus goeldii</i>  | Anhembi-SP, Brasil  |
| LESF 1361 | <i>Sugiyamaella smithiae</i>           | <i>Mycocephurus goeldii</i>  | Anhembi-SP, Brasil  |
| LESF 1350 | <i>Sugiyamaella smithiae</i>           | <i>Mycocephurus goeldii</i>  | Anhembi-SP, Brasil  |
| LESF 1337 | <i>Sugiyamaella smithiae</i>           | <i>Mycocephurus goeldii</i>  | Anhembi-SP, Brasil  |
| LESF 1333 | <i>Candida parapsilosis</i>            | <i>Mycocephurus goeldii</i>  | Anhembi-SP, Brasil  |
| LESF 1336 | <i>Sugiyamaella smithiae</i>           | <i>Mycocephurus goeldii</i>  | Anhembi-SP, Brasil  |
| LESF 1332 | <i>Metschnikowia</i> sp.               | <i>Mycocephurus goeldii</i>  | Anhembi-SP, Brasil  |

|           |                              |                             |                    |
|-----------|------------------------------|-----------------------------|--------------------|
| LESF 1340 | <i>Sugiyamaella smithiae</i> | <i>Mycocephurus goeldii</i> | Anhembi-SP, Brasil |
| LESF 1342 | <i>Sugiyamaella smithiae</i> | <i>Mycocephurus goeldii</i> | Anhembi-SP, Brasil |
| LESF 1495 | <i>Wickerhamiella</i> sp.    | <i>Mycocephurus goeldii</i> | Anhembi-SP, Brasil |
| LESF 1346 | <i>Sugiyamaella smithiae</i> | <i>Mycocephurus goeldii</i> | Anhembi-SP, Brasil |
| LESF 1345 | <i>Grigorovia</i> sp.        | <i>Mycocephurus goeldii</i> | Anhembi-SP, Brasil |

---



**Tabela S2.** Sequências utilizadas na análise filogenética.

| <b>Espécie de levedura</b>      | <b>Isolado</b>     | <b>Acesso GenBank</b> |
|---------------------------------|--------------------|-----------------------|
| <i>Babjeviella inositovora</i>  | NRRL Y-12698       | JQ689053              |
| <i>Blastobotrys proliferans</i> | LESF 1481          | ON493984              |
| <i>Blastobotrys proliferans</i> | NRRL Y-17577       | DQ442684              |
| <i>Candida aaseri</i>           | NRRL YB-3897       | U45802                |
| <i>Candida africana</i>         | UPV-EHU 97135      | AM495238              |
| <i>Candida albicans</i>         | LESF 1442          | ON493939              |
| <i>Candida albicans</i>         | NRRL Y-12983       | U45776                |
| <i>Candida auris</i>            | 143                | AB375773              |
| <i>Candida blattae</i>          | LESF 1417          | ON493963              |
| <i>Candida blattae</i>          | ATCC MYA-4360      | FJ614695              |
| <i>Candida blattariae</i>       | NRRL Y-27703       | AY640213              |
| <i>Candida dosseyi</i>          | NRRL Y-27950       | DQ655681              |
| <i>Candida endomychidarum</i>   | NRRL Y-27708       | AY520330              |
| <i>Candida haemuloni</i>        | CBS 5149           | KY106490              |
| <i>Candida insectorum</i>       | NRRL Y-7787        | U45791                |
| <i>Candida intermedia</i>       | NRRL Y-981         | U44809                |
| <i>Candida loeiensis</i>        | NBRC 106731        | AB602835              |
| <i>Candida margitis</i>         | LESF 1378          | ON493906              |
| <i>Candida margitis</i>         | NYNU 15857         | KU128721              |
| <i>Candida membranifaciens</i>  | NRRL Y-2089        | U45792                |
| <i>Candida nanaspora</i>        | NRRL Y-17679       | U70187                |
| <i>Candida orthopsilosis</i>    | LESF 1402          | ON493923              |
| <i>Candida orthopsilosis</i>    | MCO456             | DQ213056              |
| <i>Candida oxycetoniae</i>      | AS 2.3656          | EU402933              |
| <i>Candida parapsilosis</i>     | LESF 1347          | ON493997              |
| <i>Candida parapsilosis</i>     | NRRL Y-12969       | U45754                |
| <i>Candida powellii</i>         | UWO(PS)99-325.3    | AF251554              |
| <i>Candida pseudoaaseri</i>     | CBS 11170          | JN241689              |
| <i>Candida pseudointermedia</i> | CBS 6918           | KY106703              |
| <i>Candida quercuum</i>         | NRRL Y-12942       | EF550292              |
| <i>Candida railenensis</i>      | LESF 1437          | ON493931              |
| <i>Candida railenensis</i>      | NRRL Y-17762       | U45800                |
| <i>Candida ruelliae</i>         | MTCC 7739          | AM262326              |
| <i>Candida sinolaborantium</i>  | LESF 1467          | ON493969              |
| <i>Candida sinolaborantium</i>  | ATCC MYA-4337      | FJ614676              |
| <i>Candida</i> sp.              | BG01-7-23-017A-1-2 | AY242310              |
| <i>Candida</i> sp.              | NRRL Y-27166       | EU011603              |
| <i>Candida</i> sp.              | NRRL Y-12764       | EU011605              |
| <i>Candida</i> sp.              | 05-7-186T          | FJ537069              |
| <i>Candida</i> sp.              | DMKU-WBL1-3        | MH744637              |
| <i>Candida</i> sp.              | LESF 1395          | ON493958              |
| <i>Candida</i> sp.              | LESF 1433          | ON493964              |

|                                   |              |          |
|-----------------------------------|--------------|----------|
| <i>Candida</i> sp.                | LESF 1413    | ON493965 |
| <i>Candida</i> sp.                | LESF 1461    | ON493970 |
| <i>Candida</i> sp.                | LESF 1493    | ON493972 |
| <i>Candida temnochilae</i>        | CBS 9938     | AY242344 |
| <i>Candida vriesiae</i>           | BI146        | EU200785 |
| <i>Cyberlindnera fabianii</i>     | NRRL Y-1871  | EF550321 |
| <i>Cyberlindnera</i> sp.          | LESF 1438    | ON493974 |
| <i>Cyberlindnera xylosilytica</i> | NRRL YB-2097 | EF550324 |
| <i>Debaryomyces hansenii</i>      | LESF 1405    | ON493924 |
| <i>Debaryomyces hansenii</i>      | NRRL Y-7426  | U45808   |
| <i>Debaryomyces prosopidis</i>    | JCM 9913     | AB054993 |
| <i>Diutina catenulata</i>         | LESF 1446    | ON493934 |
| <i>Diutina catenulata</i>         | CBS 565      | KT336721 |
| <i>Grigorovia humatica</i>        | IFO 10673    | AB040999 |
| <i>Grigorovia</i> sp.             | LESF 1345    | ON493914 |
| <i>Grigorovia yakushimaensis</i>  | IFO 1889     | AB041000 |
| <i>Hanseniaspora lachancei</i>    | CBS 8818     | KY107804 |
| <i>Hanseniaspora opuntiae</i>     | LESF 1470    | ON493938 |
| <i>Hanseniaspora opuntiae</i>     | CBS 8733     | AJ512453 |
| <i>Hanseniaspora thailandica</i>  | ST-464       | DQ404527 |
| <i>Hanseniaspora thailandica</i>  | LESF 1297    | ON493932 |
| <i>Hyphopichia burtonii</i>       | LESF 1503    | ON493977 |
| <i>Hyphopichia burtonii</i>       | CBS 2352     | KY107882 |
| <i>Hyphopichia fennica</i>        | CBS 6027     | KY106445 |
| <i>Hyphopichia heimii</i>         | NRRL Y-7502  | JQ689033 |
| <i>Hyphopichia lachancei</i>      | CBS 5999     | MN645470 |
| <i>Hyphopichia pseudorhagii</i>   | NRRL YB-2076 | AY789656 |
| <i>Hyphopichia rhagii</i>         | CBS 618      | KY106723 |
| <i>Hyphopichia</i> sp.            | LESF 1344    | ON493978 |
| <i>Issatchenkia orientalis</i>    | NRRL Y-5396  | U76347   |
| <i>Kazachstania spencerorum</i>   | LESF 1468    | ON493979 |
| <i>Kazachstania spencerorum</i>   | NRRL Y-17920 | AY048162 |
| <i>Kluyveromyces hubeiensis</i>   | AS 2.1536    | AH013031 |
| <i>Kodamaea ohmeri</i>            | LESF 1474    | ON493980 |
| <i>Kodamaea ohmeri</i>            | NRRL Y-1932  | U45702   |
| <i>Kurtzmaniella natalensis</i>   | NRRL Y-17680 | U45818   |
| <i>Kurtzmaniella quercitrusa</i>  | LESF 1421    | ON493967 |
| <i>Kurtzmaniella quercitrusa</i>  | NRRL Y-5392  | U45831   |
| <i>Kurtzmaniella</i> sp           | CLIB 1620    | LN870347 |
| <i>Kurtzmaniella</i> sp           | LESF 1473    | ON493966 |
| <i>Kurtzmaniella</i> sp           | LESF 1491    | ON493996 |
| <i>Limtongozyma cylindracea</i>   | LESF 1500    | ON493917 |
| <i>Limtongozyma cylindracea</i>   | NRRL Y-17506 | EU011644 |
| <i>Limtongozyma</i> sp.           | LESF 1404    | ON493920 |

|                                    |                    |          |
|------------------------------------|--------------------|----------|
| <i>Lodderomyces elongisporus</i>   | LESF 1360          | ON493922 |
| <i>Lodderomyces elongisporus</i>   | NRRL YB-4239       | LEU45763 |
| <i>Metschnikowia cibodasensis</i>  | UICC Y-340         | AB236915 |
| <i>Metschnikowia koreensis</i>     | LESF 1422          | ON493982 |
| <i>Metschnikowia koreensis</i>     | KCTC 7828          | AF257272 |
| <i>Metschnikowia kunwiensis</i>    | CBS 9679           | AJ716106 |
| <i>Metschnikowia reukaufii</i>     | NRRL Y-7112        | U44825   |
| <i>Metschnikowia</i> sp.           | LESF 1355          | ON493911 |
| <i>Metschnikowia</i> sp.           | LESF 1343          | ON493912 |
| <i>Metschnikowia</i> sp.           | LESF 1383          | ON493983 |
| <i>Meyerozyma caribbica</i>        | LESF 1452          | ON493927 |
| <i>Meyerozyma caribbica</i>        | NRRL Y-27274       | EU348786 |
| <i>Meyerozyma carpophila</i>       | LESF 1389          | ON493918 |
| <i>Meyerozyma carpophila</i>       | CBS 5256           | KY106386 |
| <i>Meyerozyma guilliermondii</i>   | LESF 1444          | ON493925 |
| <i>Meyerozyma guilliermondii</i>   | NRRL Y-2075        | JQ689047 |
| <i>Meyerozyma smithsonii</i>       | BG02-7-13-007B-1-2 | AY518525 |
| <i>Pichia cecembensis</i>          | NRRL Y-27985       | AM159112 |
| <i>Pichia kudriavzevii</i>         | LESF 1411          | ON493941 |
| <i>Priceomyces fermenticarens</i>  | NRRL Y-17321       | U45756   |
| <i>Priceomyces melissophilus</i>   | NRRL Y-7585        | U45740   |
| <i>Priceomyces</i> sp.             | LESF 1391          | ON493954 |
| <i>Saccharomycetales</i> sp.       | LESF 1445          | ON493907 |
| <i>Scheffersomyces cryptocerci</i> | NRRL Y-48824       | KC702810 |
| <i>Scheffersomyces lignosus</i>    | ATCC 58779         | HQ652022 |
| <i>Scheffersomyces shehatae</i>    | NRRL Y-12858       | JQ025409 |
| <i>Scheffersomyces</i> sp.         | LESF 1457          | ON493988 |
| <i>Schizosaccharomyces pombe</i>   | NRRL Y-12796       | JQ689077 |
| <i>Schwanniomyces vanrijiae</i>    | LESF 1478          | ON493989 |
| <i>Schwanniomyces vanrijiae</i>    | NRRL Y-7430        | U45842   |
| <i>Starmerella apicola</i>         | NRRL Y-2481        | U45703   |
| <i>Starmerella bombicola</i>       | LESF 1472          | ON493929 |
| <i>Starmerella bombicola</i>       | NRRL Y-17069       | U45705   |
| <i>Starmerella etchellsii</i>      | LESF 1300          | ON493946 |
| <i>Starmerella etchellsii</i>      | NRRL Y-17084       | U45723   |
| <i>Starmerella floris</i>          | UWO(PS)00-226.2    | AF313353 |
| <i>Starmerella ilheusensis</i>     | UFMG-CM-Y596       | KR232374 |
| <i>Starmerella meliponinorum</i>   | LESF 1496          | ON493947 |
| <i>Starmerella meliponinorum</i>   | UWO(PS)00-227.1    | AF313354 |
| <i>Starmerella</i> sp.             | LESF 1293          | ON493951 |
| <i>Starmerella</i> sp.             | LESF 1454          | ON493995 |
| <i>Sugiyamaella americana</i>      | NRRL YB-2067       | DQ438193 |
| <i>Sugiyamaella bonitensis</i>     | LESF 1465          | ON493990 |
| <i>Sugiyamaella bonitensis</i>     | UFMG-CM-Y608       | KT006004 |

|                                           |               |          |
|-------------------------------------------|---------------|----------|
| <i>Sugiyamaella boreocaroliniensis</i>    | LESF 1366     | ON493916 |
| <i>Sugiyamaella boreocaroliniensis</i>    | NRRL YB-1835  | DQ438221 |
| <i>Sugiyamaella carassensis</i>           | LESF 1463     | ON493991 |
| <i>Sugiyamaella carassensis</i>           | UFMG-CM-Y606  | KX550111 |
| <i>Sugiyamaella floridensis</i>           | NRRL YB-3827  | DQ438222 |
| <i>Sugiyamaella ligni</i>                 | LESF 1459     | ON493992 |
| <i>Sugiyamaella ligni</i>                 | UFMG-CM-Y295  | KX550112 |
| <i>Sugiyamaella smithiae</i>              | LESF 1336     | ON493915 |
| <i>Sugiyamaella smithiae</i>              | NRRL Y-17850  | DQ438218 |
| <i>Wickerhamiella azyma</i>               | CBS 6826      | EF536346 |
| <i>Wickerhamiella occidentalis</i>        | LESF 1296     | ON493930 |
| <i>Wickerhamiella occidentalis</i>        | CBS 8452      | AF046037 |
| <i>Wickerhamiella</i> sp.                 | LESF 1495     | ON493913 |
| <i>Wickerhamiella</i> sp.                 | LESF 1506     | ON493952 |
| <i>Wickerhamomyces canadensis</i>         | NRRL Y-1888   | EF550300 |
| <i>Wickerhamomyces ciferrii</i>           | LESF 1397     | ON493994 |
| <i>Wickerhamomyces ciferrii</i>           | NRRL Y-1031   | EF550339 |
| <i>Wickerhamomyces ochangensis</i>        | N7a-Y2T       | HM485464 |
| <i>Wickerhamomyces psychrolipolyticus</i> | YS-2018 202-2 | LC333101 |
| <i>Wickerhamomyces siamensis</i>          | DMKU-RK359    | AB714248 |
| <i>Wickerhamomyces</i> sp.                | LESF 1460     | ON493968 |
| <i>Yamadazyma laniorum</i>                | yHMH7         | KY588136 |
| <i>Yamadazyma paraaseri</i>               | NYNU 1811114  | MK682805 |
| <i>Yamadazyma</i> sp.                     | LESF 1412     | ON493961 |
| <i>Yamadazyma</i> sp.                     | LESF 1490     | ON493971 |
| <i>Yamadazyma tenuis</i>                  | NRRL Y-1498   | U45774   |
| <i>Yamadazyma tumulicola</i>              | T6517-9-5     | AB365463 |
| <i>Yarrowia lipolytica</i>                | LESF 1385     | ON493926 |
| <i>Yarrowia lipolytica</i>                | CBS 6124      | AM268450 |
| <i>Yarrowia lipolytica</i>                | NRRL Y-2317   | U45793   |
| <i>Yarrowia yakushimensis</i>             | CBS 10254     | AM268474 |

---

**Tabelo S3.** Isolados de leveduras utilizadas para análise do fenótipo *killer*.

| <b>Espécie de levedura</b>       | <b>Isolado</b> | <b>Uso</b>    |
|----------------------------------|----------------|---------------|
| <i>Starmerella bombicola</i>     | LESF 1472      | Cepa sensível |
| <i>Blastobotrys proliferans</i>  | LESF 1481      | Cepa sensível |
| <i>Meyerozyma carpophila</i>     | LESF 1389      | Cepa sensível |
| <i>Debaryomyces hansenii</i>     | LESF 1405      | Cepa sensível |
| <i>Meyerozyma guilliermondii</i> | LESF 1406      | Cepa sensível |
| <i>Yarrowia lipolytica</i>       | LESF 1385      | Cepa sensível |
| <i>Hanseniaspora thailandica</i> | LESF 1297      | Cepa sensível |
| <i>Diutina catenulata</i>        | LESF 1446      | Cepa sensível |
| <i>Hanseniaspora opuntiae</i>    | LESF 1470      | Cepa sensível |
| <i>Candida railenensis</i>       | LESF 1437      | Cepa sensível |
| <i>Issatchenkia orientalis</i>   | LESF 1411      | Cepa sensível |
| <i>Meyerozyma caribbica</i>      | LESF 1452      | Cepa sensível |
| <i>Starmerella etchellsii</i>    | LESF 1300      | Cepa sensível |
| <i>Starmerella meliponinorum</i> | LESF 1496      | Cepa sensível |
| <i>Wickerhamomyces ciferrii</i>  | LESF 1397      | Cepa sensível |
| <i>Metschnikowia koreensis</i>   | LESF 1422      | Cepa sensível |
| <i>Sugiyamaella bonitensis</i>   | LESF 1465      | Cepa sensível |
| <i>Sugiyamaella carassensis</i>  | LESF 1463      | Cepa sensível |
| <i>Sugiyamaella ligni</i>        | LESF 1459      | Cepa sensível |
| <i>Limtongozyma cylindracea</i>  | LESF 1500      | Cepa sensível |
| <i>Yamadazyma paraaseri</i>      | LESF 1412      | Cepa sensível |
| <i>Candida sinolaborantium</i>   | LESF 1467      | Cepa sensível |
| <i>Candida blattae</i>           | LESF 1417      | Cepa sensível |
| <i>Kazachstania spencerorum</i>  | LESF 1468      | Cepa sensível |
| <i>Kodamaea ohmeri</i>           | LESF 1474      | Cepa sensível |
| <i>Kurtzmaniella quercitrusa</i> | LESF 1489      | Cepa sensível |
| <i>Schwanniomyces vanrijiae</i>  | LESF 1521      | Cepa sensível |
| <i>Candida pseudoaaseri</i>      | LESF 1541      | Cepa sensível |
| <i>Yamadazyma riverae</i>        | LESF 1538      | Cepa sensível |
| <i>Candida nanaspora</i>         | LESF 1525      | Cepa sensível |
| <i>Meyerozyma caribbica</i>      | LESF 1545      | Cepa sensível |
| <i>Cyberlindnera</i> sp.         | LESF 1556      | Cepa sensível |
| <i>Cyberlindnera</i> sp.         | LESF 1555      | Cepa sensível |
| <i>Candida railenensis</i>       | LESF 1551      | Cepa sensível |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i>  | Y-2046         | Cepa sensível |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i>  | MSY"99"        | Cepa sensível |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i>  | T - 5509       | Cepa sensível |
| <i>Kazachstania africana</i>     | Y - 2729       | Cepa sensível |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i>  | Y - 1891       | Cepa sensível |
| <i>Saccharomyces paradoxus</i>   | YB - 4565      | Cepa sensível |
| <i>Saccharomyces paradoxus</i>   | Y8.5           | Cepa sensível |
| <i>Saccharomyces mikatae</i>     | NBRC 1815      | Cepa sensível |

|                                 |           |                               |
|---------------------------------|-----------|-------------------------------|
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | BY 4741   | Cepa sensível                 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | YJM1307   | Cepa produtora de toxina K1   |
| <i>Saccharomyces paradoxus</i>  | Y-63717   | Cepa produtora de toxina K1L  |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | CYC1172   | Cepa produtora de toxina K2   |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | DSM-70459 | Cepa produtora de toxina Klus |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | OS169     | Cepa produtora de toxina K62  |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | OS78      | Cepa produtora de toxina K45  |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | OS294     | Cepa produtora de toxina K74  |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | MSC300c   | Cepa produtora de toxina K28  |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | OS40      | Cepa produtora de toxina K21  |
| <i>Candida glabrata</i>         | AR0323    | Cepa sensível patogênica      |
| <i>Candida glabrata</i>         | AR0317    | Cepa sensível patogênica      |
| <i>Candida glabrata</i>         | ATCC2001  | Cepa sensível patogênica      |
| <i>Candida castellii</i>        | Y-17070   | Cepa sensível patogênica      |
| <i>Candida auris</i>            | AR0382    | Cepa sensível patogênica      |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | AR0400    | Cepa sensível patogênica      |
| <i>Candida humilis</i>          | Y-17074   | Cepa sensível patogênica      |
| <i>Candida nivarensis</i>       | Y-48269   | Cepa sensível patogênica      |
| <i>Candida pararugose</i>       | AR0587    | Cepa sensível patogênica      |
| <i>Candida kefyr</i>            | AR0588    | Cepa sensível patogênica      |
| <i>Candida albicans</i>         | Y-12983   | Cepa sensível patogênica      |
| <i>Candida auris</i>            | AR0381    | Cepa sensível patogênica      |
| <i>Candida auris</i>            | AR0382    | Cepa sensível patogênica      |
| <i>Candida auris</i>            | AR0383    | Cepa sensível patogênica      |
| <i>Candida auris</i>            | AR0384    | Cepa sensível patogênica      |
| <i>Candida auris</i>            | AR0385    | Cepa sensível patogênica      |
| <i>Candida auris</i>            | AR0386    | Cepa sensível patogênica      |
| <i>Candida auris</i>            | AR0387    | Cepa sensível patogênica      |
| <i>Candida auris</i>            | AR0388    | Cepa sensível patogênica      |
| <i>Candida auris</i>            | AR0389    | Cepa sensível patogênica      |
| <i>Candida auris</i>            | AR0390    | Cepa sensível patogênica      |

---

**Tabela S4.** Resultados de interação dos ensaios de caracterização de fenótipo *killer*. Números referem-se aos scores da interação.

| Isol.<br>Sens. | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L |
|----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
|----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|

[illegible]



|              |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |     |
|--------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|
| LESF<br>1489 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0</ |
|--------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|





|                        |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| <i>C. auris</i> AR0387 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 3 | 0 | 0 | 0 | 2 | 3 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 3 | 2 |   |
| <i>C. auris</i> AR0388 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |   |
| <i>C. auris</i> AR0389 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 |   |
| <i>C. auris</i> AR0390 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |

0: sem fenótipo; 1. Halo azul fraco sem inibição; 2. Halo azul forte sem inibição; 3. Inibição sem halo azul; 4. Inibição com halo azul. Fenótipo caracterizado de acordo com Fredericks et al. (2021a).

