

DIEGO SANTANA ASSIS

**POLIÓIS E COMPOSTOS VOLÁTEIS EM JARDINS DE FUNGOS DE
FORMIGAS: ECOLOGIA, EVOLUÇÃO E APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS**

Relatório de Pós-doutorado realizado na
Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Instituto de Biociências de Rio Claro, Rio
Claro

Supervisor(a): Prof. Dr. Maurício Bacci
Júnior

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) - 2020/12423-7

Rio Claro

2025

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil. Processo nº 2020/12423-7. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do(s) autor(es) e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

Relatório Fapesp Pós Doc

Período de 2022/2023

Beneficiário: Diego Santana Assis

Responsável: Maurício Bacci Jr

Resumo projeto de pós-doutorado, Proc. FAPESP #2020/12423-7

Resumo: As formigas da subtribo Attina (Formicidae: Myrmicinae), as attinas, estão distribuídas no Continente Americano, com a maioria das espécies na América do Sul. Ocorrem em 15 gêneros e mais de 250 espécies, que dependem, para sua nutrição, de fungos mutualistas que digerem uma variedade de substratos nos “jardins de fungos” nos seus ninhos. As formigas cortadeiras são as mais derivadas entre as attinas e o jardim de fungo de uma delas, *Atta bisphaerica*, degrada monocotiledôneas em monossacarídeos e polióis, dois deles com altíssimo valor econômico. Além das cortadeiras, que digerem folhas frescas, existem outros quatro grupos de formigas attinas especialistas em digerir diferentes biomassas: sementes vegetais, carcaças de insetos, fezes de insetos, folhas e flores murchas que caem das plantas, monocotiledôneas, dicotiledôneas. As enzimas e os produtos gerados nestes processos permanecem desconhecidos para a Ciência e não se sabe se esses quatro especialistas geram também polióis, que podem ser estocados em grandes quantidades sem causar alterações osmóticas relevantes, não são facilmente assimiláveis por microrganismos invasores, podem estabilizar exoenzimas digestórias dos jardins e são fontes nutricionais para as formigas. Vantagens como estas fazem da produção de polióis uma importante inovação para o mutualismo entre as formigas e fungos, cuja origem e evolução permanecem desconhecidas. Adicionalmente, os polióis podem representar um importante meio de comunicação química direcionando a preferência das formigas, o que é um fenômeno chave na origem do mutualismo. Buscando testar estas hipóteses e responder àquelas questões, o presente projeto de pós-doutorado tem os seguintes objetivos: (1) Determinar a diversidade, abundância e evolução da produção de polióis nas attíneas; (2) Determinar a participação dos polióis como mediadores da comunicação química entre os mutualistas.

Projeto FAPESP no qual se insere a presente proposta

O presente projeto de pós-doutorado se enquadra especificamente no Objetivo 3 “Aim 3: Determine the chemical ecology mediating interactions in the fungus-farming ant symbiosis”, proposto no seguinte projeto temático: 2019/03746-0 Auxílio Pesquisa - Programa Biota – Projeto Temático: Pesquisa Colaborativa: Dimensions US-São Paulo: Integrando filogenia, genética e ecologia química para desvendar a emaranhada simbiose multipartida das formigas cultivadoras de fungos. Pesquisadores Principais: André Rodrigues (Unesp, Rio Claro) e Bryn Dentinger (University of Utah).

Os desdobramentos, que embasam a solicitação de prorrogação da bolsa de pós-doutorado, são parte integrante do “Work Pack 4 - Microbiome diagnosis for natural and sustainable solutions” do Projeto PAPER 2021/0639-5 – CEPID, intitulado Center for Research on Biodiversity Dynamics and Climate Change”, recentemente aprovado pelo professor Dr. Maurício Bacci Jr como Co-PI e que passou a ter associado o presente projeto de pós-doutorado. Para atuar no CEPID, pedimos a prorrogação de 12 meses da bolsa de Diego Santana Assis.

Introdução

Attinas: As formigas apresentam grande sucesso ecológico e ocupam a maioria dos habitats terrestres (Hölldobler & Wilson, 1990). As formigas da subtribo Attina (Formicidae: Myrmicinae), ou attinas, estão distribuídas no Continente Americano, com a maioria das espécies na região neotropical (Hölldobler & Wilson, 1990). Ocorrem em 15 gêneros e 253 espécies (Bolton, 2014), todas dependentes, para sua nutrição, de fungos mutualistas que cultivam em uma variedade de substratos no interior de seus ninhos (Weber, 1972; Hölldobler & Wilson, 1990; Schultz & Brady, 2008). As Attini são divididas em basalmente ou apicalmente derivadas (Schultz & Meier, 1995), em filogenias utilizando sequências de DNA mitocondrial e morfologia das larvas, ou em Paleoattini ou Neoattini (Schultz & Brady, 2008), com base em análises de sequências de genes nucleares. Cinco sistemas de agricultura (fungiculturas), definidos de acordo com a afiliação filogenética dos fungos mutualistas (Schultz & Brady, 2008), estão distribuídos entre as duas principais linhagens da tribo Attini: (A) agricultura das cortadeiras, (B) derivada, (C) de leveduras, (D) basal, (E) de fungos corais (Fig. 1).

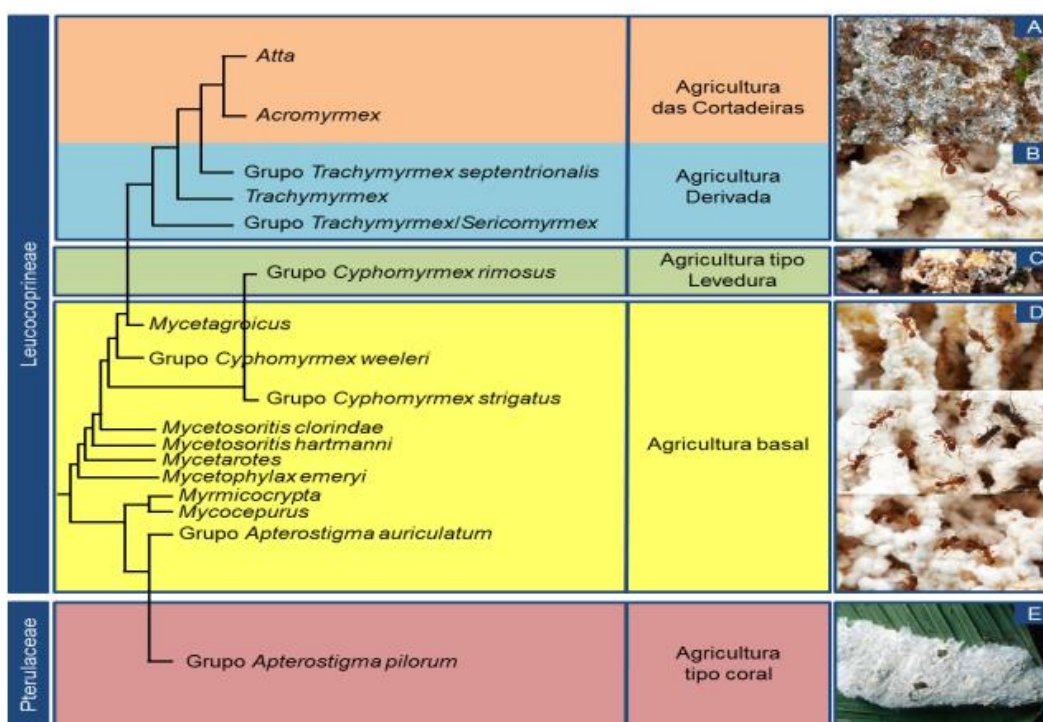


Figura 1. Filogenia das formigas Attini e os cinco tipos de agricultura. Os tipos de agricultura estão separados por retângulos coloridos, cada um correspondendo a um grupo filogeneticamente distinto de fungos mutualistas. (A) Agricultura das cortadeiras: jardim de fungo de *Atta* (Wild, 2001); (B) Agricultura derivada: jardim de fungo de *Trachymyrmex* (Wild, 2001); (C) Agricultura tipo levedura: jardim de fungo de *Cyphomyrmex* (Wild, 2001); (D) Agricultura basal: jardins de fungo de *Mycocepurus*, *Mycetarotes* e *Cyphomyrmex* (Wild, 2001); (E) Agricultura tipo coral: jardim de fungo de *Apterostigma* (Schultz & Brady, 2008). Figura adaptada por Ana Carolina Marchiori a partir da original produzida por Mehdiabadi & Schultz, 2010