**Tabela S6.** Estatísticas das avaliações de interação entre *Candida sinolaborantium* LESF 1467 e *Kodamaea ohmeri* LESF 1474, em diferentes condições.

**Zonas de interação em diferentes condições de temperatura**

| Tratamento | Valor (Média ± SE) |
|------------|--------------------|
| pH 3,5     | 1,03 ± 0,04 d      |
| pH 4,0     | 1,18 ± 0,04 c      |
| pH 4,5     | 2,35 ± 0,06 b      |
| pH 5,0     | 3,25 ± 0,09 a      |
| pH 5,5     | 0,81 ± 0,03 e      |

*Kruskal-Wallis*, *chi-squared* = 44,608; gl = 4; *P* = 4,796E-09; com *Wilcoxon rank sum test* como *test posthoc*; não foram observadas interações nos pH 6 e 6,5.

**Zonas de interação em diferentes condições de pH**

| Tratamento | Valor (Média ± SE) |
|------------|--------------------|
| 17°C       | 2,03 ± 0,04 b      |
| 20°C       | 2,42 ± 0,08 a      |
| 25°C       | 2,15 ± 0,05 b      |
| 30°C       | 1,01 ± 0,03 c      |

*Kruskal-Wallis*, *chi-squared* = 28,693; gl = 3; *P* = 2,598E-06; com *Wilcoxon rank sum test* como *test posthoc*; não foi observado interação a 35°C.

**Tabela S7.** Estatísticas das avaliações de células de *Kodamaea ohmeri* LESF 1474 frente às toxinas *killer*.

**Proporção entre células alongadas e comuns**

| Tratamento | Valor (Média ± SE) |
|------------|--------------------|
| LESF1467   | 0,24 ± 0,02 a      |
| Klus       | 0,49 ± 0,07 b      |
| Controle   | 0,03 ± 0,00 c      |

*Kruskal-Wallis*, *chi-squared* = 23,484; gl = 2; *P* = 7,953E-06; com *DunnTest* como *test posthoc*

**Sobrevivência de células**

| Tratamento | Valor (Média ± SE)  |
|------------|---------------------|
| LESF1467   | 1,47E+05 ± 1,31E+04 |
| Klus       | 7,00E+04 ± 6,33E+03 |
| Controle   | 1,30E+05 ± 1,02E+04 |

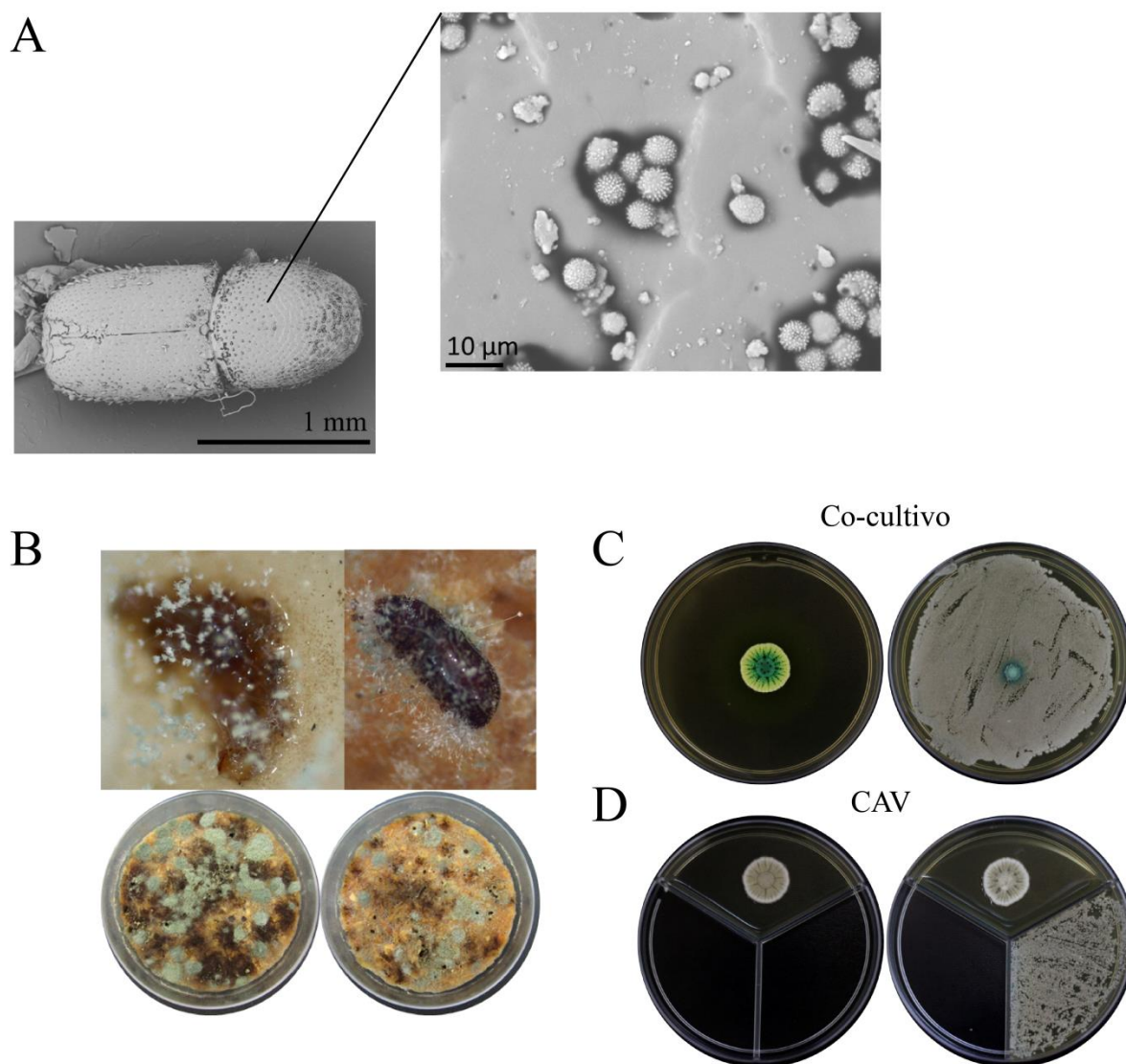
Análise de variância, gl = 2; *F* = 15,551; *P* = 3,212E-05; com teste de *Tukey* como *test posthoc*

**Tabela S8.** Estatísticas do processo de montagem, predição e anotação do genoma de *Candida sinolaborantium* LESF1467.

| Estatística das etapas de limpeza                   |                    |                |
|-----------------------------------------------------|--------------------|----------------|
| Categoria                                           | Antes da filtragem | Após filtragem |
| Total de reads                                      | 5240040            | 4203746        |
| Total de bases                                      | 786006000          | 608646389      |
| proporção Q30                                       | 69,15%             | 75,61%         |
| conteúdo GC                                         | 46,15%             | 44,46%         |
| Estatísticas da montagem BUSCO e QUAST              |                    |                |
| Categoria                                           | Valores            |                |
| Total BUSCO groups searched (saccharomycetes_odb10) | 2137               |                |
| Completo BUSCOs                                     | 2097 (98.2%)       |                |
| Completo and de cópia simples BUSCOs                | 2099 (98.1%)       |                |
| Completo e duplicados BUSCOs                        | 2 (0.1%)           |                |
| Fragmentados BUSCOs                                 | 1,00%              |                |
| Ausentes BUSCOs                                     | 0,80%              |                |
| Contigs > 200 bp                                    | 270                |                |
| Contigs > 1,000 bp                                  | 163                |                |
| Comprimento total (>= 0 bp)                         | 11214429           |                |
| Comprimento total (>= 1,000 bp)                     | 11175526           |                |
| Maior contig                                        | 543051             |                |
| GC (%)                                              | 48,76              |                |
| N50                                                 | 155979             |                |
| N's por 100 kbp                                     | 29,07              |                |
| Estatísticas da predição e anotação de genes        |                    |                |
| Categoria                                           | Valores            |                |
| Número de genes codificadores de proteínas          | 5951               |                |

**Capítulo 3** - Mutualismo não simbiótico entre *Spermophthorus apuleiae* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) e uma levedura endofítica

**Figura S1.** Interações entre fungos filamentosos, leveduras e besouros. **A.** A presença de esporos de fungos filamentosos foi constatada, por microscopia eletrônica de varredura, aderidos a estruturas ornamentais externas ao corpo dos besouros. **B.** Tentativas de manutenção dos besouros *in vitro* foram frustradas por decaimento dos besouros, devido à contaminação por fungos filamentosos, em particular, do gênero *Penicillium* (fotos superiores). Na ausência de leveduras (foto inferior à esquerda) foi observada maior proliferação de fungos filamentosos, comumente isolados dos frutos infestados por besouros. **C.** Cultivos pareados entre fungos recorrentes e *Cyberlindnera* sp. B56 indicam competição espacial, com impedimento de crescimento dos fungos filamentosos. **D.** Cultivos de avaliação de inibição por compostos antifúngicos voláteis (CAV) não apresentam elementos que corroborem com inibição dos fungos filamentosos ou sua esporulação via esses metabólitos, em nenhuma das condições avaliadas.



**Tabela S1.** Identificação das amostras e das abundâncias (UFC mL<sup>-1</sup>) de leveduras recuperadas.

| Identificação | GPS          |              | Cidade-Estado   | ME-Macho | ME-Fêmeas | MI-Macho | MI-Fêmeas | Frutos   |
|---------------|--------------|--------------|-----------------|----------|-----------|----------|-----------|----------|
| RB191118-01   | S22°23'54.2" | W47°33'12.5" | Rio Claro-SP    | 1,05E+02 | 4,00E+01  | 1,20E+02 | 6,00E+01  | 1,34E+06 |
| RB191118-02   | S22°23'47.2" | W47°32'49.0" | Rio Claro-SP    | 0,00E+00 | 1,00E+01  | 9,50E+02 | 5,00E+01  | 3,60E+05 |
| RB191118-03   | S22°23'47.8" | W47°32'45.2" | Rio Claro-SP    | 0,00E+00 | 1,00E+02  | 0,00E+00 | 2,40E+02  | 2,66E+06 |
| RB191118-04   | S22°23'46.6" | W47°32'45.1" | Rio Claro-SP    | 0,00E+00 | 7,00E+01  | 0,00E+00 | 4,00E+01  | 8,80E+05 |
| RB191118-05   | S22°23'43.0" | W47°32'46.0" | Rio Claro-SP    | 6,00E+01 | 0,00E+00  | 0,00E+00 | 1,68E+03  | 1,66E+04 |
| RB200606-01   | S22°33'21.9" | W47°24'46.8" | Limeira-SP      | 1,00E+01 | 0,00E+00  | 0,00E+00 | 0,00E+00  | 1,03E+05 |
| RB200606-02   | S22°33'20.8" | W47°24'46.8" | Limeira-SP      | 2,00E+01 | 1,00E+01  | 2,60E+02 | 1,00E+01  | 1,08E+05 |
| RB200606-03   | S22°33'21.0" | W47°24'45.6" | Limeira-SP      | 0,00E+00 | 7,00E+01  | 2,01E+03 | 4,00E+01  | 2,51E+05 |
| RB200606-04   | S22°33'21.6" | W47°24'46.2" | Limeira-SP      | 5,00E+01 | 2,00E+01  | 4,38E+03 | 4,10E+03  | 1,10E+04 |
| RB201102-03   | S22°21'56.5" | W46°56'53.1" | Mogi-Guaçu-SP   | 1,00E+02 | 0,00E+00  | 9,13E+04 | 6,18E+03  | 7,45E+03 |
| RB210802-01   | S22°43'33.0" | W47°39'38.5" | Piracicaba-SP   | -        | -         | -        | -         | 7,00E+05 |
| RB210802-02   | S22°43'32.3" | W47°39'39.9" | Piracicaba-SP   | -        | -         | -        | -         | 1,35E+04 |
| RB210802-03   | S22°43'32.3" | W47°39'39.8" | Piracicaba-SP   | -        | -         | -        | -         | 3,50E+03 |
| RB210829-01   | S22°21'25.2" | W47°23'09.0" | Araras-SP       | -        | -         | -        | -         | 2,15E+03 |
| RB210829-02   | S22°21'25.8" | W47°23'27.6" | Araras-SP       | -        | -         | -        | -         | 2,45E+03 |
| RB210829-03   | S22°21'49.0" | W47°21'27.9" | Araras-SP       | -        | -         | -        | -         | 1,55E+02 |
| RB210925-01   | S22°20'02.6" | W47°10'22.8" | Conchal-SP      | -        | -         | -        | -         | 3,10E+02 |
| RB210925-02   | S22°22'37.7" | W46°56'26.0" | Mogi Guaçu-SP   | -        | -         | -        | -         | 2,25E+02 |
| RB210925-03   | S22°24'08.2" | W46°56'59.4" | Mogi Mirim-SP   | -        | -         | -        | -         | 2,50E+01 |
| RB210925-04   | S22°16'10.1" | W46°57'05.6" | Estiva Gerbi-SP | -        | -         | -        | -         | 2,75E+03 |
| RB210925-05   | S22°16'10.0" | W46°57'06.0" | Estiva Gerbi-SP | -        | -         | -        | -         | 3,95E+03 |
| RB211011-01   | S22°28'34.8" | W47°28'03.8" | Corderópolis-SP | -        | -         | -        | -         | 2,79E+05 |
| RB211011-02   | S22°28'34.2" | W47°28'03.5" | Corderópolis-SP | -        | -         | -        | -         | 2,21E+05 |
| RB211011-04   | S22°28'52.6" | W47°27'27.3" | Corderópolis-SP | -        | -         | -        | -         | 8,00E+05 |
| RB211011-05   | S22°28'51.6" | W47°27'26.4" | Corderópolis-SP | -        | -         | -        | -         | 3,85E+04 |



|             |              |              |                 |   |   |   |   |          |
|-------------|--------------|--------------|-----------------|---|---|---|---|----------|
| RB211011-06 | S22°28'53.2" | W47°27'25.0" | Corderópolis-SP | - | - | - | - | 5,40E+05 |
| RB211017-01 | S23°32'52.1" | W46°38'35.6" | São Paulo-SP    | - | - | - | - | 3,00E+03 |
| RB211017-02 | S23°33'43.5" | W46°39'26.2" | São Paulo-SP    | - | - | - | - | 6,00E+03 |
| RB211017-03 | S23°35'45.5" | W46°42'44.4" | São Paulo-SP    | - | - | - | - | 2,36E+06 |
| RB211017-04 | S23°35'40.1" | W46°42'56.1" | São Paulo-SP    | - | - | - | - | 5,00E+04 |
| RB211017-05 | S23°35'39.7" | W46°42'56.2" | São Paulo-SP    | - | - | - | - | 2,77E+06 |

---

**Tabela S2.** Identificação das leveduras utilizadas nos ensaios de assimilação dos extratos do fruto.

| <b>Strain ID</b> | <b>LESF ID</b> | <b>Espécie</b>              | <b>Strain ID</b> | <b>LESF ID</b> | <b>Espécie</b>              |
|------------------|----------------|-----------------------------|------------------|----------------|-----------------------------|
| B24              | LESF 1544      | <i>Cyberlindnera</i> sp.    | B376             | LESF 1525      | <i>Candida nanaspora</i>    |
| B56              | LESF 1556      | <i>Cyberlindnera</i> sp.    | B377             | LESF 1533      | <i>Cyberlindnera</i> sp.    |
| B62              | LESF 1542      | <i>Cyberlindnera</i> sp.    | B379             | LESF 1540      | <i>Candida nanaspora</i>    |
| B74              | LESF 1515      | <i>Cyberlindnera</i> sp.    | B380             | LESF 1547      | <i>Cyberlindnera</i> sp.    |
| B81              | LESF 1526      | <i>Cyberlindnera</i> sp.    | B393             | LESF 1557      | <i>Cyberlindnera</i> sp.    |
| B95              | LESF 1509      | <i>Cyberlindnera</i> sp.    | B417             | LESF 1546      | <i>Cyberlindnera</i> sp.    |
| B100             | LESF 1552      | <i>Cyberlindnera</i> sp.    | B418             | LESF 1511      | <i>Candida pseudoaaseri</i> |
| B101             | LESF 1543      | <i>Cyberlindnera</i> sp.    | B450             | LESF 1539      | <i>Cyberlindnera</i> sp.    |
| B116             | LESF 1522      | <i>Cyberlindnera</i> sp.    | B461             | LESF 1305      | <i>Cyberlindnera</i> sp.    |
| B117             | LESF 1534      | <i>Cyberlindnera</i> sp.    | B467             | LESF 1532      | <i>Cyberlindnera</i> sp.    |
| B122             | LESF 1530      | <i>Cyberlindnera</i> sp.    | B469             | LESF 1529      | <i>Cyberlindnera</i> sp.    |
| B127             | LESF 1535      | <i>Candida nanaspora</i>    | B477             | LESF 1510      | <i>Zygoascus ofunaensis</i> |
| B130             | LESF 1523      | <i>Cyberlindnera</i> sp.    | B483             | LESF 1514      | <i>Cyberlindnera</i> sp.    |
| B131             | LESF 1553      | <i>Cyberlindnera</i> sp.    | B489             | LESF 1536      | <i>Cyberlindnera</i> sp.    |
| B274             | LESF 1519      | <i>Cyberlindnera</i> sp.    | B523             | LESF 1524      | <i>Cyberlindnera</i> sp.    |
| B307             | LESF 1548      | <i>Cyberlindnera</i> sp.    | B545             | LESF 1545      | <i>Meyerozyma caribbica</i> |
| B310             | LESF 1513      | <i>Cyberlindnera</i> sp.    | B557             | LESF 1517      | <i>Yamadazyma riverae</i>   |
| B312             | LESF 1549      | <i>Cyberlindnera</i> sp.    | B560             | LESF 1516      | <i>Candida pseudoaaseri</i> |
| B320             | LESF 1550      | <i>Cyberlindnera</i> sp.    | B563             | LESF 1512      | <i>Meyerozyma caribbica</i> |
| B328             | LESF 1541      | <i>Candida pseudoaaseri</i> | B565             | LESF 1537      | <i>Meyerozyma caribbica</i> |
| B343             | LESF 1538      | <i>Yamadazyma riverae</i>   | B592             | LESF 1518      | <i>Yamadazyma riverae</i>   |
| B345             | LESF 1432      | <i>Cyberlindnera</i> sp.    | B599             | LESF 1531      | <i>Yamadazyma riverae</i>   |
| B350             | LESF 1528      | <i>Cyberlindnera</i> sp.    | B612             | LESF 1520      | <i>Meyerozyma caribbica</i> |
| B365             | LESF 1527      | <i>Candida nanaspora</i>    | B614             | LESF 1469      | <i>Meyerozyma caribbica</i> |

**Tabela S3.** Identificação e abundância dos fungos filamentosos isolados de frutos infestados

| <b>Blastn identification</b>        | <b>Identificação</b> | <b>Cidade-Estado</b> | <b>OTU em PDA</b> | <b>OTU em MA</b> |
|-------------------------------------|----------------------|----------------------|-------------------|------------------|
| <i>Aspergillus aculeatus</i>        | RB191118-04          | Rio Claro-SP         | 9                 | 9                |
| <i>Cladosporium cladosporioides</i> | RB191118-05          | Rio Claro-SP         | 0                 | 1                |
| <i>Coniella castaneicola</i>        | RB211017-01          | São Paulo-SP         | 0                 | 1                |
| <i>Cytospora pavettae</i>           | RB191118-03          | Rio Claro-SP         | 1                 | 2                |
| <i>Cytospora</i> sp.                | RB191118-02          | Rio Claro-SP         | 2                 | 0                |
| <i>Cytospora</i> sp.                | RB191118-03          | Rio Claro-SP         | 4                 | 3                |
| <i>Diplodia pseudoseriata</i>       | RB191118-04          | Rio Claro-SP         | 0                 | 1                |
| <i>Penicillium brevicompactum</i>   | RB211017-03          | São Paulo-SP         | 1                 | 4                |
| <i>Penicillium herquei</i>          | RB191118-03          | Rio Claro-SP         | 8                 | 5                |
| <i>Penicillium</i> sp.              | RB211011-01          | Corderópolis-SP      | 3                 | 1                |
| <i>Penicillium steckii</i>          | RB191118-04          | Rio Claro-SP         | 0                 | 1                |
| <i>Sarocladium implicatum</i>       | RB191118-03          | Rio Claro-SP         | 0                 | 1                |
| <i>Sarocladium</i> sp.              | RB191118-05          | Rio Claro-SP         | 0                 | 1                |
| <i>Talaromyces minioluteus</i>      | RB191118-04          | Rio Claro-SP         | 1                 | 1                |
| <i>Trichoderma koningiopsis</i>     | RB191118-04          | Rio Claro-SP         | 0                 | 1                |
| <i>Xenoacremonium falcatum</i>      | RB211011-02          | Corderópolis-SP      | 1                 | 0                |

**Tabela S4.** Análise estatística dos co-cultivos e avaliações de antagonismo por compostos voláteis entre *Cyberlindnera* sp. e fungos filamentosos recorrentes

|                                                 | Co-cultivo    |                             | Compostos voláteis           |                |                |
|-------------------------------------------------|---------------|-----------------------------|------------------------------|----------------|----------------|
|                                                 | <b>T</b>      | <b>C</b>                    | <b>T</b>                     | <b>CA</b>      | <b>C</b>       |
| <b>F2</b> ( <i>Aspergillus aculeatus</i> )      | 0,79 ± 0,07 a | 15,58 ± 0,38 b <sup>1</sup> | 11,25 ± 0,30 a <sup>4</sup>  | 12,00 ± 0,27 a | 11,12 ± 0,10 a |
| <b>F4</b> ( <i>Penicillium herquei</i> )        | 0,86 ± 0,09 a | 2,89 ± 0,09 b <sup>2</sup>  | 2,65 ± 0,12 a <sup>5</sup>   | 2,71 ± 0,17 a  | 2,98 ± 0,12 a  |
| <b>F9</b> ( <i>Penicillium brevicompactum</i> ) | 0,72 ± 0,04 a | 2,69 ± 0,06 b <sup>3</sup>  | 2,39 ± 0,05 b <sup>6,7</sup> | 2,48 ± 0,04 b  | 2,79 ± 0,10 a  |

1. Wilcoxon rank sum exact test, W = 25, P = 0,01

2. Two Sample t-test, t = 14,65, gl = 8, P = 0,00

3. Two Sample t-test, t = 25,39, gl = 8, P = 0,00

4. Análise de Variância, gl = 2; estatística F = 3,41; P = 0,07

5. Análise de Variância, gl = 2; estatística F = 1,43; P = 0,28

6. Análise de Variância, gl = 2; estatística F = 0,22; P = 0,01

7. O tratamento F9 "T", falhou no teste de normalidade (teste de Shapiro-Wilk; W = 0,76; P = 0,04), devido a robustidade dos testes paramétricos, decidimos continuar a análise paramétrica, uma vez que a homogeneidade de variâncias não foi violada (teste de Bartlett, K-squared = 3,09; df = 2, P = 0,21)

**Tabela S5.** Valores de preferência (número absoluto) dos besouros, categorizados por sexo e tratamento escolhido, em cada uma das avaliações realizadas. Sendo, Cy - *Cyberlindnera* sp. B56 (em extrato do fruto fermentado), Y - *Yamadazyma riverae* B343 (em extrato do fruto fermentado), M - *Meyerozyma caribbica* B565 (em extrato do fruto fermentado), E – Extrato dos frutos, C – Água estéril, N – Ausência de escolha, CE – Células de *Cyberlindnera* sp. B56 recuperadas e suspensas em PBS 1×, Cy/E – Extrato do fruto fermentado contendo células de *Cyberlindnera* sp. B56 e F/E – Extrato do fruto fermentado filtrado.

| Avaliação 1  |    |   |   |   |   |  |
|--------------|----|---|---|---|---|--|
|              | Cy | Y | E | C | N |  |
| <b>Fêmea</b> | 23 | 7 | 3 | 0 | 2 |  |
| <b>Macho</b> | 13 | 3 | 4 | 0 | 0 |  |

| Avaliação 2  |    |   |   |   |   |  |
|--------------|----|---|---|---|---|--|
|              | Cy | M | E | C | N |  |
| <b>Fêmea</b> | 24 | 7 | 3 | 0 | 1 |  |
| <b>Macho</b> | 11 | 6 | 2 | 0 | 1 |  |

| Avaliação 3  |   |    |   |   |   |  |
|--------------|---|----|---|---|---|--|
|              | Y | M  | E | C | N |  |
| <b>Fêmea</b> | 9 | 10 | 8 | 2 | 6 |  |
| <b>Macho</b> | 2 | 9  | 2 | 0 | 7 |  |

| Avaliação 4  |   |    |      |     |   |   |
|--------------|---|----|------|-----|---|---|
|              | C | CE | Cy/E | F/E | E | N |
| <b>Fêmea</b> | 6 | 5  | 18   | 31  | 9 | 3 |
| <b>Macho</b> | 2 | 1  | 7    | 8   | 6 | 0 |

**Tabela S6.** Resultado do teste *Chi-Square Goodness of Fit* comparando as escolhas registradas nos ensaios, com a distribuição esperada de uma probabilidade estocástica, separadas por sexo e ensaios.

| Avaliação  | X-squared | gl | P        |
|------------|-----------|----|----------|
| 1 - Fêmeas | 49,429    | 4  | 4,75E-10 |
| 1 - Machos | 28,5      | 4  | 9,88E-06 |
| 2 - Fêmeas | 55,714    | 4  | 2,30E-11 |
| 2 - Machos | 20,5      | 4  | 0,0004   |
| 3 - Fêmeas | 5,7143    | 4  | 0,2215   |
| 3 - Machos | 14,5      | 4  | 0,00586  |
| 4 - Fêmeas | 47,667    | 5  | 4,15E-09 |
| 4 - Machos | 14,5      | 5  | 0,01273  |

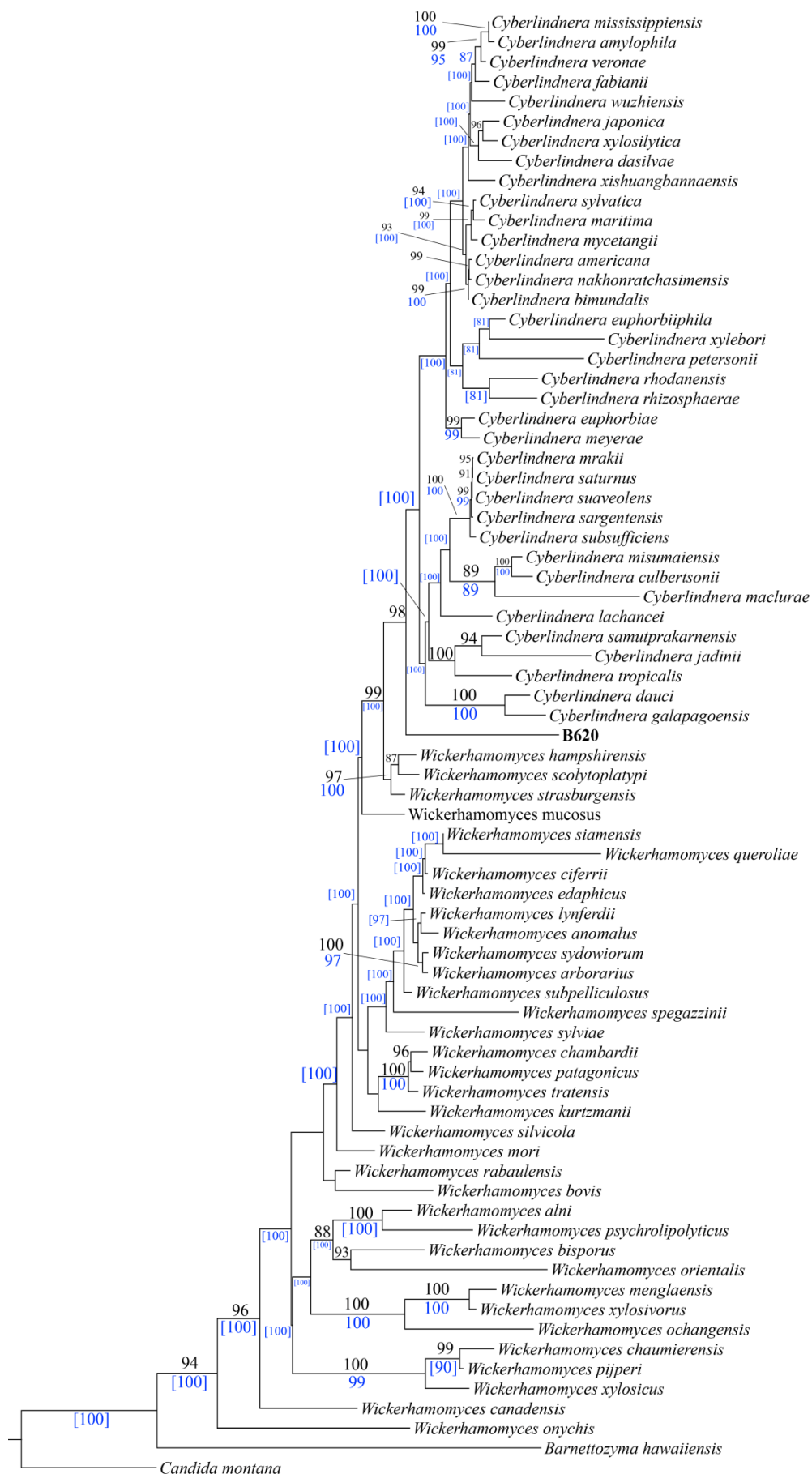
**Tabela S7.** Resultado de teste *Exact binomial* realizado como *post hoc* para comparar as preferências observadas com a distribuição estocástica esperada de cada escolha, os valores de P de cada escolha são apresentados separados por sexo e ensaios, sendo: Cy - *Cyberlindnera* sp. B56 (em extrato do fruto fermentado), Y - *Yamadazyma riverae* B343 (em extrato do fruto fermentado), M - *Meyerozyma caribbica* B565 (em extrato do fruto fermentado), E – Extrato dos frutos, C – Água estéril, N – Ausência de escolha, CE – Células de *Cyberlindnera* sp. B56 recuperadas e suspensas em PBS 1×, Cy/E – Extrato do fruto fermentado contendo células de *Cyberlindnera* sp. B56, e F/E – Extrato do fruto fermentado filtrado.

| Teste <i>Exact binomial</i> |          |         |         |          |         |         |
|-----------------------------|----------|---------|---------|----------|---------|---------|
| Avaliação 1                 |          |         |         |          |         |         |
|                             | Cy       | Y       | E       | C        | N       |         |
| Fêmea                       | 5,49E-09 | 1       | 0,1352  | 0,00093  | 0,03322 |         |
| Macho                       | 1,52E-05 | 0,7818  | 1       | 0,02151  | 0,02151 |         |
| Avaliação 2                 |          |         |         |          |         |         |
|                             | Cy       | M       | E       | C        | N       |         |
| Fêmea                       | 6,74E-10 | 1       | 0,1352  | 0,00093  | 0,00921 |         |
| Macho                       | 0,00056  | 0,265   | 0,4019  | 0,02151  | 0,1559  |         |
| Avaliação 3                 |          |         |         |          |         |         |
|                             | Y        | M       | E       | C        | N       |         |
| Fêmea <sup>1</sup>          | -        | -       | -       | -        | -       |         |
| Macho                       | 0,4019   | 0,00998 | 0,4019  | 0,02151  | 0,09822 |         |
| Avaliação 4                 |          |         |         |          |         |         |
|                             | C        | CE      | Cy/E    | F/E      | E       | N       |
| Fêmea                       | 0,05787  | 0,02568 | 0,07949 | 1,27E-07 | 0,4292  | 0,00226 |
| Macho                       | 0,4114   | 0,1641  | 0,1038  | 0,04802  | 0,2725  | 0,02434 |

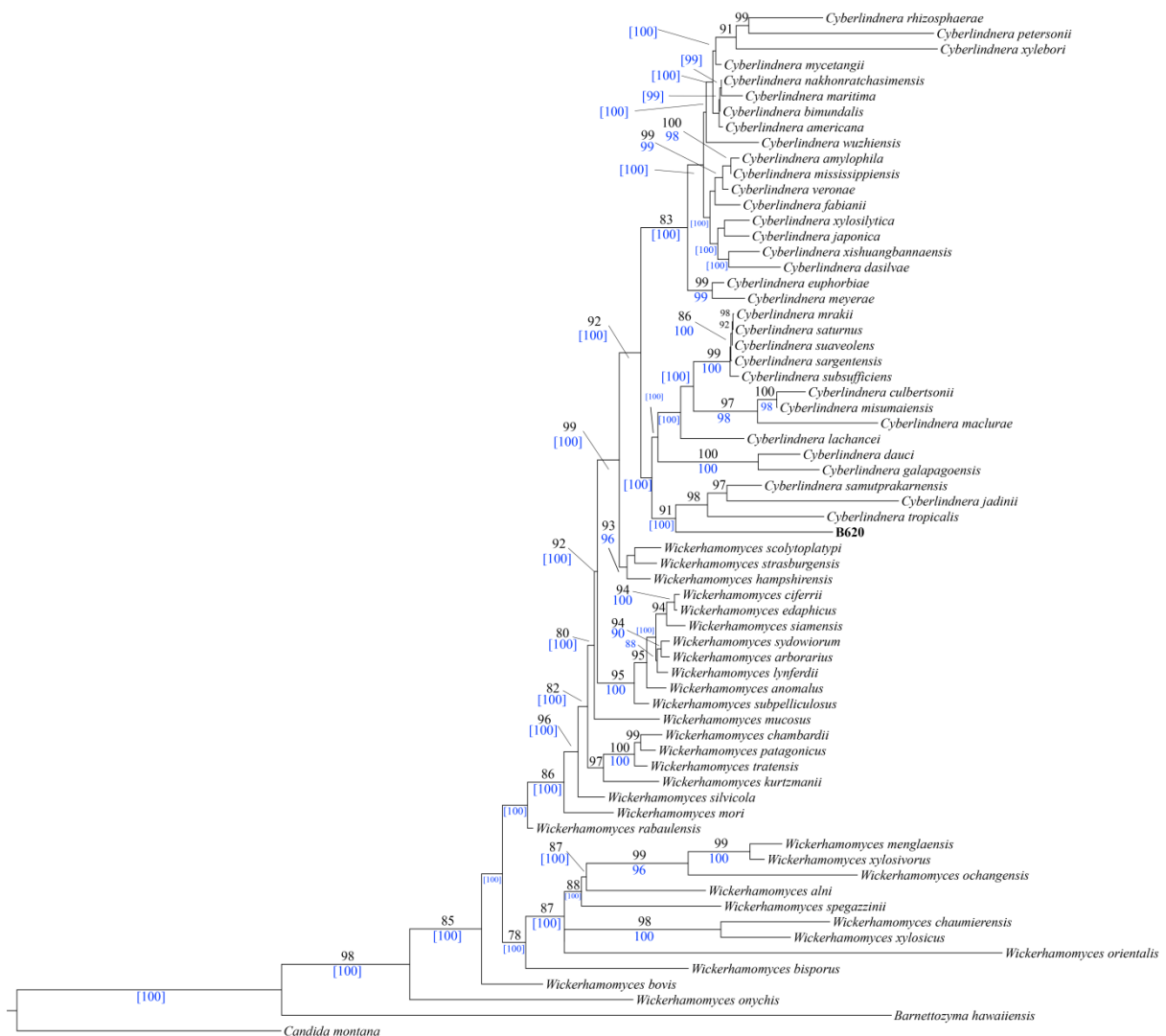
1. Não foi realizada análise para essa interação, uma vez que, não foram observadas diferenças estatísticas no teste *Chi-Square Goodness of Fit* ( $X\text{-squared} = 5,71$ ; gl = 4; P = 0,22) comparando as escolhas registradas nos ensaios com a distribuição esperada de uma probabilidade estocástica.

#### Capítulo 4 - Polimorfismos em genes de rDNAs de *Cyberlindnera* sugerem eventos de evolução por *birth and death*

**Figura S1.** Posição filogenética de *Cyberlindnera* sp. B620 (em negrito) baseado em ITS (ou seja, ITS1, 5.8S e ITS2) e LSU, como partições. A filogenia foi inferida com 1.430 nucleotídeos no alinhamento final (74 sequências). A árvore foi inferida com critérios de *maximum likelihood* (ML) e *neighbor joining* (NJ). A inferência ML foi selecionada como topologia principal. Os valores de suporte de *bootstrap* para ML e NJ (em azul) são mostrados acima e abaixo dos ramos, respectivamente. Para fins gráficos foram mostrados apenas *bootstraps* superiores a 80. Para a reconstrução de ML, 225 iterações foram examinadas e uma árvore de consenso de probabilidade logarítmica (ou seja, LogL) de -21.801,273 foi obtida. *Candida montana* foi definida como grupo externo.

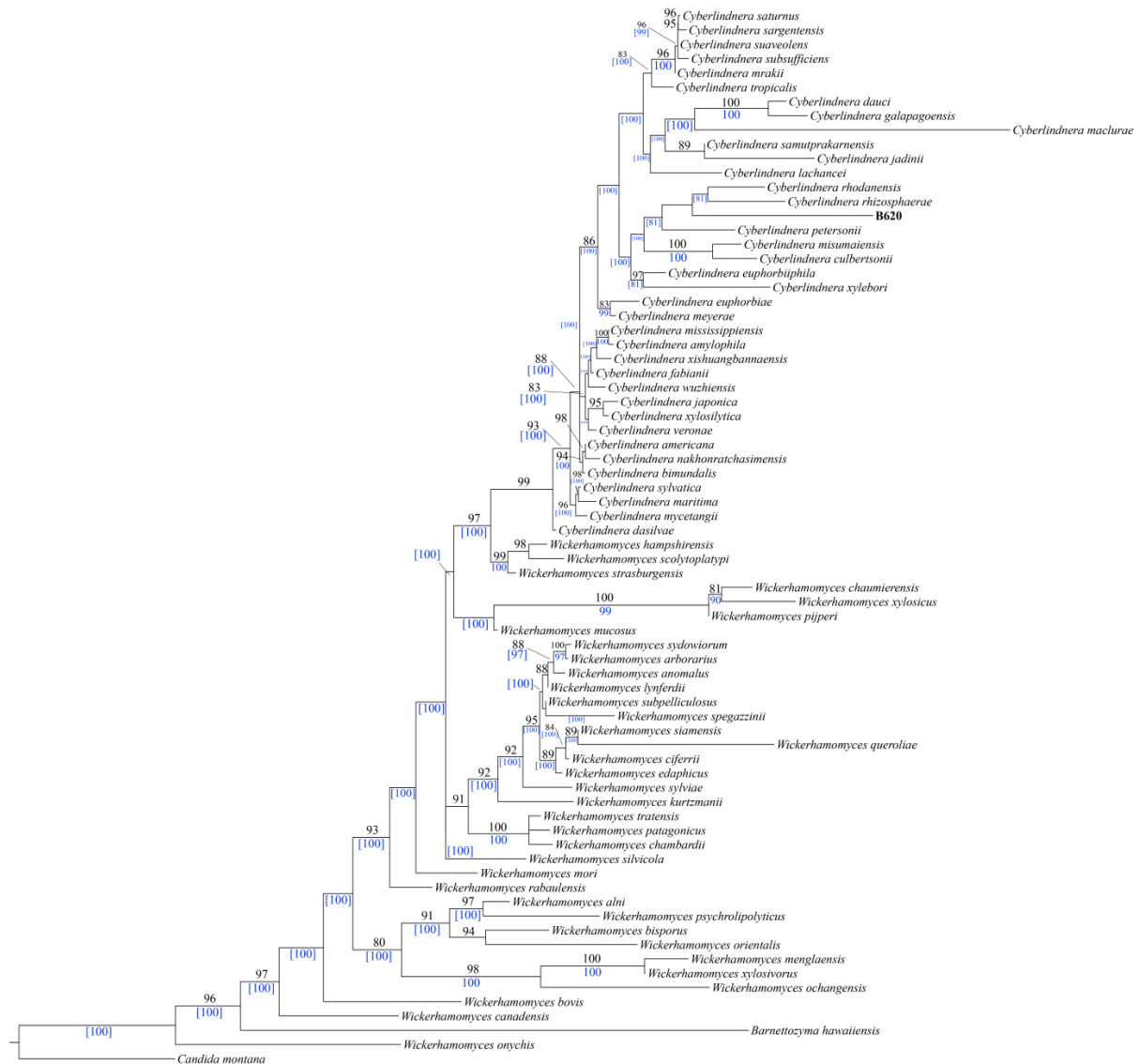


**Figura S2.** Posição filogenética de *Cyberlindnera* sp. B620 (em negrito) baseado em ITS (ou seja, ITS1, 5.8S e ITS2), como partição. A filogenia foi inferida com 809 nucleotídeos no alinhamento final (66 sequências). A árvore foi inferida com critérios de *maximum likelihood* (ML) e *neighbor joining* (NJ). A inferência ML foi selecionada como topologia principal. Os valores de suporte de *bootstrap* para ML e NJ (em azul) são mostrados acima e abaixo dos ramos, respectivamente. Para fins gráficos foram mostrados apenas *bootstraps* superiores a 80. Para reconstrução de ML, foram examinadas 150 iterações e obteve-se LogL de -14.126,921. *Candida montana* foi definida como grupo externo