Produção de polióis como inovação estratégica para o mutualismo: As formigas cortadeiras são as mais derivadas entre as attinas e o jardim de uma delas, *Atta bisphaerica*, degrada monocotiledôneas em monossacarídeos e polióis (Somera et al., 2015), dois produtos de altíssimo valor econômico. Os fungos produzem e acumulam compostos de baixo peso molecular para lidar com situações de estresse. Estes compostos são chamados de "solutos compatíveis", por não inibirem o metabolismo, ainda que presentes em altas concentrações intracelulares. Solutos compatíveis incluem álcoois derivados de açúcares (polióis), compostos de amônio quaternário, prolina e compostos sulfônicos terciários. Os álcoois derivados de açúcares (tais como glicerol, manitol, arabitól e sorbitol) correspondem à forma quimicamente reduzida de uma aldose ou de uma cetose, acumulam energia livre e mantêm uma esfera de hidratação ao redor de

moléculas. Eles podem ainda agir como sequestradores de espécies reativas de oxigênio (ROS), prevenindo peroxidação de lipídios que poderiam causar danos celulares (Stoop et al., 1996; Saha & Racine, 2011). Nosso grupo de pesquisa (Somera et al., 2015) mostrou que ao menos 70% da biomassa vegetal em ninhos da formiga cortadeira praga *Atta bisphaerica*, notadamente amido e hemicelulose, são transformados por micro-organismos em monossacarídeos e polióis. Em laboratório, a produção pode ser canalizada preferencialmente para gerar os monossacarídeos glicose e xilose ou os polióis manitol e arabitól (Fig. 3).

Sistemas attíneos inspiram a biotecnologia: O consumo microbiano dos produtos acima mencionados é mínimo (Somera et al., 2015) e as enzimas envolvidas no processo não são submetidas à severa repressão catabólica (Silva et al., 2006), provavelmente porque o processo microbiano produtivo presente nos ninhos evoluiu para estocar carbonos que servem à nutrição das formigas (Bacci et al., 2013). Esta característica é muito útil para fins biotecnológicos, pois a hidrólise de polissacarídeos vegetais é uma limitação no processo de produção de biocombustíveis a partir de biomassa vegetal. Isto porque a hidrólise química é economicamente dispendiosa e a hidrólise microbiana pode ser pouco rentável, devido ao consumo de parte dos produtos gerados pelos micro-organismos (Lynd et al., 2002).

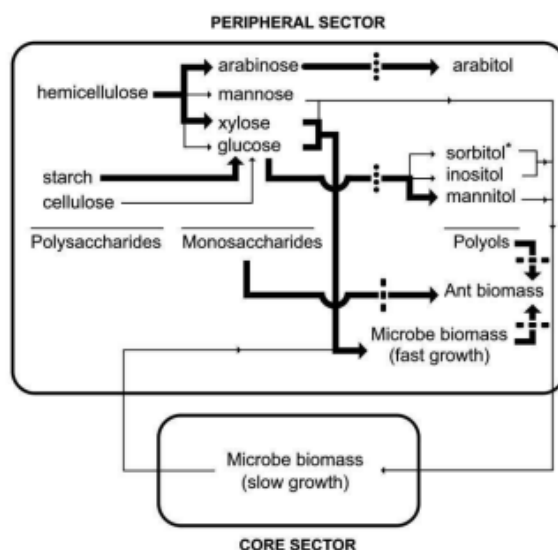


Figura 2: Fluxo de carbonos nos jardins de fungos de formigas cortadeiras e manipulação deste fluxo para gerar produtos de valor econômico. No setor periférico dos jardins, os polissacarídeos vegetais são degradados em monossacarídeos, e alguns destes monossacarídeos são reduzidos a polióis. O fungo mutualista *Leucoagaricus gongylophorus* produz a maioria dos polióis, enquanto sorbitol (*) é produzido por um micro-organismo ainda não identificado. As setas mais grossas indicam os passos metabólicos prevalentes quantitativamente. Alguns polióis sustentam o crescimento lento da biomassa microbiana no setor interno dos jardins. Porções de hifas de *L. gongylophorus*, estocadas no setor interno, são transferidas pelas formigas para crescer rapidamente nos fragmentos de folhas recentemente incorporados no setor periférico. As formigas alimentam-se de biomassa fúngica, monossacarídeos e polióis. A remoção artificial das formigas dos ninhos de laboratório bloqueia o fluxo de carbonos que ocorreria para a biomassa dos insetos (linhas tracejadas), induzindo o rápido acúmulo de monossacarídeos, polióis e biomassa microbiana. A inibição da respiração microbiana induzida por azida sódica bloqueia a produção de polióis (linha pontilhada), causando o rápido acúmulo de monossacarídeos. A manipulação laboratorial dos fluxos de carbonos nos jardins de fungos das formigas cortadeiras podem ser úteis para processos biotecnológicos para gerar tanto polióis como monossacarídeos, estes últimos úteis para a geração de biocombustíveis. Tanto estes como os polióis têm alto valor de mercado (figura extraída de Somera et al. (2015)).

Os polióis gerados nos ninhos das formigas são valiosos para o mercado, com manitol e arabitol alcançando valores de 100 e 500 milhões de dólares anuais, respectivamente (Bhatt et al., 2013). De maneira geral, os polióis apresentam várias aplicações na indústria alimentícia, farmacêutica, médica e química, como aditivos de alimentos, agentes texturizantes, adoçantes de baixa caloria, agentes para formulação de fármacos, na produção de fluidos intravenosos e precursores de muitas resinas e polímeros sintéticos (Chen et al., 2010; Saha e Racine, 2010). Atualmente, a produção industrial da maior parte do polióis ocorre por redução catalítica de açúcares em alta temperatura e pressão, o que requer açúcares altamente puros e dispendiosos passos de purificação cromatográficos (Kumdam et al., 2013; Zhang et al., 2014). Ultimamente, os processos de bioconversão ou biotransformação utilizando bactérias e leveduras têm sido uma alternativa eficiente e de baixo custo para a produção de polióis (Monedero et al., 2010; Kordowska-Wiater, 2015). Em nosso trabalho caracterizando a produção de polióis em *Atta bisphaerica* (Somera et al., 2015), técnicas analíticas foram direcionadas para determinar produtos de hidrólise de polissacarídeos vegetais e alguns polióis, não acessando outros produtos que possam ter sido formados e, conseqüentemente, não avaliando completamente as aplicações biotecnológicas dos jardins de fungos destas cortadeiras.

Polióis e usos na indústria: Os polióis, também conhecidos como álcoois de açúcar, são compostos orgânicos polihídricos comumente produzidos por fungos como parte de seus processos metabólicos (Reynolds, 2009; Somera et al., 2015). Essas substâncias desempenham um papel fundamental na adaptação dos fungos a diferentes condições ambientais e no armazenamento de carbono, o que lhes confere vantagens adaptativas significativas (Patel & Williamson, 2016; Solomon et al., 2007). Dentre os polióis produzidos por fungos, destacam-se o Manitol, Inositol, Sorbitol, Arabitol e Xylitol, cada um com funções específicas e propriedades que contribuem para a sobrevivência e prosperidade desses microrganismos.

Manitol: O Manitol tem uma função importante na fisiologia dos fungos, pois atua como um osmoprotetor, ou seja, um composto que ajuda os organismos a se adaptarem a condições de estresse osmótico, como a seca, o sal ou o frio (Patel & Williamson, 2016). O Manitol regula a pressão osmótica dentro das células fúngicas, garantindo que elas não percam água em ambientes secos ou hipertônicos. Isso é crucial para a sobrevivência dos fungos, especialmente em habitats desafiadores, como desertos, solos salinos ou superfícies de plantas (Meena et al., 2015). Além disso, o Manitol também pode ter outras funções nos fungos, como proteger as enzimas da desnaturação, atuar como antioxidante, regular o pH celular e participar de vias metabólicas (Meena et al., 2015; Solomon et al., 2007).

Inositol: Outro poliol comum em fungos e desempenha um papel importante no metabolismo do fósforo (Michell, 2008; Reynolds, 2009). Os fungos podem utilizar o Inositol como fonte de fósforo, o que é vantajoso em ambientes onde esse elemento é escasso ou limitante. Para isso, os fungos possuem enzimas que podem quebrar o Inositol, liberando fósforo e glicose (Li et al., 2016; Saiardi et al., 2018). O fósforo é utilizado pelos fungos para a síntese de moléculas importantes, como os fosfolipídios, o ATP e os ácidos nucleicos. Além disso, o Inositol está envolvido na regulação do crescimento celular e na diferenciação em fungos, tornando-o um composto chave para a biologia fúngica. O Inositol é um precursor de vários fosfoinositídeos, que são lipídios que atuam como mensageiros intracelulares e modulam diversas vias de sinalização (Michell, 2008). Essas vias regulam processos como a divisão celular, a morfogênese, a resposta ao estresse e a patogenicidade dos fungos.

Sorbitol: Este é utilizado como umectante e funciona como um regulador osmótico do protoplasma do fungo (Mani-López et al., 2021). Além disso, o sorbitol também pode ser utilizado como uma fonte de carbono para o crescimento fúngico, pois ele pode ser convertido em frutose e glicose por meio de enzimas específicas (Rice et al., 2020).

Arabitol: Este é um dos polióis mais comuns encontrados em fungos (Jennings, 1985; Rice et al., 2020), sendo produzido a partir da redução da ribulose ou da arabinose (Huang et al., 2022; Rice et al., 2020).