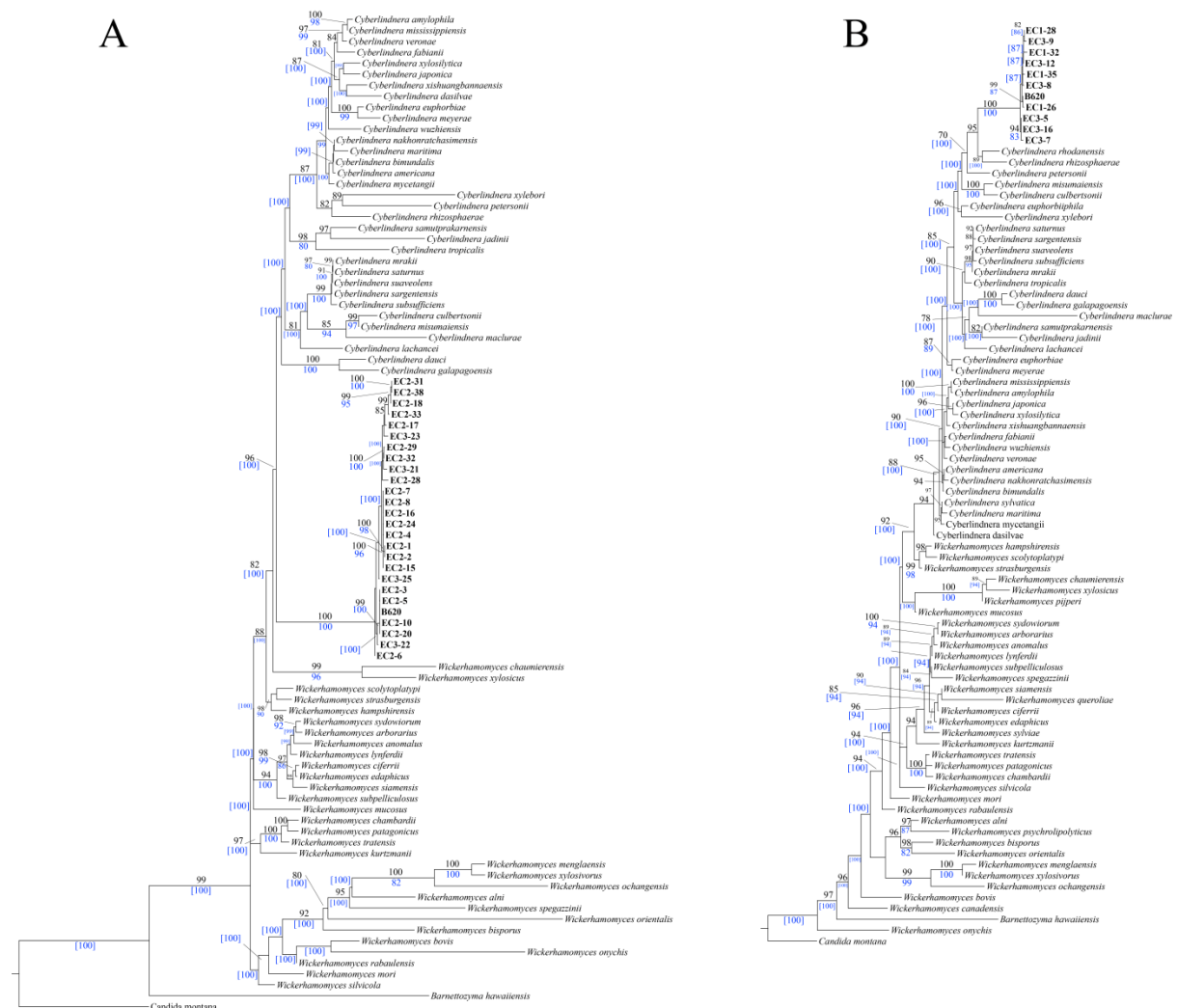




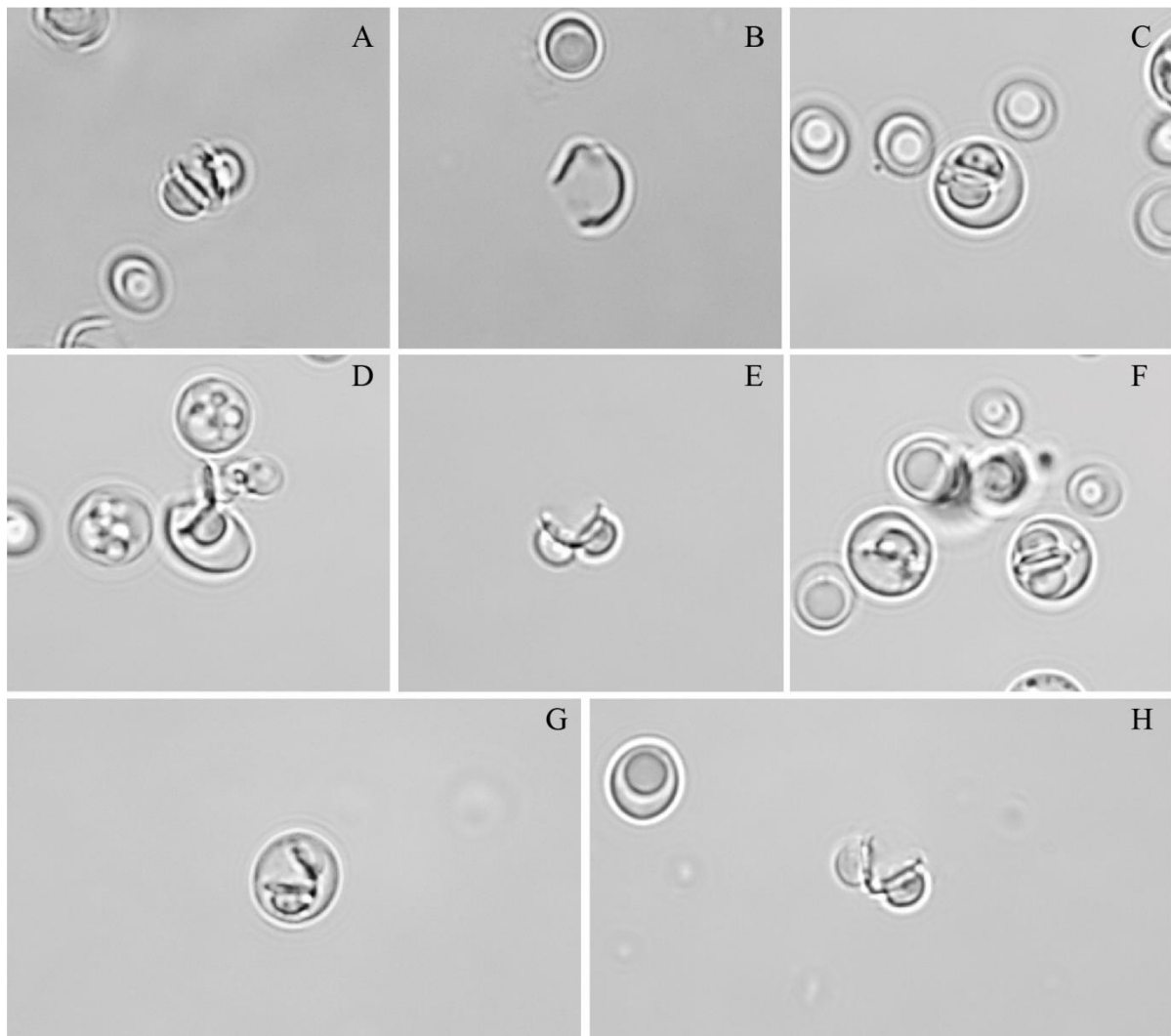
**Figura S3.** Posição filogenética de *Cyberlindnera* sp. B620 (em negrito) com base em LSU. A filogenia foi inferida com 621 nucleotídeos no alinhamento final (74 sequências). A árvore foi inferida com critérios de *maximum likelihood* (ML) e *neighbor joining* (NJ). A inferência ML foi selecionada como topologia principal. Os valores de suporte de *bootstrap* para ML e NJ (em azul) são mostrados acima e abaixo dos ramos, respectivamente. Para fins gráficos foram mostrados apenas *bootstraps* superiores a 80. Para reconstrução de ML, foram examinadas 351 iterações e obteve-se LogL de -7360,203. *Candida montana* foi definida como grupo externo.



**Figura S4.** Posição filogenética dos clones de *Cyberlindnera* sp. (em negrito) baseados em ITS (ou seja, ITS1, 5.8S e ITS2) e LSU, como partições. A árvore foi inferida com critérios de *maximum likelihood* (ML) e *neighbor joining* (NJ). A inferência ML foi selecionada como topologia principal. Os valores de suporte de *bootstrap* para ML e NJ (em azul) são mostrados acima e abaixo dos ramos, respectivamente. Para fins gráficos foram mostrados apenas *bootstraps* superiores a 80. *Candida montana* foi definida como grupo externo. **A.** A filogenia ITS foi inferida com 811 nucleotídeos no alinhamento final (91 sequências). Para a reconstrução de ML, 503 iterações foram examinadas e uma árvore de consenso de probabilidade logarítmica (isto é, LogL) de -14.899,365 foi obtida. **B.** A filogenia da LSU foi inferida com 624 nucleotídeos no alinhamento final (84 sequências). Para a reconstrução de ML, 222 iterações foram examinadas e uma árvore de consenso de probabilidade logarítmica (ou seja, LogL) de -7510,431 foi obtida.



**Figura S5.** Fase sexual de *Cyberlindnera* sp. com ascósporos em forma de chapéu liberados (em A, B, D, E, e H) ou não (C, F, e G) dos ascos. A esporulação foi conduzida em ágar extrato de malte a 5%, 25 °C, após 10 dias. Estruturas sexuais foram observadas em baixa abundância nas seguintes combinações: B56, B620 e B56/B620.



**A**

B620  
EC2-3  
EC2-5  
EC2-10  
EC2-20  
EC2-6  
EC3-25  
EC3-22  
EC2-29  
EC2-32  
EC3-21  
EC2-28  
EC2-17  
EC3-23  
EC2-18  
EC2-31  
EC2-38  
EC2-33  
EC2-1  
EC2-2  
EC2-7  
EC2-8  
EC2-16  
EC2-24  
EC2-4  
EC2-15

**B**

B620  
EC2-20  
EC2-3  
EC2-5  
EC2-10  
EC3-22  
EC3-23  
EC2-6  
EC2-1  
EC2-2  
EC2-4  
EC2-7  
EC2-8  
EC2-15  
EC2-16  
EC2-24  
EC2-29  
EC2-32  
EC2-33  
EC3-25  
EC2-18  
EC2-31  
EC2-38  
EC3-21  
EC2-17  
EC2-28

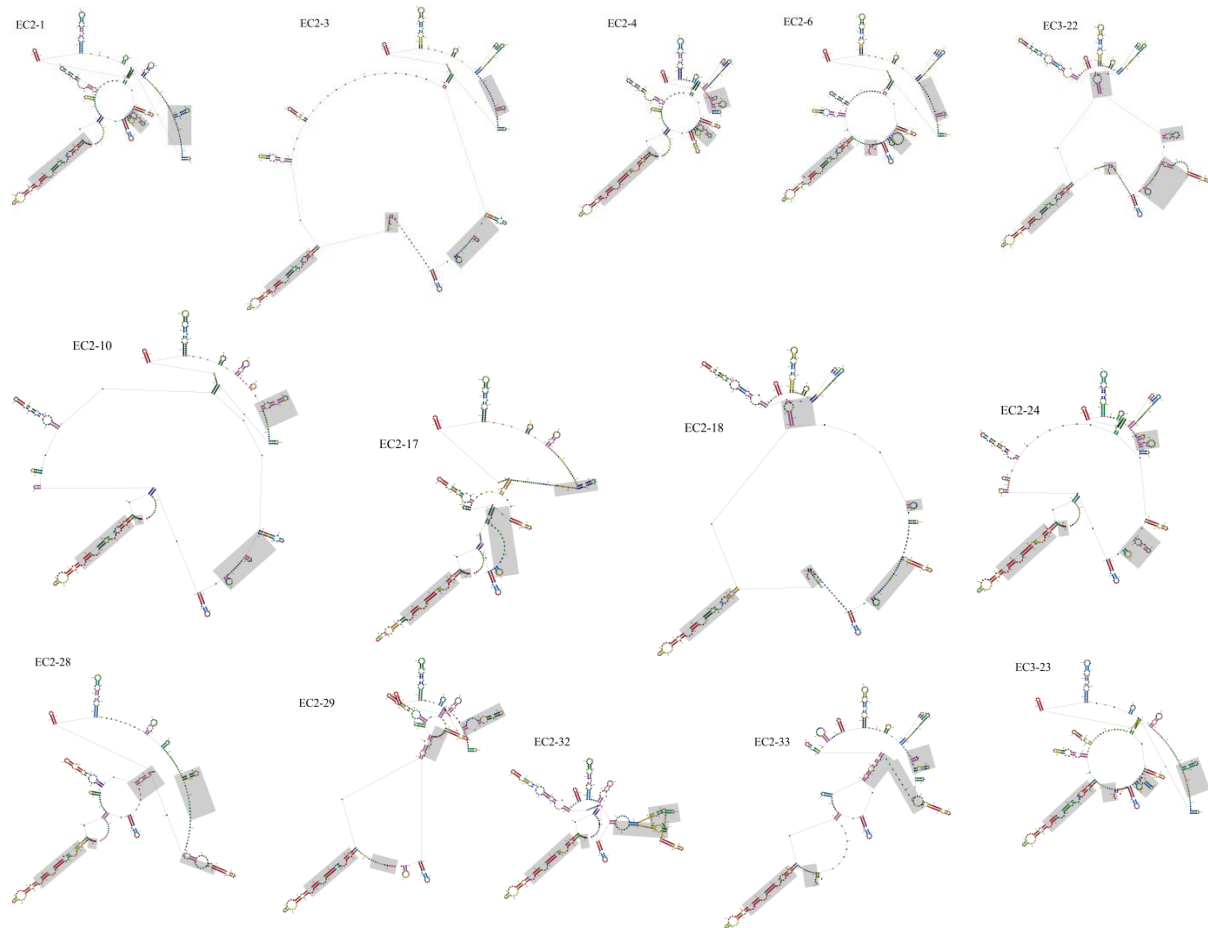
**C**

B620  
EC2-3  
EC2-6  
EC2-7  
EC2-8  
EC2-10  
EC2-15  
EC2-16  
EC2-17  
EC2-18  
EC2-20  
EC2-24  
EC2-31  
EC2-32  
EC2-33  
EC2-38  
EC3-25  
EC2-4  
EC2-5  
EC2-28  
EC3-21  
EC3-22  
EC3-23  
EC2-29  
EC2-1  
EC2-2

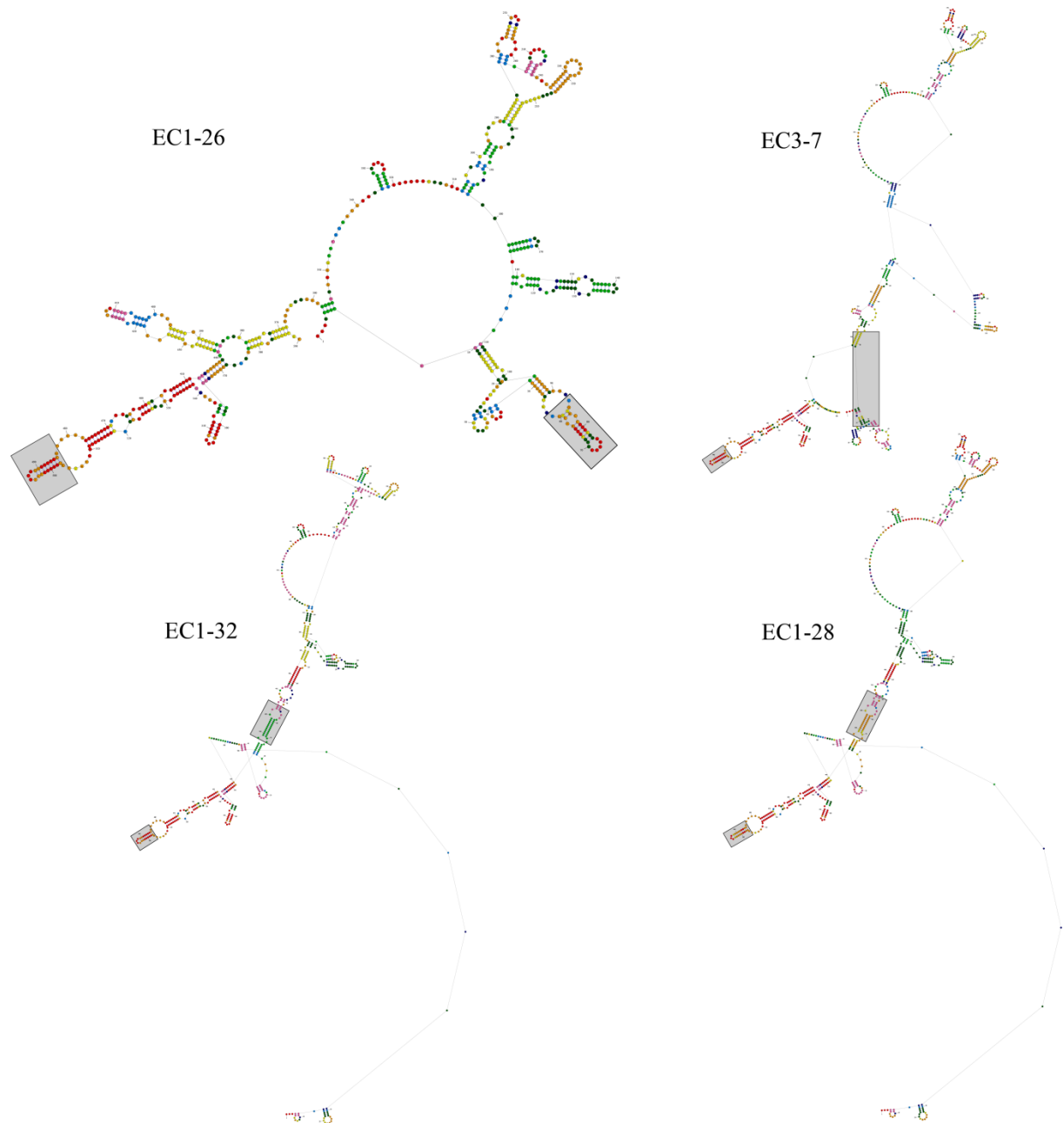
**D**

B620  
EC1-26  
EC1-32  
EC1-35  
EC3-8  
EC3-12  
EC1-28  
EC3-9  
EC3-5  
EC3-16  
EC3-7

**Figura S7.** Exemplos de estruturas de rRNA preditas para ITS dos clones de *Cyberlindnera* sp. As posições variáveis (fornecidas na Tabela S4) foram destacadas em cinza após o alinhamento dos clones. Estruturas secundárias de rRNA foram geradas para todos os clones e agrupadas como mostrado na Tabela S7-8. As cores indicam limites de probabilidade de acordo com a previsão da estrutura do RNA (ou seja, 99% em vermelho, 95% em laranja, 90% em amarelo, 80% em verde escuro, 70% em verde claro, 60% em azul claro, 50% em azul escuro, 0% em rosa).



**Figura S8.** Exemplos de estruturas de rRNA previstas para LSU dos clones de *Cyberlindnera* sp., as posições variáveis (fornecidas na Tabela S4) foram destacadas em cinza, seguindo o alinhamento dos clones. Estruturas secundárias de rRNA foram geradas para todos os clones e agrupadas como mostrado na Tabela S7-8. As cores indicam limites de probabilidade de acordo com a previsão da estrutura do RNA (ou seja, 99% em vermelho, 95% em laranja, 90% em amarelo, 80% em verde escuro, 70% em verde claro, 60% em azul claro, 50% em azul escuro, 0% em rosa).



**Tabela S1.** Fonte das leveduras e clones.

| Isolado             | Fonte de isolamento                                                                                                                                                                        | Clones de ITS <sup>1</sup>                                                                                     | Clones de D1/D2 <sup>2</sup>               |
|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| LESF 1556<br>(B56)  | Isolado externamente do corpo de fêmea de <i>Spermophthorus apuleiae</i> infectando frutos de <i>Libidibia ferrea</i> (RB191118-01), amostrado em Rio Claro-SP (S22°23'54.2" W47°33'12.5") | EC2-28, EC2-29, EC2-31, EC2-32, EC2-33, EC2-38                                                                 | EC1-26, EC1-28, EC1-32, EC1-35             |
| LESF 1553<br>(B131) | Isolado de frutos de <i>Libidibia ferrea</i> (RB191118-02) infestados com <i>Spermophthorus apuleiae</i> , amostrados em Rio Claro-SP (S22°23'47.2" W47°32'49.0")                          | EC2-1, EC2-10, EC2-15, EC2-16, EC2-17, EC2-18, EC2-2, EC2-20, EC2-24, EC2-3, EC2-4, EC2-5, EC2-6, EC2-7, EC2-8 | -                                          |
| LESF 1528<br>(B350) | Isolado internamente do corpo de macho de <i>Spermophthorus apuleiae</i> infestando frutos de <i>Libidibia ferrea</i> (RB200606-04), amostrado em Limeira-SP (S22°33'21.6" W47°24'46.2")   | EC3-21, EC3-22, EC3-23, EC3-25                                                                                 | EC3-5, EC3-7, EC3-8, EC3-9, EC3-12, EC3-16 |

---

|                     |                                                                                                                                                                    |   |
|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|
| LESF 1555<br>(B620) | Isolado de frutos de <i>Libidibia ferrea</i> (RB210802-03) infestados com <i>Spermophthorus apuleiae</i> , amostrados em Piracicaba-SP (S22°43'32.3" W47°39'39.8") | - |
|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|

---

<sup>1</sup> Sequências de clones de ITS estão disponíveis com os códigos de acesso no GenBank: OQ268178-OQ268202.