Xylitol: O Xylitol é um poliol interessante que pode ser encontrado em alguns fungos que decompõem a lignina, uma substância presente na madeira (Ur-Rehman et al., 2015). Este poliol atua como uma fonte de energia para esses fungos, permitindo que eles decomponham materiais lignocelulósicos de difícil digestão (Ur-Rehman et al., 2015). O xylitol pode ser obtido por meio da bioconversão de xilose em xilitol por leveduras (Jennings, 1985; Ur-Rehman et al., 2015). A xilose é um açúcar presente na hemicelulose, um componente da parede celular das plantas (Ur-Rehman et al., 2015).

Metodologia

Análise de polióis: Foram coletadas porções do jardim de fungo com exsudatos foram lavados em 5 ml de acetato de amônio 0,1 M (Somera et al., 2015) à temperatura ambiente com agitador vórtex durante um minuto. Após centrifugação (8000 rpm por 20 minutos), o sobrenadante foi filtrado (membrana Polietersulfona, Kasvi® de 0,22) μm e o filtrado foi liofilizado e armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os monossacarídeos e polióis presentes em cada extrato foram determinados por meio de análises cromatográfica líquida. Foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) Shimadzu Prominence (Shimadzu, Kyoto – Japão) equipado com um detector de índice de refração (RID-10A, Shimadzu) e uma coluna Phenomenex Rezex RPM – Monosaccharide Pb+2 (8%) (Phenomenex, Torrance, CA – EUA). As condições de análise foram as seguintes: temperatura da coluna a $85\text{ }^{\circ}\text{C}$, volume de injeção de $5\text{ }\mu\text{L}$ em uma fase móvel isocrática (0,4 mL.min⁻¹) de água. Para identificar os compostos-alvo e suas concentrações, foram preparadas curvas padrão de arabitol, inositol, manitol, sorbitol e xilitol da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO – EUA). Uma análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foi realizada para confirmar a presença de monossacarídeos e elucidar compostos com tempos de retenção semelhantes na análise cromatográfica. Foi utilizado um instrumento Bruker (Billerica, MA – EUA) DRX-400 operando a 400 MHz. O RMN ¹H foi realizado com as amostras dissolvidas em água. Ao total mais de 200 colônias de attinas foram coletadas (Tabela 1A). A maioria não possuía quantidade de jardim de fungos necessária para extração dos polióis e então algumas formigas dessas colônias foram coletadas e armazenadas em RNALater ou DNA/RNASHield para posterior análise das expressões dos genes odoríferos.

Extração de compostos dos jardins de fungos: Extratos dos jardins de fungo de *Acromyrmex lundii*, *Atta sexdens* e *Mycocepurus goeldii*. foram obtidos com acetato de amônio (0,5 mol/L), com o mesmo procedimento utilizado para a análise de polióis. Resumidamente, o jardim foi agitado gentilmente em vórtex por 1 min, centrifugado (20 minutos a 8000 rpm). Para outros experimentos a quantidade de acetato de amônio foi ajustada de maneira que o volume do composto sempre fosse maior que a quantidade do fungo extraído, deixando o fungo sempre submerso no composto para total liberação dos compostos solúveis.

Para entender como a concentração de manitol variou entre os fungos cultivados pelas espécies de formigas (*Acromyrmex lundii*, *Atta sexdens* e *Mycocepurus goeldii*), nós utilizamos a porcentagem de área do pico da cromatografia do HPLC correspondente ao manitol relativa à soma total das áreas de todos os picos. O manitol foi escolhido como composto chave pois o composto desempenha diversas funções e pode ser usado como um composto com forte potencial biotecnológico. As funções até agora conhecidas e desempenhadas pelo manitol como composto de alto valor biotecnológico são: eliminar excesso de fluidos do corpo, tratamento de doenças dos rins, prevenção de falhas renais (após cirurgias), tratamento de inchaço do cérebro e diminuição da pressão globo ocular (glaucoma) (Chen et al., 2020; Solomon et al., 2007).

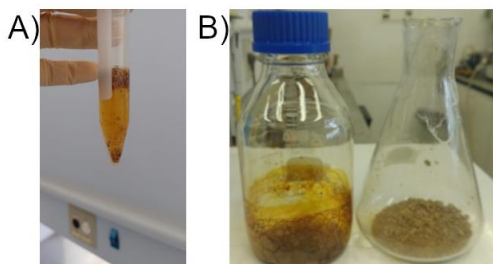


Figura 3. Extrato de polióis com acetato de amônio (0,1 mol/L). A) jardim de fungo de *Mycocepurus goeldii* inserido na solução. Pequenas quantidades (aproximadamente 0,5 g) eram inseridas em 5 ml de solução. B) Extração do jardim de fungo de *Acromyrmex subterraneus*. À esquerda a quantidade de solutos extraídos de 10 g de jardim de fungo, de aproximadamente 3,5 g de solutos extraídos após a liofilização do extrato. Em contraste, à direita, o jardim de fungo liofilizado (aproximadamente 2,9 g de jardim de fungo). Esses “aproximadamente” não vão complicar as comparações quantitativas?