<sup>2</sup> Sequências de clones de D1/D2 estão disponíveis com os códigos de acesso no GenBank: OQ253418-OQ253427.

**Tabela S2.** Modelos de substituição de nucleotídeos utilizados para a análise filogenética.

---

| Análise filogenética          | Dados do alinhamento                                                                                                                                                 | Modelo das partições                                                      |
|-------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| Análise da árvore de partição | O alinhamento compreende 74 sequências com 1.430 colunas, sendo 902 padrões distintos, 568 informativos de parcimônia, 208 <i>singletons</i> e 654 sítios constantes | ITS1 (HKY+F+G4), 5.8S (K2P+FQ+I+G4), ITS2 (SYM+FQ+G4), D1/D2 (GTR+F+I+G4) |
| Análise da árvore de ITS      | O alinhamento compreende 66 sequências com 809 colunas, sendo 593 padrões distintos, 370 informativos de parcimônia, 148 <i>singletons</i> e 291 sítios constantes   | ITS1 (HKY+F+G4), 5.8S (K2P+FQ+I+G4), ITS2 (SYM+FQ+G4)                     |
| Análise da árvore de LSU      | O alinhamento compreende 74 sequências com 621 colunas, sendo 315 padrões distintos, 198 informativos de parcimônia, 60 <i>singletons</i> e 363 sítios constantes    | D1/D2 (GTR+F+I+G4)                                                        |

---



|                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                              |
|------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| Análise de rede de ITS | ITS1: O alinhamento compreende 26 sequências com 192 colunas, sendo 38 padrões distintos, 23 informativos de parcimônia, 7 <i>singletons</i> e 162 sítios constantes; ITS2: O alinhamento possui 26 sequências com 220 colunas, sendo 43 padrões distintos, 17 informativos de parcimônia, 19 <i>singletons</i> e 184 sítios constantes | ITS1 (SYM+G4), ITS2 (SYM+G4) |
| Análise de rede de LSU | O alinhamento compreende 11 sequências com 591 colunas, sendo 26 padrões distintos, 14 informativos de parcimônia, 12 <i>singletons</i> e 565 sítios constantes                                                                                                                                                                         | D1/D2 (K2P+I)                |

**Tabela S3.** Sequências usadas nas análises filogenéticas.

| <b>Espécies</b>                           | <b>ITS GenBank</b> | <b>D1/D2 GenBank</b> | <b>Isolado</b>        |
|-------------------------------------------|--------------------|----------------------|-----------------------|
| <i>Barnettozyma hawaiiensis</i>           | NR_153631          | NG_058701            | CBS 8760              |
| <i>Candida montana</i>                    | NR_153644          | KY106586             | CBS 8057              |
| <i>Cyberlindnera americana</i>            | NR_152479          | NG_070512            | CBS 5644/NRRL Y-2156  |
| <i>Cyberlindnera amylophila</i>           | NR_152480          | NG_058750            | CBS 7020/NRRL YB-1287 |
| <i>Cyberlindnera bimundalis</i>           | NR_152481          | NG_069004            | CBS 5642/NRRL Y-5343  |
| <i>Cyberlindnera culbertsonii</i>         | OK050628           | KM408121             | yHAB218               |
| <i>Cyberlindnera dasilvae</i>             | NR_175652          | MT311982             | UFMG-CM-Y519          |
| <i>Cyberlindnera dauci</i>                | MT636878           | MT636878             | KBP:Y-6686            |
| <i>Cyberlindnera euphorbiae</i>           | NR_152482          | NG_058754            | CBS 8033/NRRL Y-17232 |
| <i>Cyberlindnera euphorbiiphila</i>       | -                  | NG_058748            | NRRL Y-12742          |
| <i>Cyberlindnera fabianii</i>             | NR_149345          | NG_055731            | CBS 5640/NRRL Y-1871  |
| <i>Cyberlindnera galapagoensis</i>        | NR_159816          | KJ020281             | UFMGCLQCA-24SC-025    |
| <i>Cyberlindnera jadinii</i>              | NR_111211          | AY497671             | CBS 1600/WM 45        |
| <i>Cyberlindnera japonica</i>             | NR_152483          | NG_058752            | CBS 7209/NRRL YB-2750 |
| <i>Cyberlindnera lachancei</i>            | NR_152484          | NG_058749            | CBS 8557/NRRL Y-27008 |
| <i>Cyberlindnera macluriae</i>            | NR_152485          | NG_058747            | CBS 8671/NRRL Y-5377  |
| <i>Cyberlindnera maritima</i>             | NR_152474          | KY106562             | CBS 5107              |
| <i>Cyberlindnera meyeriae</i>             | NR_152486          | NG_058755            | CBS 7076/NRRL Y-17236 |
| <i>Cyberlindnera mississippiensis</i>     | NR_152487          | NG_058751            | CBS 7023/NRRL YB-1294 |
| <i>Cyberlindnera misumaiensis</i>         | NR_152488          | NG_066354            | CBS 8062/NRRL Y-17389 |
| <i>Cyberlindnera mrakii</i>               | NR_073352          | NG_069003            | CBS 1707/NRRL Y-1364  |
| <i>Cyberlindnera mycetangii</i>           | NR_152475          | NG_060382            | CBS 8675/NRRL Y-6843  |
| <i>Cyberlindnera nakhonratchasimensis</i> | KY102223           | KY106593             | CBS 11706             |
| <i>Cyberlindnera petersonii</i>           | NR_152489          | NG_066355            | CBS 5555/NRRL Y-3808  |
| <i>Cyberlindnera rhizosphaerae</i>        | NR_152490          | NG_059000            | CBS 11400             |

|                                         |           |           |                        |
|-----------------------------------------|-----------|-----------|------------------------|
| <i>Cyberlindnera rhodanensis</i>        | -         | NG_058753 | NRRL Y-7854            |
| <i>Cyberlindnera samutprakarnensis</i>  | NR_119417 | NG_059001 | CBS 12528              |
| <i>Cyberlindnera sargentensis</i>       | NR_165970 | KY107392  | CBS 6342               |
| <i>Cyberlindnera saturnus</i>           | NR_165971 | KY107399  | CBS 254                |
| <i>Cyberlindnera</i> sp.                | OQ268217  | OQ253431  | B620/LESF 1555         |
| <i>Cyberlindnera suaveolens</i>         | NR_165972 | KY107409  | CBS 255                |
| <i>Cyberlindnera subsufficiens</i>      | NR_165973 | NG_059002 | CBS 5763               |
| <i>Cyberlindnera sylvatica</i>          | -         | MT316316  | CBS 16335              |
| <i>Cyberlindnera tropicalis</i>         | KY010353  | NG_064446 | DMKU-WBBC14            |
| <i>Cyberlindnera veronae</i>            | NR_152491 | KY107421  | CBS 6591               |
| <i>Cyberlindnera wuzhiensis</i>         | FJ606824  | FJ606825  | AS2.3480               |
| <i>Cyberlindnera xishuangbannaensis</i> | NR_173266 | NG_079511 | NYNU 16752             |
| <i>Cyberlindnera xylebori</i>           | KY103116  | KY107422  | CBS 12187              |
| <i>Cyberlindnera xylosilytica</i>       | NR_172382 | NG_064313 | NRRL YB-2097           |
| <i>Wickerhamomyces alni</i>             | KY105852  | EF550294  | CBS 6986/NRRL Y-11625  |
| <i>Wickerhamomyces anomalus</i>         | DQ249196  | EF550341  | CBS 5759/NRRL Y-366    |
| <i>Wickerhamomyces arborarius</i>       | FR670785  | FN908198  | CBS 12941              |
| <i>Wickerhamomyces bisporus</i>         | KY105897  | EF550296  | CBS 1890/NRRL Y-1482   |
| <i>Wickerhamomyces bovis</i>            | KY105898  | KY110109  | CBS 2616               |
| <i>Wickerhamomyces canadensis</i>       | -         | EF550300  | NRRL Y-1888            |
| <i>Wickerhamomyces chambardii</i>       | KY105900  | EF550344  | CBS 1900/NRRL Y-2378   |
| <i>Wickerhamomyces chaumierensis</i>    | HM156503  | HM156533  | CBS 8565               |
| <i>Wickerhamomyces ciferrii</i>         | NR_111335 | NG_057172 | NRRL Y-1031            |
| <i>Wickerhamomyces edaphicus</i>        | KY105904  | KY110120  | CBS 10408              |
| <i>Wickerhamomyces hampshirensis</i>    | KY105905  | EF550334  | CBS 7208/NRRL YB-4128  |
| <i>Wickerhamomyces kurtzmanii</i>       | MK573960  | MK573939  | CBS 15418/TF5-16-2     |
| <i>Wickerhamomyces lynferdii</i>        | JX679239  | EF550342  | BCRC 22676/NRRL Y-7723 |
| <i>Wickerhamomyces menglaensis</i>      | KY213818  | KY213812  | NYNU 1673              |

|                                           |          |          |                             |
|-------------------------------------------|----------|----------|-----------------------------|
| <i>Wickerhamomyces mori</i>               | JX204288 | JX204287 | CBS 12678                   |
| <i>Wickerhamomyces mucosus</i>            | KY105908 | EF550337 | CBS 6341/NRRL YB-1344       |
| <i>Wickerhamomyces ochangensis</i>        | KY105909 | HM485464 | CBS 11843/N7a-Y2/KCTC 17870 |
| <i>Wickerhamomyces onychis</i>            | KY105910 | U75421   | CBS 5587/NRRL Y-7123        |
| <i>Wickerhamomyces orientalis</i>         | KF938677 | KF938676 | KH-D1                       |
| <i>Wickerhamomyces patagonicus</i>        | FJ793131 | KY110126 | CBS 11398                   |
| <i>Wickerhamomyces pijperi</i>            | -        | EF550335 | NRRL YB-4309                |
| <i>Wickerhamomyces psychrolipolyticus</i> | -        | LC333101 | YS-2018 202-2/NBRC 113263   |
| <i>Wickerhamomyces queroliae</i>          | -        | EU580140 | UFMG-T05-200.1              |
| <i>Wickerhamomyces rabaulensis</i>        | AY790541 | EF550303 | CBS 6797/NRRL Y-7945        |
| <i>Wickerhamomyces scolytoplatypi</i>     | KY105915 | AB534166 | CBS 12186/NBRC 11029        |
| <i>Wickerhamomyces siamensis</i>          | AB714257 | AB714248 | DMKU RK359                  |
| <i>Wickerhamomyces silvicola</i>          | KY105917 | EF550302 | CBS 1705/NRRL Y-1678        |
| <i>Wickerhamomyces spegazzinii</i>        | KJ832072 | KJ832071 | CBS 12756                   |
| <i>Wickerhamomyces strasburgensis</i>     | KY105920 | EF550333 | CBS 2939/NRRL Y-2383        |
| <i>Wickerhamomyces subpelliculosus</i>    | FJ153221 | EF550340 | NRRL Y-1683                 |
| <i>Wickerhamomyces sydowiorum</i>         | FR670786 | EF550343 | NRRL Y-7130                 |
| <i>Wickerhamomyces sylviae</i>            | -        | KF240728 | PYCC6345                    |
| <i>Wickerhamomyces tratensis</i>          | AB607029 | AB607028 | NBRC 107799                 |
| <i>Wickerhamomyces xylosicus</i>          | AB704715 | AB557867 | NT31                        |
| <i>Wickerhamomyces xylosivorus</i>        | LC278379 | LC202858 | NBRC 111553                 |

---

**Tabela S4.** Posição variável em cada região de rDNA.

|               |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |
|---------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| ITS1 (192 pb) | <b>29</b>  | <b>59</b>  | <b>60</b>  | <b>61</b>  | <b>68</b>  | <b>71</b>  | <b>75</b>  | <b>76</b>  | <b>77</b>  | <b>80</b>  | <b>81</b>  | <b>82</b>  | <b>83</b>  | <b>84</b>  | <b>86</b>  | <b>87</b>  | <b>109</b> |            |
|               |            |            | C          | A          |            |            |            |            |            | A          |            |            |            |            |            |            |            |            |
|               | Y          | W          | (+)        | (+)        | K          | Y          | W          | W          | H          | (+)        | H          | W          | K          | R          | M          | H          | Y          |            |
|               | <b>113</b> | <b>115</b> | <b>116</b> | <b>117</b> | <b>122</b> | <b>128</b> | <b>129</b> | <b>139</b> | <b>157</b> | <b>159</b> | <b>160</b> | <b>161</b> | <b>162</b> | <b>163</b> | <b>177</b> | <b>178</b> | <b>181</b> | <b>192</b> |
|               | W          | Y          | Y          | Y          | R          | H          | H          | R          | R          | Y          | B          | Y          | Y          | W          | W          | A (-)      | W          | A (-)      |
| 5.8S (158 pb) | <b>3</b>   | <b>13</b>  | <b>17</b>  | <b>39</b>  | <b>64</b>  | <b>72</b>  | <b>86</b>  | <b>127</b> | <b>130</b> |            |            |            |            |            |            |            |            |            |
|               | R          | R          | W          | R          | Y          | R          | Y          | Y          | Y          |            |            |            |            |            |            |            |            |            |
| ITS2 (220 pb) | <b>2</b>   | <b>3</b>   | <b>14</b>  | <b>15</b>  | <b>16</b>  | <b>21</b>  | <b>23</b>  | <b>27</b>  | <b>28</b>  | <b>30</b>  | <b>34</b>  | <b>53</b>  | <b>60</b>  | <b>74</b>  | <b>84</b>  | <b>92</b>  | <b>100</b> | <b>111</b> |
|               | Y          | Y          | Y          | S          | Y          | D          | Y          | W          | R          | R          | S          | W          | Y          | Y          | Y          | R          | W          | Y          |
|               | <b>118</b> | <b>144</b> | <b>159</b> | <b>160</b> | <b>161</b> | <b>180</b> | <b>181</b> | <b>183</b> | <b>184</b> | <b>187</b> | <b>189</b> | <b>208</b> | <b>209</b> | <b>210</b> | <b>211</b> | <b>213</b> | <b>214</b> |            |
|               |            |            |            | S          |            | T          | G          |            |            |            |            | A          |            | T (-       |            |            |            |            |
|               | R          | R          | Y          | (+)        | Y          | (+)        | (+)        | S          | Y          | S          | W          | (+)        | Y          | )          | Y          | Y          | H          |            |
| D1 (312 pb)   | <b>39</b>  | <b>73</b>  | <b>75</b>  | <b>79</b>  | <b>85</b>  | <b>101</b> | <b>136</b> | <b>188</b> | <b>210</b> | <b>251</b> | <b>275</b> |            |            |            |            |            |            |            |
|               | R          | Y          | W          | Y          | W          | Y          | Y          | W          | R          | W          | Y          |            |            |            |            |            |            |            |
| D2 (278 pb)   | <b>107</b> | <b>110</b> | <b>176</b> | <b>177</b> | <b>178</b> | <b>179</b> | <b>180</b> | <b>181</b> | <b>183</b> | <b>184</b> | <b>185</b> | <b>186</b> | <b>187</b> | <b>211</b> | <b>223</b> | <b>225</b> |            |            |
|               | K          | R          | S          | K          | B          | N          | Y          | Y          | G (+)      | S          | W          | S          | R          | R          | R          | Y          |            |            |

<sup>†</sup> (-) Deleção em relação ao isolado B620, (+) Inserção em relação ao isolado B620, (A) Adenosina, (C) Citidina, (G) Guanina, (T) Timidina, (B) exceto A (C ou G ou T), (D) exceto C (A ou G ou T), (H) exceto G (A ou C ou T), (K) Keto (G ou T), (M) Amino (A ou C), (N) qualquer nucleotídeo (A ou C ou G ou T ou U), (R) Purina (A ou G), (S) G ou C, (W) A ou T, (Y) Pirimidina (T ou C).

<sup>2</sup> Algumas regiões apresentam muitas posições variáveis em relação ao isolado B620, sendo: ITS1 (59-87 e 157-178), ITS2 (159-187 e 208-214), LSU-D1 (73-85), LSU- D2 (176-187).

<sup>3</sup> Nos alinhamentos originais completos, as posições variáveis correspondem a 509-537 e 558-564 para ITS2 e 489-500 para LSU-D2.

**Tabela S5.** Análise estatística de permutação para recombinação (1000 permutações).

| Partição | Análise de permutação (valor de P)                      |
|----------|---------------------------------------------------------|
| ITS1     | NSS (0.00e+00), Max $\chi^2$ (8.10e-02), PHI (1.20e-02) |
| ITS2     | NSS (1.00e-03), Max $\chi^2$ (3.00e-03), PHI (3.18e-01) |
| D1/D2    | NSS (1.70e-02), Max $\chi^2$ (1.00e-02), PHI (1.10e-02) |

**Tabela S6.** Sítios com homoplasia ao longo do alinhamento de diferentes regiões de rDNA.

| Região | Nucleotídeo | <i>Consistency Index</i> <sup>1</sup> | Valores ACGT | Mudanças na árvore |
|--------|-------------|---------------------------------------|--------------|--------------------|
| ITS1   | 75          | 0,33                                  | 11:0:0:15    | 3                  |
|        | 76          | 0,5                                   | 3:0:0:23     | 2                  |
|        | 77          | 0,5                                   | 15:1:0:10    | 4                  |
|        | 129         | 0,5                                   | 0:5:0:21     | 2                  |
|        | 157         | 0,5                                   | 20:0:6:0     | 2                  |
|        | 159         | 0,5                                   | 0:14:0:12    | 2                  |
|        | 161         | 0,33                                  | 0:13:0:13    | 3                  |
|        | 162         | 0,5                                   | 0:14:0:12    | 2                  |
| ITS2   | 2           | 0,5                                   | 0:8:0:18     | 2                  |
|        | 15          | 0,5                                   | 0:11:15:0    | 2                  |
|        | 30          | 0,33                                  | 5:0:21:0     | 3                  |
|        | 159         | 0,5                                   | 0:22:0:4     | 2                  |
|        | 187         | 0,5                                   | 0:14:12:0    | 2                  |
|        | 209         | 0,33                                  | 0:18:0:7     | 3                  |
|        | 211         | 0,33                                  | 0:22:0:4     | 3                  |
| LSU    | 73          | 0,5                                   | 0:4:0:7      | 2                  |
|        | 79          | 0,5                                   | 0:5:0:6      | 2                  |
|        | 136         | 0,5                                   | 0:2:0:9      | 2                  |

<sup>1</sup> Somente valores de *Consistency Index* menores que 0,6 são apresentados.