Atratividade: Uma arena experimental foi montada em uma bandeja forrada com papel filtro (Figura 1) (Billen et al., 1992; Richard et al., 2004). As formigas foram retiradas das colônias e acondicionadas em um pote plástico por 10 minutos, para reduzir o stress da manipulação (Assis et al., 2021). A seguir, cada formiga foi individual e gentilmente colocada sobre o ponto de início da trilha e observada por 10 minutos. Para as trilhas foram utilizadas 15 formigas por composto analisado e 200 μ L do extrato do fungo ou das soluções de polióis foram utilizados para montar as trilhas (Ponto A até B e Ponto B até C). Os pontos A, B e C receberam 50 μ L cada. Os compostos analisados foram: extrato de jardim de fungo (cada espécie de formigas teve seu extrato feito com o seu fungo simbionte, da sua colônia respectivamente); polióis (Fig. 1). Não houve teste estatístico porque as formigas ignoraram as trilhas, mas apenas andaram aleatoriamente ou se limpavam.

Polióis como fonte nutricional para as formigas: Os compostos foram oferecidos simultaneamente e *ad libitum* para as formigas, a três distâncias da entrada do ninho: 10 (perto), 12 (intermediário) ou 15 cm (longe). Foram utilizadas 20 colônias de *Atta sexdens* com duas repetições para cada colônia e placas de cultivo de células de 24 poços, cada poço sendo preenchido com 2 mL de um determinado polioli ou de glicose, todos a 0,1 ou 1,0 mol/L. As posições dos diferentes compostos variaram aleatoriamente em cada réplica experimental. Como controle, foi também ofertada água ultrapura (utilizada para diluição dos polióis) ou água de torneira. Após 24 h, o volume restante em cada poço foi coletado com uma pipeta e determinado com o auxílio de uma proveta com graduação de 0,1 mL. Após 24 horas, o número de formigas vivas ou mortas em cada poço foi anotado.

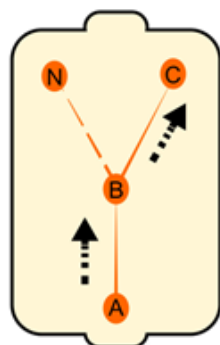


Figura 4. Diagrama esquemático da arena de teste de escolhas em trilha. Linhas cheias significam a trilha contínua e linha tracejada a ausência de trilha; A: local de adição das formigas; B: encruzilhada; N: nenhum composto adicionado; C: adição do composto teste (50 μ L de extratos de jardins de fungos; manitol, arabitol, inositol ou sorbitol 1 mol/L). A distância entre os pontos foi de 15 cm, os halos formados pelos pontos de concentração, entretanto não foram medidos (tanto em diâmetro quanto em circunferência).

Estatística: Foi realizada no ambiente R software versão 4.3.0 (2023-04-21 ucr). A distribuição do erro foi analisada com a função *descdist* do pacote *fitdistrplus* (versão 1.1) e as quantidades consumidas de compostos se ajustaram à distribuição beta (contínua) de erros. As quantidades consumidas foram transformadas em proporções de zero a 1 e foi aplicado um modelo considerando o consumo como resposta e o tipo e a concentração de composto como explicativas. Para a quantidade de formigas visitando um poço (resposta) foi utilizado o modelo de distribuição 'poisson' zero inflated, uma vez que muitos poços não apresentaram visitas. As quantidades foram também transformadas em proporções e o modelo foi testado pela função *fitdistrplus* (versão 1.1). Para ambas as análises foram utilizados modelos mistos, nos quais as colônias foram consideradas como variável aleatória. Para analisar a diferença entre a preferência dos compostos na distância que foram alocados, foi utilizado um modelo linear onde as variáveis explicativas foram uma concatenação de concentração, composto e distância. O modelo gerado foi analisado via critério de seleção de AIC e resíduos, e as médias anotadas foram as marginais estimadas (EMMs). Ao final da análise, foi realizado o contraste entre os resultados de cada composto, posição e consumo. Para analisar se a distância do recurso influencia no consumo e quantidade de formigas nos poços, nós isolamos as variáveis consumo e quantidade formigas, não discriminando os compostos. Com isso conseguimos visualizar as diferenças entre as distâncias. Um modelo linear foi criado onde foram relacionados à distância e quantidade de formigas, e distância e consumo. Para o teste 'pairwise' utilizamos a correção de 'fdr' pela robustez.

Crescimento de fungos em polióis: O fungo mutualista das cortadeiras, *Leucogaricus gongylophorus*, e os fungos parasitas/oportunistas destas formigas, *Escovopsis* sp.,

Syncephalastrum sp., *Trychoderma* sp. e *Cladosporium* sp. foram obtidos a partir da coleção do Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos (LESF), da Unesp, em Rio Claro. Cada fungo foi inoculado em placas com meio sólido (ágar) acrescidas de polióis, celulose ou um extrato diretamente do fungo de uma colônia com a mesma espécie. Os substratos utilizados foram: extrato de jardim de fungos – coletado diretamente da parte periférica do jardim, onde ocorre a maior produção de polióis (Somera et al. 2015) - (2,6 gramas de extrato liofilizado, obtido a partir de 10 g de jardim de fungo) ou 0,5 mol/ de manitol, sorbitol, Inositol e xylitol, glicose ou celulose. Como controle utilizamos apenas ágar (1,5%) para o crescimento dos fungos conforme protocolo estabelecido pelo Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos (LESF). As culturas foram mantidas por 12 dias a 25° C e, após este período, as placas foram fotografadas e o crescimento fúngico foi mensurado por meio do diâmetro ocupado pelas hifas nas placas (a amplitude variando de 0, quando não houve crescimento a 8 cm, totalizando o diâmetro total da placa de Petri). Todos os experimentos foram feitos em tréplicas os fungos utilizados estão sendo mantidos no Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos (LESF) na universidade estadual Paulista no campus Rio Claro. Os mesmos fungos que foram utilizados serão a *posteriori* tratados para crescimento em solução líquida de YNB (Yeast Nitrogen Base) para extração das hifas e análises transcriptômica.

Estatística: Para o crescimento dos fungos oportunistas/parasitas em polióis ou extrato do jardim de fungo, foi utilizado um modelo linear, onde o tamanho do halo de crescimento (de 0 a 8 cm) do fungo foi a variável resposta e o composto foi a variável explicativa. Após a análise, foi realizado um teste de contraste da análise, utilizado um fator de correção de Tukey para os contrastes. Também foi feito um teste de médias marginais estimadas (EMMs), com o pacote *emmeans* (versão 1.8.6) (Searle et al., 1980). Este último teste foi feito para corroborar o modelo e mostrar possíveis tendência dos dados.

Análise das rotas metabólicas para produção de polióis nos fungos mutualistas: Para análise das rotas metabólicas dos fungos, utilizamos transcriptomas de *Leocoagaricus gongylophorus*, fungo mutualista de neoattinas (gêneros *Atta*, *Acromyrmex* e *Mycetomollerius*) e um fungo cultivado por uma paleoattina, *Mycocepurus goeldii*. Os transcritos utilizados foram obtidos por Kakazu S, Ferro M. e Bacci, M. via cultivo em meio líquido (YNB) e amido como fonte de carbono, o que induziu a produção de polissacaridases. As sequências de transcritos foram inicialmente avaliadas quanto à qualidade usando o software FASTQC, que oferece análises estatísticas abrangentes para identificar tanto a qualidade quanto a presença de sequências super-representadas. Posteriormente, as sequências de alta qualidade foram montadas com o software Trinity, amplamente reconhecido para montagem de transcriptomas. Para otimizar o processo de montagem, foi empregada a técnica de normalização digital, reduzindo a redundância das sequências e garantindo eficiência na montagem dos transcritos. Além disso, para minimizar ainda mais a redundância das sequências geradas pelo software Trinity, utilizou-se o software CD-HIT-EST, que agrupa as sequências com base em sua identidade, aplicando um limite de 90%. Com os dados de transcritos obtidos, as buscas foram focadas em palavras-chaves relativas às enzimas relacionadas às rotas metabólicas de produção dos polióis, que foram feitas manualmente, nas listas de genes dos transcritos das duas espécies de fungos. Para saber quais enzimas são responsáveis pela produção dos polióis, foi feita uma busca na literatura sobre rotas metabólicas dos polióis (Tabela 1 e bibliografia). As rotas encontradas foram então estudadas para ver a viabilidade de produção pelos fungos, observando os quesitos: 1) é rota de alguma espécie de fungo?; 2) utiliza amido, celulose ou hemicelulose para início da metabolização. Ao final da busca na literatura encontramos rotas para os polióis encontrados nos fungos mutualistas de formigas cultivadoras.