**Tabela S7.** Similaridade de estrutura entre os clones.

| <b>Região</b> | <b>Estrutura</b> | <b>Clone</b>                        |
|---------------|------------------|-------------------------------------|
| LSU           | Tipo 1           | EC1-26, EC3-5, EC3-8, EC3-16        |
|               | Tipo 2           | EC1-28, EC1-35, EC3-9, EC3-12       |
|               | Tipo 3           | EC1-32                              |
|               | Tipo 4           | EC3-7                               |
| ITS           | Tipo 1           | EC2-1, EC2-2                        |
|               | Tipo 2           | EC2-3, EC2-5, EC2-20                |
|               | Tipo 3           | EC2-4, EC2-7, EC2-8, EC2-15, EC2-16 |
|               | Tipo 4           | EC2-6, EC3-25                       |
|               | Tipo 5           | EC2-10                              |
|               | Tipo 6           | EC2-17                              |
|               | Tipo 7           | EC2-18, EC2-31, EC2-38              |
|               | Tipo 8           | EC2-24                              |
|               | Tipo 9           | EC2-28                              |
|               | Tipo 10          | EC2-29                              |
|               | Tipo 11          | EC2-32, EC3-21                      |
|               | Tipo 12          | EC2-33                              |
|               | Tipo 13          | EC3-22                              |
|               | Tipo 14          | EC3-23                              |



**Tabela S8.** Relação dos clones por clado e estrutura.

| Clones | Região | Clado |      | Estrutura |
|--------|--------|-------|------|-----------|
| EC1-26 | LSU    | III   |      | Tipo 1    |
| EC3-5  | LSU    | II    |      | Tipo 1    |
| EC3-8  | LSU    | III   |      | Tipo 1    |
| EC3-16 | LSU    | II    |      | Tipo 1    |
| EC1-28 | LSU    | I     |      | Tipo 2    |
| EC1-35 | LSU    | III   |      | Tipo 2    |
| EC3-9  | LSU    | I     |      | Tipo 2    |
| EC3-12 | LSU    | III   |      | Tipo 2    |
| EC1-32 | LSU    | III   |      | Tipo 3    |
| EC3-7  | LSU    | II    |      | Tipo 4    |
|        |        | ITS1  | ITS2 | Estrutura |
| EC2-1  | ITS    | I     | II   | Tipo 1    |
| EC2-2  | ITS    | I     | II   | Tipo 1    |
| EC2-28 | ITS    | -     | I    | Tipo 9    |
| EC2-29 | ITS    | IV    | I    | Tipo 10   |
| EC2-32 | ITS    | IV    | I    | Tipo 11   |
| EC3-21 | ITS    | IV    | I    | Tipo 11   |
| EC2-31 | ITS    | V     | III  | Tipo 7    |
| EC2-38 | ITS    | V     | III  | Tipo 7    |
| EC2-33 | ITS    | V     | -    | Tipo 12   |
| EC3-22 | ITS    | III   | IV   | Tipo 13   |
| EC3-23 | ITS    | -     | IV   | Tipo 14   |
| EC2-3  | ITS    | II    | IV   | Tipo 2    |
| EC2-4  | ITS    | -     | V    | Tipo 3    |
| EC2-10 | ITS    | II    | IV   | Tipo 5    |
| EC2-20 | ITS    | II    | IV   | Tipo 2    |
| EC2-5  | ITS    | II    | IV   | Tipo 2    |
| EC2-6  | ITS    | III   | -    | Tipo 4    |
| EC3-25 | ITS    | III   | -    | Tipo 4    |
| EC2-15 | ITS    | -     | V    | Tipo 3    |
| EC2-16 | ITS    | I     | V    | Tipo 3    |
| EC2-7  | ITS    | I     | V    | Tipo 3    |
| EC2-8  | ITS    | I     | V    | Tipo 3    |
| EC2-17 | ITS    | V     | I    | Tipo 6    |
| EC2-18 | ITS    | V     | III  | Tipo 7    |
| EC2-24 | ITS    | I     | V    | Tipo 8    |

## REFERÊNCIAS

- Abranches, J., Mendonça-Hagler, L. C., Hagler, A. N., Morais, P. B., Rosa, C. A. (1997). The incidence of killer activity and extracellular proteases in tropical yeast communities. **Canadian Journal of Microbiology**, 43(4), 328-336.
- Adams, A. S., Six, D. L., Adams, S. M., Holben, W. E. (2008). In vitro interactions between yeasts and bacteria and the fungal symbionts of the mountain pine beetle (*Dendroctonus ponderosae*). **Microbial ecology**, 56, 460-466.
- Allen, A., Islamovic, E., Kaur, J., Gold, S., Shah, D., Smith, T. J. (2011). Transgenic maize plants expressing the Totivirus antifungal protein, KP4, are highly resistant to corn smut. **Plant biotechnology journal**, 9(8), 857-864.
- Almeida, N. C. O. da S., Furtado, S. da C., Barcellos, J. F. M. (2021). A Narrative Review of *Libidibia ferrea*: Botanical Aspects, Ethnopharmacological Properties, Phytochemical Characteristics, Toxicity, and Experimental Tests. **European Journal of Medicinal Plants**, 32(12), 16-30.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, 215(3), 403-410.
- Amos, B. A., Hayes, R. A., Leemon, D. M., Furlong, M. J. (2019). Small hive beetle (Coleoptera: Nitidulidae) and the yeast, *Kodamaea ohmeri*: a facultative relationship under laboratory conditions. **Journal of Economic Entomology**, 112(2), 515-524.
- Ananthakrishnan, T. N. (1997). Gallic and salicylic acids: sentinels of plant defence against insects. **Current Science**, 73(7), 576-579.
- Angelis C de, Serzedello A and De Angelis DF (1983). Yeasts found in gardens of *Atta sexdens rubropilosa* and *Atta laevigata*. **Naturalia**, 8, 149–151.
- Arcuri, S. L., Pagnocca, F. C., da Paixão Melo, W. G., Nagamoto, N. S., Komura, D. L., Rodrigues, A. (2014). Yeasts found on an ephemeral reproductive caste of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 106(3), 475–487.
- Arrey, G., Li, G., Murphy, R., Guimaraes, L., Alizadeh, S., Poulsen, M., Regenber, B. (2021). Isolation, characterization, and genome assembly of *Barnettozyma botsteinii* sp. nov. and novel strains of *Kurtzmaniella quercitrusa* isolated from the intestinal tract of the termite *Macrotermes bellicosus*. **G3**, 11(12), jkab342.
- Asplund, J., Wardle, D. A. (2017). How lichens impact on terrestrial community and ecosystem properties. **Biological Reviews**, 92(3), 1720-1738.
- Baig, F., Farnier, K., Piper, A. M., Speight, R., Cunningham, J. P. (2020). Yeasts influence host selection and larval fitness in two frugivorous *Carpophilus* beetle species. **Journal of chemical ecology**, 46, 675-687.
- Bankevich, A., et al. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. **Journal of computational biology**, 19(5), 455-477.

- Bariani, A., Gonçalves, J. F. D. C., Chevreuil, L. R., Cavallazzi, J. R. P., Souza, L. A. G. D., Bentes, J. L. D. S., Pando, S. C. (2012). Purificação parcial de inibidores de tripsina de sementes de *Caesalpinia ferrea* e *Swartzia polyphylla* e o efeito dos extratos protéicos sobre fungos fitopatogênicos. **Summa Phytopathologica**, 38, 131-138.
- Becher, P. G., et al. (2012). Yeast, not fruit volatiles mediate *Drosophila melanogaster* attraction, oviposition and development. **Functional Ecology**, 26(4), 822-828.
- Bellutti, N., Gallmetzer, A., Innerebner, G., Schmidt, S., Zelger, R., Koschier, E. H. (2018). Dietary yeast affects preference and performance in *Drosophila suzukii*. **Journal of pest science**, 91, 651-660.
- Benda, N. D., Boucias, D., Torto, B., Teal, P. (2008). Detection and characterization of *Kodamaea ohmeri* associated with small hive beetle *Aethina tumida* infesting honey bee hives. **Journal of Apicultural Research**, 47(3), 194-201.
- Bengtsson-Palme, J., et al. (2013). Improved software detection and extraction of ITS1 and ITS 2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data. **Methods in Ecology and Evolution**, 4(10), 914-919.
- Bevan, E. A., Herring, A. J., Mitchell, D. J. (1973). Preliminary characterization of two species of dsRNA in yeast and their relationship to the “killer” character. **Nature**, 245(5420), 81-86.
- Bevan, E. A., Makower, M. (1963). The inheritance of a killer character in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). In: **Proceedings of the International Congress of Genetics XI**. Oxford: Pergamon Press, 1963. p. 202-203.
- Bever, J. D. (2002). Negative feedback within a mutualism: host-specific growth of mycorrhizal fungi reduces plant benefit. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, 269(1509), 2595-2601.
- Bizarria Jr, R., de Castro Pietrobon, T., Ferreira, H., Rodrigues, A. (2023b). Polymorphisms of rDNA genes in *Cyberlindnera* yeast suggest birth and death evolution events. **FEMS Yeast Research**, foad032.
- Bizarria Jr, R., de Castro Pietrobon, T., Rodrigues, A. (2023a). Uncovering the Yeast Communities in Fungus-Growing Ant Colonies. **Microbial Ecology**, 86(1), 624-635.
- Bizarria Jr, R., Pagnocca, F. C., Rodrigues, A. (2022). Yeasts in the attine ant–fungus mutualism: Diversity, functional roles, and putative biotechnological applications. **Yeast**, 39(1-2), 25-39.
- Blackman, M. W. (1942). New species of bark beetles (Pityophthorini) from Mexico and tropical America (Coleoptera, Scolytidae). **Proceedings of the United States National Museum**.
- Blanton, C. M., Ewel, J. J. (1985). Leaf-cutting ant herbivory in successional and agricultural tropical ecosystems. **Ecology**, 66(3), 861–869.
- Bohner, F., Papp, C., Gácsér, A. (2022). The effect of antifungal resistance development on the virulence of *Candida* species. **FEMS Yeast Research**, 22(1), foac019.

- Bongomin, F., Gago, S., Oladele, R. O., Denning, D. W. (2017). Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision. **Journal of fungi**, 3(4), 57.
- Boucher, D. H., James, S., Keeler, K. H. (1982). The ecology of mutualism. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 13(1), 315-347.
- Boynton, P. J. (2019). The ecology of killer yeasts: Interference competition in natural habitats. **Yeast**, 36(8), 473–485.
- Branstetter, M. G., Ješovnik, A., Sosa-Calvo, J., Lloyd, M. W., Faircloth, B. C., Brady, S. G., and Schultz, T. R. (2017). Dry habitats were crucibles of domestication in the evolution of agriculture in ants. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, 284(1852), 20170095.
- Breinig, F., Sendzik, T., Eisfeld, K., Schmitt, M. J. (2006). Dissecting toxin immunity in virus-infected killer yeast uncovers an intrinsic strategy of self-protection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 103(10), 3810-3815.
- Breinig, F., Tipper, D. J., Schmitt, M. J. (2002). Kre1p, the plasma membrane receptor for the yeast K1 viral toxin. **Cell**, 108(3), 395-405.
- Briones-Roblero, C. I., Rodríguez-Díaz, R., Santiago-Cruz, J. A., Zúñiga, G., Rivera-Orduña, F. N. (2017). Degradation capacities of bacteria and yeasts isolated from the gut of *Dendroctonus rhizophagus* (Curculionidae: Scolytinae). **Folia microbiologica**, 62, 1-9.
- Bruen, T., Bruen, T. (2005). **PhiPack: PHI test and other tests of recombination**. McGill University, Montreal, Quebec.
- Brûna, T., Hoff, K. J., Lomsadze, A., Stanke, M., Borodovsky, M. (2021). BRAKER2: automatic eukaryotic genome annotation with GeneMark-EP+ and AUGUSTUS supported by a protein database. **NAR genomics and bioinformatics**, 3(1), lqaa108.
- Brysch-Herzberg, M. (2004). Ecology of yeasts in plant–bumblebee mutualism in Central Europe. **FEMS microbiology ecology**, 50(2), 87–100.
- Buser, C. C., Jokela, J., Martin, O. Y. (2021). Scent of a killer: How could killer yeast boost its dispersal?. **Ecology and Evolution**, 11(11), 5809-5814.
- Buser, C. C., Newcomb, R. D., Gaskett, A. C., Goddard, M. R. (2014). Niche construction initiates the evolution of mutualistic interactions. **Ecology Letters**, 17(10), 1257-1264.
- Bussey, H., Vernet, T., Sdicu, A. M. (1988). Mutual antagonism among killer yeasts: Competition between K1 and K2 killers and a novel cDNA-based K1-K2 killer strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Canadian journal of microbiology**, 34(1), 38-44.
- Buzzini, P., Lachance, M. A., Yurkov, A. (2017). **Yeasts in natural ecosystems: diversity**. Basel, Switzerland: Springer International Publishing, pp. 499.
- Cappelli, A., Ulissi, U., Valzano, M., Damiani, C., Epis, S., Gabrielli, M. G., Conti, S., Polonelli, L., Bandi, C., Favia, G., and Ricci, I. (2014). A *Wickerhamomyces anomalus* killer strain in the malaria vector *Anopheles stephensi*. **PloS One**, 9(5), e95988.

- Cappelli, A., Valzano, M., Cecarini, V., Bozic, J., Rossi, P., Mensah, P., Amantini, C., Favia, G., Ricci, I. (2019). Killer yeasts exert anti-plasmodial activities against the malaria parasite *Plasmodium berghei* in the vector mosquito *Anopheles stephensi* and in mice. **Parasites and Vectors**, 12(1), 1–8.
- Carranza, S., Giribet, G., Ribera, C., Riutort, M. (1996). Evidence that two types of 18S rDNA coexist in the genome of *Dugesia* (Schmidtea) *mediterranea* (Platyhelminthes, Turbellaria, Tricladida). **Molecular Biology and Evolution**, 13(6), 824–832.
- Carreiro, S. C. (2000). **Pesquisa de fator killer e análise da degradação de polissacarídeos vegetais por leveduras associadas aos ninhos de *Atta sexdens***. PhD thesis, UNESP, Rio Claro, São Paulo, Brasil.
- Carreiro, S. C., Pagnocca, F. C., Bacci, M., Bueno, O. C., Hebling, M. J. A., Middelhoven, W. J. (2002). Occurrence of killer yeasts in leaf-cutting ant nests. **Folia Microbiologica**, 47(3), 259–262.
- Carreiro, S. C., Pagnocca, F. C., Bueno, O. C., Júnior, M. B., Hebling, M. J. A., and da Silva, O. A. (1997). Yeasts associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908. **Antonie van Leeuwenhoek**, 71(3), 243–248.
- Carvalho, P. E. R. (2008). **Espécies arbóreas brasileiras**. Embrapa Florestas.
- Case, T. J., Gilpin, M. E. (1974). Interference competition and niche theory. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 71(8), 3073–3077.
- Castillo, A., Cifuentes, V. (1994). Presence of double-stranded RNA and virus-like particles in *Phaffia rhodozyma*. **Current genetics**, 26, 364–368.
- Chakraborty, A., et al. (2022). Yeast and fruit fly mutual niche construction and antagonism against mould. **Functional Ecology**, 36(7), 1639–1654.
- Chand Dakal, T., Giudici, P., Solieri, L. (2016). Contrasting patterns of rDNA homogenization within the *Zygosaccharomyces rouxii* species complex. **PloS One**, 11(8), e0160744.
- Chang, S. L., Leu, J. Y., Chang, T. H. (2015). A population study of killer viruses reveals different evolutionary histories of two closely related *Saccharomyces* sensu stricto yeasts. **Molecular Ecology**, 24(16), 4312–4322.
- Chao, A., Gotelli, N. J., Hsieh, T. C., Sande, E. L., Ma, K. H., Colwell, R. K., Ellison, A. M. (2014). “Rarefaction and extrapolation with Hill numbers: a framework for sampling and estimation in species diversity studies.” **Ecological Monographs**, 84, 45–67.
- Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., Gu, J. (2018). fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. **Bioinformatics**, 34(17), i884–i890.
- Cho, H., Rohlf, M. (2023). Transmission of beneficial yeasts accompanies offspring production in *Drosophila*—An initial evolutionary stage of insect maternal care through manipulation of microbial load?. **Ecology and Evolution**, 13(6), e10184.
- Chomicki, G., Weber, M., Antonelli, A., Bascompte, J., Kiers, E. T. (2019). The impact of mutualisms on species richness. **Trends in Ecology & Evolution**, 34(8), 698–711.

- Coelho, A. R., Tachi, M., Pagnocca, F. C., Nobrega, G. M. A., Hoffmann, F. L., Harada, K. I., Hirooka, E. Y. (2009). Purification of *Candida guilliermondii* and *Pichia ohmeri* killer toxin as an active agent against *Penicillium expansum*. **Food Additives and Contaminants**, 26(1), 73-81.
- Coluccio, A. E., Rodriguez, R. K., Kernan, M. J., Neiman, A. M. (2008). The yeast spore wall enables spores to survive passage through the digestive tract of *Drosophila*. **PLoS One**, 3(8), e2873.
- Comandolli-Wyrepkowski, C. D., et al. (2017). Antileishmanial activity of extracts from *Libidibia ferrea*: development of in vitro and in vivo tests. **Acta Amazonica**, 47, 331-340.
- Corrêa, M. M., Silva, P. S., Wirth, R., Tabarelli, M., Leal, I. R. (2010). How leaf-cutting ants impact forests: drastic nest effects on light environment and plant assemblages. **Oecologia**, 162, 103-115.
- Costa Lima, A. (1929). Sobre dois scolytideos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 22, p. 109-112.
- Costa Lima, A.M. (1956). **Insetos do Brasil: Coleópteros**. Escola Nacional de Agronomia, v. 10.
- Crabtree, A. M., Kizer, E. A., Hunter, S. S., Van Leuven, J. T., New, D. D., Fagnan, M. W., Rowley, P. A. (2019). A rapid method for sequencing double-stranded RNAs purified from yeasts and the identification of a potent K1 killer toxin isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. **Viruses**, 11(1), 70.
- Craven, S. E., Dix, M. W., Michaels, G. E. (1970). Attine fungus gardens contain yeasts. **Science**, 169(3941), 184–186.
- Crispell, J., Balaz, D., Gordon, S. V. (2019). HomoplasyFinder: a simple tool to identify homoplasies on a phylogeny. **Microbial genomics**, 5(1), e000245.
- Cristiano, M. P., Cardoso, D. C., Sandoval-Gómez, V. E., Simões-Gomes, F. C. (2020). *Amoimyrmex Cristiano*, Cardoso and Sandoval, gen. nov. (Hymenoptera: Formicidae): a new genus of leaf-cutting ants revealed by multilocus molecular phylogenetic and morphological analyses. **Austral Entomology**, 59(4), 643–676.
- da Costa Neto, D. J., de Morais, P. B. (2020). The vectoring of *Starmerella* species and other yeasts by stingless bees in a Neotropical savanna. **Fungal Ecology**, 47, 100973.
- Dammann, R., Lucchini, R., Koller, T., Sogo, J. M. (1993). Chromatin structures and transcription of rDNA in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic Acids Research**, 21(10), 2331-2338.
- Davis, T. S., Hofstetter, R. W., Foster, J. T., Foote, N. E., Keim, P. (2011). Interactions between the yeast *Ogataea pini* and filamentous fungi associated with the western pine beetle. **Microbial ecology**, 61, 626-634.
- Davis, T. S., Stewart, J. E., Clark, C., Van Buiten, C. (2022). Nutritional profile and effects on fungal growth of yeast symbionts associated with North American spruce beetle (*Dendroctonus rufipennis*).

- de Carvalho Maria, T. R. B., Bomm, B. F. H., Nesi, J., Ho, T. L., Bobrowski, R. (2020). Canopy architecture and morphometry of tree species used in the urban forest. **Floresta**, 50(4), 1892-1901.
- de Fine Licht, H. H., Boomsma, J. J. (2010). Forage collection, substrate preparation, and diet composition in fungus-growing ants. **Ecological Entomology**, 35(3), 259–269.
- de Moraes, G. J., Berti Filho, E. (1974). **Coleobrocas que ocorrem em essências florestais**.
- de Mendiburu, F. (2021). **agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research**. R package version 1.3-6. Available online: <https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>.
- Dohet, L., Gregoire, J. C., Berasategui, A., Kaltenpoth, M., Biedermann, P. H. (2016). Bacterial and fungal symbionts of parasitic *Dendroctonus* bark beetles. **FEMS Microbiology Ecology**, 92(9), fiw129.
- Dowd, P. F., Shen, S. K. (1990). The contribution of symbiotic yeast to toxin resistance of the cigarette beetle (*Lasioderma serricorne*). **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 56(3), 241-248.
- Dowd, P. F., Shen, S. K. (1990). The contribution of symbiotic yeast to toxin resistance of the cigarette beetle (*Lasioderma serricorne*). **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 56(3), 241-248.
- Dusa, A. (2021). venn: Draw Venn Diagrams. R package version 1.10. <https://CRAN.R-project.org/package=venn>
- Farji-brener, A. G., Werenkraut, V. (2015). A meta-analysis of leaf-cutting ant nest effects on soil fertility and plant performance. **Ecological Entomology**, 40(2), 150-158.
- Fernando, W. D., Ramarathnam, R., Krishnamoorthy, A. S., Savchuk, S. C. (2005). Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. **Soil Biology and Biochemistry**, 37(5), 955-964.
- Ferreira, M. R., Fernandes, M. T., da Silva, W. A., Bezerra, I. C., de Souza, T. P., Pimentel, M. F., Soares, L. A. (2016). Chromatographic and spectrophotometric analysis of phenolic compounds from fruits of *Libidibia ferrea* Martius. **Pharmacognosy Magazine**, 12(Suppl 2), S285.
- Fisher, M. C., et al. (2022). Tackling the emerging threat of antifungal resistance to human health. **Nature reviews microbiology**, 20(9), 557-571.
- Fisher, P. J., Stradling, D. J., Sutton, B. C., Petrini, L. E. (1996). Microfungi in the fungus gardens of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*: a preliminary study. **Mycological Research**, 100(5), 541–546.
- Fowell, R. R. (1952). Sodium acetate agar as a sporulation medium for yeast. **Nature**, 170(4327), 578-578.
- Fredericks, L. R., et al. (2021a). The species-specific acquisition and diversification of a K1-like family of killer toxins in budding yeasts of the *Saccharomycotina*. **PLoS genetics**, 17(2), e1009341.

- Fredericks, L. R., et al. (2021b). Vaginal isolates of *Candida glabrata* are uniquely susceptible to ionophoric killer toxins produced by *Saccharomyces cerevisiae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 65(7), 10-1128.
- French, S. L., Osheim, Y. N., Cioci, F., Nomura, M., Beyer, A. L. (2003). In exponentially growing *Saccharomyces cerevisiae* cells, rRNA synthesis is determined by the summed RNA polymerase I loading rate rather than by the number of active genes. **Molecular and Cellular Biology**, 23(5), 1558-1568.
- Fuentefria, A. M., Faganello, J., Pazzini, F., Schrank, A., Valente, P., Vainstein, M. (2007). Typing and patterns of cellular morphological alterations in *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates exposed to a panel of killer yeasts. **Medical mycology**, 45(6), 503-512.
- Fuentefria, A. M., Franskoviaki, I. M., Mercado, L. W., Ramos, J. P., Vainstein, M. H., Valente, P. (2006). Inhibition of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates by two Brazilian killer yeasts. **Journal of basic microbiology**, 46(2), 87-93.
- Fuentefria, A. M., Perez, L. R., Alves d'Azevedo, P., Pazzini, F., Schrank, A., Vainstein, M. H., Valente, P. (2008). Typing of *Staphylococcus epidermidis* clinical strains by a selected panel of Brazilian killer yeasts. **Journal of basic microbiology**, 48(1), 25-30.
- Ganley, A. R., Kobayashi, T. (2007). Highly efficient concerted evolution in the ribosomal DNA repeats: total rDNA repeat variation revealed by whole-genome shotgun sequence data. **Genome Research**, 17(2), 184-191.
- Ganter, P. F. (1988). The vectoring of cactophilic yeasts by *Drosophila*. **Oecologia**, 75(3), 400–404.
- Ganter, P. F., Starmer, W. T. (1992). Killer Factor as a Mechanism of Interference Competition in Yeasts Associated with Cacti: Ecological Archives. **Ecology**, 73(1), 54-67.
- Glass, N. L., Donaldson, G. C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied and environmental microbiology**, 61(4), 1323-1330.
- Golubev, V. I. (2015). Action spectrum of *Wickerhamomyces ciferrii* mycocin. **Biotechnology in Russia**, (1), 15-21.
- Golubev, W. I. (1998). Mycocins (killer toxins). In **The Yeasts** (pp. 55-62). Elsevier.
- Golubev, W. I. (2006). Antagonistic interactions among yeasts. **Biodiversity and ecophysiology of yeasts** (pp. 197-219). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Golubev, W. I., Pfeiffer, I., Golubeva, E. (2002). Mycocin production in *Trichosporon pullulans* populations colonizing tree exudates in the spring. **FEMS microbiology ecology**, 40(2), 151-157.
- Gordon, J. L., Wolfe, K. H. (2008). Recent allopolyploid origin of *Zygosaccharomyces rouxii* strain ATCC 42981. **Yeast**, 25(6), 449-456.



- Goto, K., Iwatuki, Y., Kitano, K., Obata, T., Hara, S. (1990). Cloning and nucleotide sequence of the KHR killer gene of *Saccharomyces cerevisiae*. **Agricultural and biological chemistry**, 54(4), 979-984.
- Greig, D., Travisano, M. (2008). Density-dependent effects on allelopathic interactions in yeast. **Evolution**, 62(3), 521-527.
- Guamán-Burneo, M. C., et al. (2015). Xylitol production by yeasts isolated from rotting wood in the Galápagos Islands, Ecuador, and description of *Cyberlindnera galapagoensis* fa, sp. nov. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 108, 919-931.
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., Tesler, G. (2013). QAST: quality assessment tool for genome assemblies. **Bioinformatics**, 29(8), 1072-1075.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids. Symposium Series** 41:95-98.
- Hershkovitz, M. A., Zimmer, E. A. (1996). Conservation patterns in angiosperm rDNA ITS2 sequences. **Nucleic acids research**, 24(15), 2857-2867.
- Hilber-Bodmer, M., Schmid, M., Ahrens, C. H., Freimoser, F. M. (2017). Competition assays and physiological experiments of soil and phyllosphere yeasts identify *Candida subhashii* as a novel antagonist of filamentous fungi. **BMC microbiology**, 17, 1-15.
- Hillis, D. M., Dixon, M. T. (1991). Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **The Quarterly Review of Biology**, 66(4), 411-453.
- Hillis, D. M., Moritz, C., Porter, C. A., Baker, R. J. (1991). Evidence for biased gene conversion in concerted evolution of ribosomal DNA. **Science**, 251(4991), 308-310.
- Howe, H. F. (1984). Constraints on the evolution of mutualisms. **The American Naturalist**, 123(6), 764-777.
- Hsieh, T. C, Ma, K. H, Chao, A. (2020). iNEXT: Interpolation and Extrapolation for Species Diversity. **R package version 2.0.20**, [http://chao.stat.nthu.edu.tw/wordpress/software\\_download/](http://chao.stat.nthu.edu.tw/wordpress/software_download/).
- Hua, M. X., Chi, Z., Liu, G. L., Buzdar, M. A., Chi, Z. M. (2010). Production of a novel and cold-active killer toxin by *Mrakia frigida* 2E00797 isolated from sea sediment in Antarctica. **Extremophiles**, 14, 515-521.
- Hunt, D. W. A., Borden, J. H. (1990). Conversion of verbenols to verbenone by yeasts isolated from *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Scolytidae). **Journal of Chemical Ecology**, 16(4), 1385-1397.
- Huson, D. H., Bryant, D. (2006). Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. **Molecular Biology and Evolution**, 23(2), 254-267.
- Isaeva, O. V., Glushakova, A. M., Yurkov, A. M., Chernov, I. Y. (2009). The yeast *Candida railenensis* in the fruits of English oak (*Quercus robur* L.). **Microbiology**, 78(3), 355–359.

- Ivannikova, Y. V., Naumova, E. S., Naumov, G. I. (2006). Detection of viral dsRNA in the yeast *Saccharomyces bayanus*. **Doklady Biological Sciences** (Vol. 406, pp. 100-102). New York: Consultants Bureau, c1965-1992.
- Ivannikova, Y. V., Naumova, E. S., Naumov, G. I. (2007). Viral dsRNA in the wine yeast *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*. **Research in microbiology**, 158(8-9), 638-643.
- Jumper, J., et al. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, 596(7873), 583-589.
- Kabir, M. E., Karim, N., Krishnaswamy, S., Selvakumar, D., Miyamoto, M., Furuichi, Y., Komiyama, T. (2011). Peptide derived from anti-idiotypic single-chain antibody is a potent antifungal agent compared to its parent fungicide HM-1 killer toxin peptide. **Applied microbiology and biotechnology**, 92, 1151-1160.
- Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K., Von Haeseler, A., and Jermini, L. S. (2017). ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. **Nature methods**, 14(6), 587–589. DOI: 10.1038/nmeth.4285.
- Kast, A., Klassen, R., Meinhardt, F. (2014). rRNA fragmentation induced by a yeast killer toxin. **Molecular Microbiology**, 91(3), 606-617.
- Katoh, K., Rozewicki, J., Yamada, K. D. (2019). MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in Bioinformatics**, 20(4), 1160-1166.
- Keeler, K. H. (1981). A model of selection for facultative nonsymbiotic mutualism. **The American Naturalist**, 118(4), 488-498.
- Kindt, R., Coe, R. (2005). Tree diversity analysis. A manual and software for common statistical methods for ecological and biodiversity studies. **World Agroforestry Centre (ICRAF)**, Nairobi (Kenya). ISBN 92-9059-179-X, <http://www.worldagroforestry.org/output/tree-diversity-analysis>.
- Klassen, R., Meinhardt, F. (2007). Linear protein-primed replicating plasmids in eukaryotic microbes. **Microbial Linear Plasmids** (pp. 187-226). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Klassen, R., Schaffrath, R., Buzzini, P., Ganter, P. F. (2017). Antagonistic interactions and killer yeasts. **Yeasts in natural ecosystems: ecology**, 229-275.
- Klassen, R., Teichert, S., Meinhardt, F. (2004). Novel yeast killer toxins provoke S-phase arrest and DNA damage checkpoint activation. **Molecular microbiology**, 53(1), 263-273.
- Koerte, S., Keesey, I. W., Easson, M. L., Gershenzon, J., Hansson, B. S., Knaden, M. (2020). Variable dependency on associated yeast communities influences host range in *Drosophila species*. **Oikos**, 129(7), 964-982.
- Koltin, Y., Day, P. R. (1976). Suppression of the killer phenotype in *Ustilago maydis*. **Genetics**, 82(4), 629-637.

- Kozlov, A. M., Darriba, D., Flouri, T., Morel, B., Stamatakis, A. (2019). RAxML-NG: a fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. **Bioinformatics**, 35(21), 4453–4455.
- Krassowski, T., et al. (2018). Evolutionary instability of CUG-Leu in the genetic code of budding yeasts. **Nature communications**, 9(1), 1887.
- Kriventseva, E. V., Kuznetsov, D., Tegenfeldt, F., Manni, M., Dias, R., Simão, F. A., Zdobnov, E. M. (2019). OrthoDB v10: sampling the diversity of animal, plant, fungal, protist, bacterial and viral genomes for evolutionary and functional annotations of orthologs. **Nucleic acids research**, 47(D1), D807-D811.
- Kunishima, N., Kashiwagi, T., Suzuki, C., Nikkuni, S., Tsuchiya, F., Arata, Y., Morikawa, K. (1997). Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of a novel killer toxin from a halotolerant yeast *Pichia farinosa*. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, 53(1), 112-113.
- Kurtzman, C. P. (2008). Cletus P. Kurtzman, Jack W. Fell, Teun Boekhout. **The Yeasts** (Fifth Edition), Elsevier, 2011, Chapter 42, p. 521-543.
- Kurtzman, C. P. (2011a). *Lindnera* Kurtzman, Robnett Basehoar-Powers (2008). **The Yeasts** (pp. 521-543). Elsevier.
- Kurtzman, C. P. (2011b). *Wickerhamomyces* Kurtzman, Robnett Basehoar-Powers (2008). **The Yeasts** (pp. 899-917). Elsevier.
- Kurtzman, C. P., Robnett, C. J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**, 73(4), 331–371.
- Kurtzman, C. P., Robnett, C. J. (2003). Phylogenetic relationships among yeasts of the ‘*Saccharomyces* complex’ determined from multigene sequence analyses. **FEMS yeast research**, 3(4), 417-432.
- Lacerda, L. T., Gusmão, L. F., Rodrigues, A. (2018). Diversity of endophytic fungi in *Eucalyptus microcorys* assessed by complementary isolation methods. **Mycological Progress**, 17, 719–727.
- Lachance, M. A., Daniel, H. M., Meyer, W., Prasad, G. S., Gautam, S. P., Boundy-Mills, K. (2003). The D1/D2 domain of the large-subunit rDNA of the yeast species *Clavispora lusitaniae* is unusually polymorphic. **FEMS yeast research**, 4(3), 253-258.
- Lachance, M. A., Rosa, C. A., Starmer, W. T., Schlag-Edler, B. I. R. G. I. T., Barker, J. S. F., Bowles, J. M. (1998). *Wickerhamiella australiensis*, *Wickerhamiella cacticola*, *Wickerhamiella occidentalis*, *Candida drosophilae* and *Candida lipophila*, five new related yeast species from flowers and associated insects. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 48(4), 1431–1443.
- Lachance, M. A., Starmer, W. T., Rosa, C. A., Bowles, J. M., Barker, J. S. F., Janzen, D. H. (2001). Biogeography of the yeasts of ephemeral flowers and their insects. **FEMS yeast research**, 1(1), 1–8.

- Laetsch, D. R., Blaxter, M. L. (2017). BlobTools: Interrogation of genome assemblies. **F1000Research**, 6(1287), 1287.
- Leal, I. R., Oliveira, P. S. (1998). Interactions between Fungus-Growing Ants (Attini), Fruits and Seeds in Cerrado Vegetation in Southeast Brasil 1. **Biotropica**, 30(2), 170-178.
- Leal, I. R., Wirth, R., Tabarelli, M. (2014). The multiple impacts of leaf-cutting ants and their novel ecological role in human-modified neotropical forests. **Biotropica**, 46(5), 516-528.
- Leal-Dutra, C. A., Griffith, G. W., Neves, M. A., McLaughlin, D. J., McLaughlin, E. G., Clasen, L. A., Dentinger, B. (2020). Reclassification of *Pterulaceae* Corner (Basidiomycota: Agaricales) introducing the ant-associated genus *Myrmecopterula* gen. nov., *Phaeopterula* Henn. and the corticioid *Radulomycetaceae* fam. nov. **IMA fungus**, 11(1), 1-24.
- Lee, Y. M., Lee, H., Heo, Y. M., Hong, J. H., Jang, S., Kang, K. Y., Kim, J. J. (2017). Phylogenetic analysis of wood-inhabiting molds and assessment of soft-rot wood deterioration. Part 5. Genus *Aureobasidium*. **Holzforschung**, 71(5), 437–443.
- Legendre, P., Gallagher, E. D. (2001). Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. **Oecologia**, 129(2), 271–280.
- Li, H. (2018). Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. **Bioinformatics**, 34(18), 3094-3100.
- Li, H., et al. (2009). The sequence alignment/map format and SAMtools. **Bioinformatics**, 25(16), 2078-2079.
- Li, Y., Jiao, L., Yao, Y. J. (2013). Non-concerted ITS evolution in fungi, as revealed from the important medicinal fungus *Ophiocordyceps sinensis*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 68(2), 373-379.
- Liao, D. (1999). Concerted evolution: molecular mechanism and biological implications. **American Journal of Human Genetics**, 64(1), 24.
- Liao, D., Pavelitz, T., Kidd, J. R., Kidd, K. K., Weiner, A. M. (1997). Concerted evolution of the tandemly repeated genes encoding human U2 snRNA (the RNU2 locus) involves rapid intrachromosomal homogenization and rare interchromosomal gene conversion. **The EMBO Journal**, 16(3), 588-598.
- Libkind, D., Brizzio, S., Van Broock, M. (2004). *Rhodotorula mucilaginosa*, a carotenoid producing yeast strain from a Patagonian high-altitude lake. **Folia microbiologica**, 49, 19-25.
- Ljunggren, J., et al. (2019). Yeast volatomes differentially affect larval feeding in an insect herbivore. **Applied and Environmental Microbiology**, 85(21), e01761-19.
- Lomsadze, A., Ter-Hovhannisyan, V., Chernoff, Y. O., Borodovsky, M. (2005). Gene identification in novel eukaryotic genomes by self-training algorithm. **Nucleic acids research**, 33(20), 6494-6506.

- Lou, Q. Z., Lu, M., Sun, J. H. (2014). Yeast diversity associated with invasive *Dendroctonus valens* killing *Pinus tabulaeformis* in China using culturing and molecular methods. **Microbial ecology**, 68, 397-415.
- Louis, V. L., et al. (2012). *Pichia sorbitophila*, an interspecies yeast hybrid, reveals early steps of genome resolution after polyploidization. **G3**, 2(2), 299-311.
- Macedo, J. H. P. (1985). **Manual dos Scolytidae nos reflorestamentos brasileiros**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná: GTZ, 69 p.
- Macêdo, N. S., et al. (2020). *Caesalpinia ferrea* C. Mart.(Fabaceae) phytochemistry, ethnobotany, and bioactivities: a review. **Molecules**, 25(17), 3831.
- Madbouly, A. K., Elyousr, K. A. A., Ismail, I. M. (2020). Biocontrol of *Monilinia fructigena*, causal agent of brown rot of apple fruit, by using endophytic yeasts. **Biological control**, 144, 104239.
- Madden, A. A., Epps, M. J., Fukami, T., Irwin, R. E., Sheppard, J., Sorger, D. M., Dunn, R. R. (2018). The ecology of insect–yeast relationships and its relevance to human industry. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, 285(1875), 20172733.
- Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D., Polonelli, L. (1997). Yeast killer systems. **Clinical microbiology reviews**, 10(3), 369-400.
- Makower, M., Bevan, E. A. (1963). The inheritance of a killer character in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). **Proc Int Congr Genet XI**, v. 1, n. 202, 235-244.
- Maksimova, I. A., Glushakova, A. M., Kachalkin, A. V., Chernov, I. Y., Panteleeva, S. N., Reznikova, Z. I. (2016). Yeast communities of *Formica aquilonia* colonies. **Microbiology**, 85, 124-129.
- Markmann, M., Tautz, D. (2005). Reverse taxonomy: an approach towards determining the diversity of meiobenthic organisms based on ribosomal RNA signature sequences. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, 360(1462), 1917-1924.
- Marquina, D., Santos, A., Peinado, J. (2002). Biology of killer yeasts. **International Microbiology**, 5(2), 65–71.
- Martinac, B., Zhu, H., Kubalski, A., Zhou, X. L., Culbertson, M., Bussey, H., Kung, C. (1990). Yeast K1 killer toxin forms ion channels in sensitive yeast spheroplasts and in artificial liposomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 87(16), 6228-6232.
- Martins M, Kluczkowski AM, Souza TP, Pacheco C, Savi GD, Scussel VM (2014). Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* by guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) and jucá (*Libidibia ferrea* Mart) extracts. **Afr. J. Biotech.** 13(1):131-137.
- Martinson, V. G. (2020). Rediscovering a forgotten system of symbiosis: historical perspective and future potential. **Genes**, 11(9), 1063.
- Mathews, D. H. (2006). RNA secondary structure analysis using RNAstructure. **Current protocols in bioinformatics**, 13(1), 12-16.

- Mathews, D. H. (2014). Using the RNA structure software package to predict conserved RNA structures. **Current Protocols in Bioinformatics**, 46(1), 12-14.
- McBride, R., Greig, D., Travisano, M. (2008). Fungal viral mutualism moderated by ploidy. **Evolution**, 62(9), 2372-2380.
- Melo, W. G. P., de Oliveira, T. B., Arcuri, S. L., de Moraes, P. B., Pagnocca, F. C. (2021). Yeasts in the nests of the leaf-cutter ant *Acromyrmex balzani* in a Savanna biome: exploitation of community and metabolic diversity. **Antonie van Leeuwenhoek**, 114(6), 751–764.
- Mendes, T. D., Rodrigues, A., Dayo-Owoyemi, I., Marson, F. A., Pagnocca, F. C. (2012). Generation of nutrients and detoxification: possible roles of yeasts in leaf-cutting ant nests. **Insects**, 3(1), 228–245.
- Mestre, M. C., Rosa, C. A., Fontenla, S. B. (2011). *Lindnera rhizosphaerae* sp. nov., a yeast species isolated from rhizospheric soil. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 61(4), 985-988.
- Meyer, S. T., Leal, I. R., Tabarelli, M., Wirth, R. (2011). Ecosystem engineering by leaf-cutting ants: nests of *Atta cephalotes* drastically alter forest structure and microclimate. **Ecological entomology**, 36(1), 14-24.
- Meyer, W., Mitchell, T. G., Freedman, E. Z., Vilgalys, R. (1993). Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, 31(9), 2274–2280.
- Miller, M.A., Pfeiffer, W., Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. **Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)**, 14 Nov. 2010, New Orleans, LA pp 1–8.
- Möller, A. (1893). **Die Pilzgärten einiger südamerikanischer Ameisen** (No. 6). G. Fischer.
- Morales, L., Dujon, B. (2012). Evolutionary role of interspecies hybridization and genetic exchanges in yeasts. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 76(4), 721-739.
- Mueller, U. G., Rabeling, C. (2008). A breakthrough innovation in animal evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America**, 105(14), 5287–5288.
- Mullineux, T., Hausner, G. (2009). Evolution of rDNA ITS1 and ITS2 sequences and RNA secondary structures within members of the fungal genera *Grosmannia* and *Leptographium*. **Fungal Genetics and Biology**, 46(11), 855-867.
- Mylvaganam, S., Dennis, P. P. (1992). Sequence heterogeneity between the two genes encoding 16S rRNA from the halophilic archaebacterium *Haloarcula marismortui*. **Genetics**, 130(3), 399-410.
- Nakamura, E. S., et al. (2002). Cancer chemopreventive effects of a Brazilian folk medicine, Juca, on in vivo two-stage skin carcinogenesis. **Journal of Ethnopharmacology**, 81(1), 135-137.

- Naumov, G. I., IuV, I., Naumova, E. S. (2005). Molecular polymorphism of viral dsRNA of yeast *Saccharomyces paradoxus*. **Molekuliarnaia Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya**, (1), 38-40.
- Naumov, G. I., Ivannikova, Y. V., Chernov, I. Y., Naumova, E. S. (2009). Natural polymorphism of the plasmid double-stranded RNA of the *Saccharomyces* yeasts. **Microbiology**, 78, 208-213.
- Nei, M., Rooney, A. P. (2005). Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. **Annual Review of Genetics**, 39, 121.
- Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., Von Haeseler, A., Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, 32(1), 268-274.
- Nguyen, N. H., Suh, S. O., Blackwell, M. (2007). Five novel *Candida* species in insect-associated yeast clades isolated from Neuroptera and other insects. **Mycologia**, 99(6), 842–858.
- Nguyen, N. H., Suh, S. O., Erbil, C. K., Blackwell, M. (2006). *Metschnikowia noctiluminum* sp. nov., *Metschnikowia corniflorae* sp. nov., and *Candida chrysomelidarum* sp. nov., isolated from green lacewings and beetles. **Mycological research**, 110(3), 346-356.
- Nomoto, H., Kitano, K., Shimazaki, T., Kodama, K., Hara, S. (1984). Distribution of killer yeasts in the genus *Hansenula*. **Agricultural and biological chemistry**, 48(3), 807-809.
- Nundaeng, S., Suwannarach, N., Limtong, S., Khuna, S., Kumla, J., Lumyong, S. (2021). An updated global species diversity and phylogeny in the genus *Wickerhamomyces* with addition of two new species from thailand. **Journal of Fungi**, 7(11), 957.
- Nygaard, S., et al. (2016). Reciprocal genomic evolution in the ant–fungus agricultural symbiosis. **Nature Communications**, 7(1), 12233.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E., Nirenberg, H. I. (1998). Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, 90(3), 465-493.
- Okada, R., Kiyota, E., Moriyama, H., Fukuhara, T., Natsuaki, T. (2015). A simple and rapid method to purify viral dsRNA from plant and fungal tissue. **Journal of General Plant Pathology**, 81, 103-107.
- Oksanen, J. F., et al. (2020). vegan: Community Ecology Package. **R package version 2.5-7**. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- Oliveira, F.G., Fernando, E.M.P. **Libidibia in Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível online: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB109828>
- Pagnocca, F. C., Carreiro, S. C., Bueno, O. C., Hebling, M. J., Da Silva, O. A. (1996). Microbiological changes in the nests of leaf-cutting ants fed on sesame leaves. **Journal of Applied Entomology**, 120(1-5), 317–320.
- Pagnocca, F. C., Rodrigues, A., Nagamoto, N. S., Bacci, M. (2008). Yeasts and filamentous fungi carried by the gynes of leaf-cutting ants. **Antonie van Leeuwenhoek**, 94(4), 517–526.

- Perez, M. F., Contreras, L., Garnica, N. M., Fernández-Zenoff, M. V., Farías, M. E., Sepulveda, M., Ramallo, J., Dib, J. R. (2016). Native killer yeasts as biocontrol agents of postharvest fungal diseases in lemons. **PloS One**, 11(10), e0165590.
- Pfeiffer, I., Golubev, W. I., Farkas, Z., Kucsera, J., Golubev, N. (2004). Mycocin production in *Cryptococcus aquaticus*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 86, 369-375.
- Philliskirk, G., Young, T. W. (1975). The occurrence of killer character in yeasts of various genera. **Antonie van Leeuwenhoek**, 41, 147-151.
- Pieczynska, M. D., de Visser, J. A. G., Korona, R. (2013). Incidence of symbiotic dsRNA ‘killer’ viruses in wild and domesticated yeast. **FEMS Yeast Research**, 13(8), 856–859.
- Pieczynska, M. D., Wloch-Salamon, D., Korona, R., de Visser, J. A. G. (2016). Rapid multiple-level coevolution in experimental populations of yeast killer and nonkiller strains. **Evolution**, 70(6), 1342-1353.
- Pintar, J., Starmer, W. T. (2003). The costs and benefits of killer toxin production by the yeast *Pichia kluyveri*. **Antonie van Leeuwenhoek**, 83, 89-97.
- Polonelli, L., Conti, S., Gerloni, M., Magliani, W., Castagnola, M., Morace, G., Chezzi, C. (1991). ‘Antibiododies’: antibiotic-like anti-idiotypic antibodies. *Journal of medical and veterinary mycology*, 29(4), 235-242.
- Polonelli, L., Morace, G. (1986). Reevaluation of the yeast killer phenomenon. **Journal of Clinical Microbiology**, 24(5), 866–869.
- R Core Team. (2021). R: A Language and Environment for Statistical Computing.; **R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria**; Available online: <https://www.R-project.org/> (accessed on 20 December 2021).
- Rafferty, N. E., CaraDonna, P. J., Bronstein, J. L. (2015). Phenological shifts and the fate of mutualisms. **Oikos**, 124(1), 14-21.
- Rambaut, A., 2016. **Figtree v. 1.4.3**. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/2016>.
- Ramirez, M., Lopez-Pineiro, A., Velazquez, R., Munoz, A., Regodon, J. A. (2020a). Analysing the vineyard soil as a natural reservoir for wine yeasts. **Food Research International**, 129, 108845.
- Ramírez, M., Velázquez, R., Maqueda, M., López-Piñeiro, A., Ribas, J. C. (2015). A new wine *Torulaspora delbrueckii* killer strain with broad antifungal activity and its toxin-encoding double-stranded RNA virus. **Frontiers in microbiology**, 6, 983.
- Ramírez, M., Velázquez, R., Maqueda, M., Martínez, A. (2020b). Genome organization of a new double-stranded RNA LA helper virus from wine *Torulaspora delbrueckii* killer yeast as compared with its *Saccharomyces* counterparts. **Frontiers in Microbiology**, 11, 593846.
- Reuter, M., Bell, G., Greig, D. (2007). Increased outbreeding in yeast in response to dispersal by an insect vector. **Current Biology**, 17(3), R81-R83.



- Rivera, F. N., Gonzalez, E., Gomez, Z., Lopez, N., Hernandez-Rodriguez, C., Berkov, A., Zuniga, G. (2009). Gut-associated yeast in bark beetles of the genus *Dendroctonus* Erichson (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). **Biological Journal of the Linnean Society**, 98(2), 325-342.
- Roberts, D. W. (2019). labdsv: Ordination and Multivariate Analysis for Ecology. **R package version 2.0-1**. <https://CRAN.R-project.org/package=labdsv>.
- Robledo-Leal, E., Elisondo-Zatuche, M., Treviño-Rangel, R. J., González, G. M., Hernández-Luna, C. (2016). Isolation of killer yeasts from ants of the genus *Atta* and their effect on the red tomato's fungal pathogen *Geotrichum candidum*. **Mexican Journal of Phytopathology**, 34, 258–269.
- Rodrigues, A., Bacci Jr, M., Mueller, U. G., Ortiz, A., Pagnocca, F. C. (2008). Microfungal “weeds” in the leafcutter ant symbiosis. **Microbial Ecology**, 56, 604-614.
- Rodrigues, A., Cable, R. N., Mueller, U. G., Bacci, M., Pagnocca, F. C. (2009). Antagonistic interactions between garden yeasts and microfungal garden pathogens of leaf-cutting ants. **Antonie van Leeuwenhoek**, 96(3), 331–342.
- Rodrigues, A., Mueller, U. G., Ishak, H. D., Bacci Jr, M., Pagnocca, F. C. (2011). Ecology of microfungal communities in gardens of fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae): a year-long survey of three species of attine ants in Central Texas. **FEMS Microbiology Ecology**, 78(2), 244-255.
- Rodríguez-Cousiño, N., Gómez, P., Esteban, R. (2017). Variation and distribution of LA helper totiviruses in *Saccharomyces sensu stricto* yeasts producing different killer toxins. **Toxins**, 9(10), 313.
- Ronque, M. U. V., Feitosa, R. M., Oliveira, P. S. (2019). Natural history and ecology of fungus-farming ants: a field study in Atlantic rainforest. **Insectes Sociaux**, 66(3), 375–387.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, S.A., Huelsenbeck, J.P. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic biology**, 61(3), 539–542.
- Rooney, A. P. (2004). Mechanisms underlying the evolution and maintenance of functionally heterogeneous 18S rRNA genes in apicomplexans. **Molecular Biology and Evolution**, 21(9), 1704-1711.
- Rooney, A. P., Ward, T. J. (2005). Evolution of a large ribosomal RNA multigene family in filamentous fungi: birth and death of a concerted evolution paradigm. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 102(14), 5084-5089.
- Roscini, L., et al. (2018). Early ongoing speciation of *Ogataea uvarum* sp. nov. within the grape ecosystem revealed by the internal variability among the rDNA operon repeats. **Frontiers in Microbiology**, 9, 1687.
- Rowley, P. A. (2017). The frenemies within: viruses, retrotransposons and plasmids that naturally infect *Saccharomyces* yeasts. **Yeast**, 34(7), 279-292.
- RStudio Team. (2021). RStudio: Integrated Development Environment for R.; **RStudio**, PBC: Boston, MA, USA; <http://www.rstudio.com/>.

- Sampaio, J. P., Gadanho, M., Santos, S., Duarte, F. L., Pais, C., Fonseca, A., Fell, J. W. (2001). Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodosporidium*: *Rhodosporidium kratochvilovae* and related anamorphic species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 51(2), 687–697.
- Sanglard, D., Ischer, F., Calabrese, D., de Micheli, M., Bille, J. (1998). Multiple resistance mechanisms to azole antifungals in yeast clinical isolates. **Drug Resistance Updates**, 1(4), 255–265.
- Santos, A. R. D. O., Lee, D. K., Ferreira, A. G., do Carmo, M. C., Rondelli, V. M., Barros, K. O., Hsiang, T., Rosa, C. A., Lachance, M. A. (2020). The yeast community of *Conotelus* sp. (Coleoptera: Nitidulidae) in Brazilian passionfruit flowers (*Passiflora edulis*) and description of *Metschnikowia amazonensis* sp. nov., a large-spored clade yeast. **Yeast**, 37(3), 253–260.
- Schaffrath, R., Meinhardt, F., Klassen, R. (2018). Yeast killer toxins: Fundamentals and applications. **Physiology and Genetics: Selected Basic and Applied Aspects**, 87–118.
- Scheidler, N. H., Liu, C., Hamby, K. A., Zalom, F. G., Syed, Z. (2015). Volatile codes: correlation of olfactory signals and reception in *Drosophila*-yeast chemical communication. **Scientific reports**, 5(1), 14059.
- Schmitt, M. J., Breinig, F. (2006). Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. **Nature Reviews Microbiology**, 4(3), 212–221.
- Schmitt, M. J., Klavehn, P., Wang, J., Schöning, I., Tipper, D. J. (1996). Cell cycle studies on the mode of action of yeast K28 killer toxin. **Microbiology**, 142(9), 2655–2662.
- Schmitt, M. J., Neuhausen, F. (1994). Killer toxin-secreting double-stranded RNA mycoviruses in the yeasts *Hanseniaspora uvarum* and *Zygosaccharomyces bailii*. **Journal of virology**, 68(3), 1765–1772.
- Schmitt, M. J., Reiter, J. (2008). Viral induced yeast apoptosis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, 1783(7), 1413–1417.
- Schmitt, M., Brendel, M., Schwarz, R., Radler, F. (1989). Inhibition of DNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by yeast killer toxin KT28. **Microbiology**, 135(6), 1529–1535.
- Schmitt, R. J., Holbrook, S. J. (2003). Mutualism can mediate competition and promote coexistence. **Ecology Letters**, 6(10), 898–902.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature methods**, 9(7), 671–675.
- Schoch, C. L., et al. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 109(16), 6241–6246.
- Schultz, T. R., Brady, S. G. (2008). Major evolutionary transitions in ant agriculture. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 105(14), 5435–5440.

- Schultz, T. R., Sosa-Calvo, J., Brady, S. G., Lopes, C. T., Mueller, U. G., Bacci Jr, M., Vasconcelos, H. L. (2015). The most relictual fungus-farming ant species cultivates the most recently evolved and highly domesticated fungal symbiont species. **The American Naturalist**, 185(5), 693–703.
- Seike, T., Sakata, N., Matsuda, F., Furusawa, C. (2021). Elevated sporulation efficiency in fission yeast *Schizosaccharomyces japonicus* strains isolated from *Drosophila*. **Journal of Fungi**, 7, 350.
- Sena, L. M., Morais, C. G., Lopes, M. R., Santos, R. O., Uetanabaro, A., Morais, P. B., Vital, M. J. S., Morais, M. A. Jr., Lachance, M. A., Rosa, C. A. (2017). d-Xylose fermentation, xylitol production and xylanase activities by seven new species of *Sugiyamaella*. **Antonie van Leeuwenhoek**, 110(1), 53–67.
- Seppely, M., Manni, M., Zdobnov, E. M. (2019). BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness. **Gene prediction: methods and protocols**, 227-245.
- Shen, S. K., Dowd, P. F. (1989). Xenobiotic induction of esterases in cultures of the yeast-like symbiont from the cigarette beetle. **Entomologia experimentalis et applicata**, 52(2), 179-184.
- Shen, S. K., Dowd, P. F. (1991). Detoxification spectrum of the cigarette beetle symbiont *Symbiotaphrina kochii* in culture. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 60(1), 51-59.
- Shi, C. F., Zhang, K. H., Chai, C. Y., Yan, Z. L., Hui, F. L. (2021). Diversity of the genus *Sugiyamaella* and description of two new species from rotting wood in China. **MycoKeys**, 77, 27.
- Silva, A., Bacci Jr, M., de Siqueira, C. G., Bueno, O. C., Pagnocca, F. C., Hebling, M. J. A. (2003). Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. **Journal of Insect Physiology**, 49(4), 307-313.
- Silva, A., Bacci Jr, M., Pagnocca, F. C., Bueno, O. C., Hebling, M. J. A. (2006). Starch metabolism in *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. **Microbiological research**, 161(4), 299-303.
- Simon, U. K., Weiß, M. (2008). Intragenomic variation of fungal ribosomal genes is higher than previously thought. **Molecular Biology and Evolution**, 25(11), 2251-2254.
- Sipiczki, M. (2020). *Metschnikowia pulcherrima* and related pulcherrimin-producing yeasts: Fuzzy species boundaries and complex antimicrobial antagonism. **Microorganisms**, 8(7), 1029.
- Sipiczki, M., Horvath, E., Pfliegler, W. P. (2018). Birth-and-death evolution and reticulation of ITS segments of *Metschnikowia andauensis* and *Metschnikowia fructicola* rDNA repeats. **Frontiers in Microbiology**, 9, 1193.
- Sipiczki, M., Pfliegler, W. P., Holb, I. J. (2013). *Metschnikowia* species share a pool of diverse rRNA genes differing in regions that determine hairpin-loop structures and evolve by reticulation. **PloS One**, 8(6), e67384.
- Smith, G. P. (1976). Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover: DNA whose sequence is not maintained by selection will develop periodicities as a result of random crossover. **Science**, 191(4227), 528-535.

- Soares, M. R. P. S., Caneschi, C. A., Chaves, M. D. G. A. M., Mota, M., Stroppa, P. H. F., Barbosa, W., Raposo, N. R. B. (2018a). In vitro antifungal activity and cytotoxicity screening of dry crude extracts from Brazilian Amazonia plants. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, 15(4), 13-21.
- Soares, M. R., et al. Raposo, N. R. (2018b). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Caesalpinia ferrea* (Tul.) Martius extract: physicochemical characterization, antifungal activity and cytotoxicity. **PeerJ**, 6, e4361.
- Somers, J. M., Bevan, E. A. (1969). The inheritance of the killer character in yeast. **Genetics Research**, 13(1), 71-83.
- Soto-Robles, L. V., Torres-Banda, V., Rivera-Orduña, F. N., Curiel-Quesada, E., Hidalgo-Lara, M. E., Zúñiga, G. (2019). An overview of genes from *Cyberlindnera americana*, a symbiont yeast isolated from the gut of the bark beetle *Dendroctonus rhizophagus* (Curculionidae: Scolytinae), involved in the detoxification process using genome and transcriptome data. **Frontiers in Microbiology**, 10, 2180.
- Spitaler, U., et al. (2020). Yeast species affects feeding and fitness of *Drosophila suzukii* adults. **Journal of Pest Science**, 93, 1295-1309.
- Stanke, M., Morgenstern, B. (2005). AUGUSTUS: a web server for gene prediction in eukaryotes that allows user-defined constraints. **Nucleic acids research**, 33(suppl\_2), W465-W467.
- Starmer, W. T., Fogleman, J. C. (1986). Coadaptation of *Drosophila* and yeasts in their natural habitat. **Journal of Chemical Ecology**, 12, 1037-1055.
- Starmer, W. T., Ganter, P. F., Aberdeen, V., Lachance, M. A., Phaff, H. J. (1987). The ecological role of killer yeasts in natural communities of yeasts. **Canadian journal of microbiology**, 33(9), 783-796.
- Starmer, W. T., Lachance, M. A. (2011). Yeast ecology. **The yeasts**, 65-83.
- Stefanini, I. (2018). Yeast-insect associations: It takes guts. **Yeast**, 35(4), 315–330.
- Stefanini, I., Dapporto, L., Berná, L., Polsinelli, M., Turillazzi, S., Cavalieri, D. (2016). Social wasps are a *Saccharomyces* mating nest. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 113, 2247–2251.
- Stefanini, I., et al. (2012). Role of social wasps in *Saccharomyces cerevisiae* ecology and evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 109(33), 13398-13403.
- Sternberg, L. D. S., Pinzon, M. C., Moreira, M. Z., Moutinho, P., Rojas, E. I., Herre, E. A. (2007). Plants use macronutrients accumulated in leaf-cutting ant nests. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, 274(1608), 315-321.
- Stoeck, T., Przybos, E., Dunthorn, M. (2014). The D1/D2 region of the large subunit ribosomal DNA as barcode for ciliates. **Molecular Ecology Resources**, 14(3), 458-468.

- Stopiglia, C. D. O., Heidrich, D., Sorrentino, J. M., Vieira, F. J., Landell, M. F., Valente, P., Scroferneker, M. L. (2014). Susceptibility of species within the *Sporothrix schenckii* complex to a panel of killer yeasts. **Journal of Basic Microbiology**, 54(6), 578-584.
- Stöver, B. C., Müller, K. F. (2010). TreeGraph 2: combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. **BMC bioinformatics**, 11(1), 1–9.
- Stumm, C., Hermans, J. M. H., Middelbeek, E. J., Croes, A. F., De Vries, G. J. M. L. (1977). Killer-sensitive relationships in yeasts from natural habitats. **Antonie van Leeuwenhoek**, 43, 125-128.
- Suesdek, L., Lima, F. C. T. (2011). Association of the borer *Spermophthorus apuleiae* (Coleoptera; Curculionidae; Scolytinae) with the " pau-ferro" tree *Caesalpinia ferrea* (Leguminosae). **Biota Neotropica**, 11, 21-23.
- Suh, S. O., Blackwell, M. (2004). Three new beetle-associated yeast species in the *Pichia guilliermondii* clade. **FEMS Yeast Research**, 5(1), 87-95.
- Suh, S. O., Blackwell, M. (2005). Four new yeasts in the *Candida mesenterica* clade associated with basidiocarp-feeding beetles. **Mycologia**, 97(1), 167-177.
- Suh, S. O., McHugh, J. V., Pollock, D. D., Blackwell, M. (2005). The beetle gut: a hyperdiverse source of novel yeasts. **Mycological Research**, 109(3), 261–265.
- Suh, S. O., Nguyen, N. H., Blackwell, M. (2008). Yeasts isolated from plant-associated beetles and other insects: seven novel *Candida* species near *Candida albicans*. **FEMS yeast research**, 8(1), 88–102.
- Toki, W. (2021). A single case study of mycetangia-associated fungi and their abilities to assimilate wood-associated carbon sources in the ship timber beetle *Elateroides flabellicornis* (Coleoptera: Lymexylidae) in Japan. **Symbiosis**, 83(2), 173-181.
- Toki, W. (2023). Fungal community of mycetangia in the ship-timber beetle *Elateroides dermestoides* (Coleoptera: Lymexylidae) in Japan. **Symbiosis**, 1-7.
- Toki, W., Tanahashi, M., Togashi, K., Fukatsu, T. (2012). Fungal farming in a non-social beetle. **PLoS ONE** 7(7), e41893.
- Torto, B., et al. (2007). Composition of volatiles from fermenting pollen dough and attractiveness to the small hive beetle *Aethina tumida*, a parasite of the honeybee *Apis mellifera*. **Apidologie**, 38(4), 380-389.
- Trindade, R. C., Resende, M. A., Silva, C. M., Rosa, C. A. (2002). Yeasts associated with fresh and frozen pulps of Brazilian tropical fruits. **Systematic and Applied Microbiology**, 25(2), 294-300.
- Ueda, H., Tachibana, Y., Moriyasu, M., Kawanishi, K., Alves, S. M. (2001). Aldose reductase inhibitors from the fruits of *Caesalpinia ferrea* Mart. **Phytomedicine**, 8(5), 377-381.
- Urbina, H., Schuster, J., Blackwell, M. (2013). The gut of Guatemalan passalid beetles: a habitat colonized by cellobiose-and xylose-fermenting yeasts. **Fungal ecology**, 6(5), 339–355.

- Vadasz, A. S., Vadasz, P., Gupthar, A. S., Abashar, M. E. (2003). Theoretical and experimental evidence of extinction and coexistence of killer and sensitive strains of yeast grown as a mixed culture in water. **International journal of food microbiology**, 84(2), 157-174.
- Valzano, M., et al. (2016). A yeast strain associated to *Anopheles* mosquitoes produces a toxin able to kill malaria parasites. **Malaria journal**, 15, 1-9.
- Vaughan-Martini, A. (1995). *Saccharomyces barnetti* and *Saccharomyces spencerorum*: two new species of *Saccharomyces* sensu lato (van der Walt). **Antonie van Leeuwenhoek**, 68, 111-118.
- Vega, F. E., Biedermann, P. H. (2020). On interactions, associations, mycetangia, mutualists and symbiotes in insect-fungus symbioses. **Fungal Ecology**, 44, 100909.
- Vital, M. J. S., Abranches, J., Hagler, A. N., Mendonça-Hagler, L. C. (2002). Mycocinogenic yeasts isolated from Amazon soils of the Maracá ecological station, Roraima-Brasil. **Brasilian Journal of Microbiology**, 33, 230-235.
- Vu, D., et al. (2016). DNA barcoding analysis of more than 9000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation. **Studies in Mycology**, 85(1), 91-105.
- Walker, G. M., Mcleod, A. H., Hodgson, V. J. (1995). Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. **FEMS microbiology letters**, 127(3), 213-222.
- Wang, Y., Zhang, Z., Ramanan, N. (1997). The actinomycete *Thermobispora bispora* contains two distinct types of transcriptionally active 16S rRNA genes. **Journal of Bacteriology**, 179(10), 3270-3276.
- Weber, N. A. (1972). The fungus-culturing behavior of ants. **American Zoologist**, 12(3), 577–587.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR protocols: a guide to methods and applications**, 18(1), 315-322.
- Wickham, H. **Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis**; Springer: New York, NY, USA, 2016; ISBN 978-3-319-24277-4. <https://ggplot2.tidyverse.org>.
- Witzgall, P., et al. (2012). “This is not an apple”—yeast mutualism in codling moth. **Journal of chemical ecology**, 38, 949-957.
- Wloch-Salamon, D. M., Gerla, D., Hoekstra, R. F., de Visser, J. A. G. (2008). Effect of dispersal and nutrient availability on the competitive ability of toxin-producing yeast. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, 275(1634), 535-541.
- Wójcik, M., Kordowska-Wiater, M. (2015). The occurrence of killer activity in yeasts isolated from natural habitats. **Acta Biochimica Polonica**, 62(4).
- Wood, S.L. 1982. The bark and ambrosia beetles of North and Central America (Coleoptera: Scolytidae), a taxonomic monograph. **Great Basin Nat. Mem.** 6: 1-1356.

Woods, D. R., Bevan, E. A. (1968). Studies on the nature of the killer factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, 51(1), 115–126.

Wu, Z. W., Wang, Q. M., Liu, X. Z., Bai, F. Y. (2016). Intragenomic polymorphism and intergenomic recombination in the ribosomal RNA genes of strains belonging to a yeast species *Pichia membranifaciens*. **Mycology**, 7(3), 102-111.

Yamamoto, D., Toki, W. (2023). Presence of non-symbiotic yeasts in a symbiont-transferring organ of a stag beetle that lacks yeast symbionts found in other stag beetles. **Scientific Reports**, 13(1), 3726.

Yamamoto, T., Hiratani, T., Hirata, H., Imai, M., Yamaguchi, H. (1986). Killer toxin from *Hansenula mrakii* selectively inhibits cell wall synthesis in a sensitive yeast. **FEBS letters**, 197(1-2), 50-54.

Yurkov, A. M. (2018). Yeasts of the soil—obscure but precious. **Yeast**, 35(5), 369–378.

Zorg, J., Kilian, S., Radler, F. (1988). Killer toxin producing strains of the yeasts *Hanseniaspora uvarum* and *Pichia kluyveri*. **Archives of microbiology**, 149, 261-267.