Tabela1. Literatura estudada para identificação das enzimas responsáveis pela produção dos polióis pelos fungos.

Inositol	Fujisawa, T., Fujinaga, S., & Atomi, H. (2017). <i>An in vitro enzyme system for the production of myo-inositol from starch</i> . Applied and environmental microbiology, 83(16), e00550-17.
Sorbitol	Rice, T., Zannini, E., K. Arendt, E., & Coffey, A. (2020). <i>A review of polyols–biotechnological production, food applications, regulation, labeling and health effects</i> . Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 60(12), 2034-2051.
Arabitol	Huang, Jiaqi, Yingfeng An, Hossain M. Zayed, Yuvaraj Ravikumar, Mei Zhao, Junhua Yun, Guoyan Zhang, Yufei Zhang, Xiaolan Li, and Xianghui Qi. (2022). <i>Enhanced biosynthesis of D-arabitol by Metschnikowia Reukaufii through optimizing medium composition and fermentation conditions</i> . Applied Biochemistry and Biotechnology 194, no. 7: 3119-3135.
Manitol	Meena, M., Prasad, V., Zehra, A., Gupta, V. K., & Upadhyay, R. S. (2015). <i>Mannitol metabolism during pathogenic fungal–host interactions under stressed conditions</i> . Frontiers in Microbiology, 6, 1019.
Xylitol	Umai, D., Kayalvizhi, R., Kumar, V., & Jacob, S. (2022). <i>Xylitol: Bioproduction and applications-A review</i> . Frontiers in Sustainability, 3, 826190.

Selecionamos esses cinco polióis porque encontramos seus genes nos transcritos dos fungos, exceto para o arabitol. Entretanto, incluímos o arabitol, descrito por Somera e colaboradores (2015) como um dos principais polióis nas amostras de *Atta bisphaerica*.

Análise dos genes ORCO's nas formigas: Os genes odoríficos desempenham um papel fundamental na vida das formigas, uma vez que esses insetos sociais altamente organizados dependem fortemente da comunicação química para coordenar suas atividades dentro da colônia (Holman et al., 2019). A importância do conjunto de genes odoríficos nas formigas é notável, uma vez que esses genes codificam os receptores de odor que permitem que as formigas percebam e respondam a uma miríade de substâncias químicas em seu ambiente (Blomquist & Bagnères, 2010). Este sistema de genes odoríficos é complexo e altamente diversificado, refletindo a necessidade de detectar uma ampla gama de odores que são vitais para a sobrevivência da colônia (Yan et al. 2020). Os genes odoríficos funcionam da seguinte maneira: quando uma formiga entra em contato com uma substância química, como um feromônio de trilha deixado por um membro da colônia, seus receptores de odor, codificados por esses genes, reconhecem a substância química específica. A ativação desses receptores desencadeia uma resposta comportamental apropriada, seja seguindo a trilha de feromônio em busca de alimento, defendendo o ninho ou identificando a presença de intrusos (Yan et al. 2017). Além disso, os genes odoríficos desempenham um papel crucial na identificação de membros da colônia e na diferenciação entre formigas de colônias estranhas, evitando conflitos e promovendo a cooperação entre indivíduos aparentados (Yan et al. 2020). Para entender se a evolução dos genes ORCO, e se este gene pode estar relacionado com a identificação e possível sinalização dos fungos através dos polióis, foi feita uma análise evolutiva do gene em algumas espécies de attíneas. Como toda a informação de identificação química passa pelos genes ORCO (Wicher & Miazzi, 2021), entender a evolução deste é de suma importância para o entendimento do ‘universo’ químico dentro da colônia. Para a busca dos genes odoríferos, foram utilizados transcriptomas de cinco espécies de formigas cultivadoras de fungos de Neoattines (Attini: Formicidae) - *Atta sexdens* e *Atta robusta*; *Acromyrmex heyeri* e *Acromyrmex balzani*; e *Trachymyrmex fuscus* (*Mycetomollarius fuscus*, em recente mudança). Os transcriptomas foram sequenciados por Bacci e colaboradores e estão na ‘biblioteca’ do Laboratório de Evolução Molecular (LEM – UNESP Rio Claro). As sequências foram alinhadas usando o algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004). Após o alinhamento as sequências foram testadas para o modelo de evolução do gene ORCO, e análises comparativas foram realizadas para entender a dinâmica deste gene no grupo de Attinas, ao final foi construída uma árvore filogenética com 999 permutações e utilizando apenas o gene ORCO. Todas as análises foram realizadas no software MEGA X (Kumar et al., 2018).

Resultados e Discussão

Identificação de polióis:

A análise de HPLC (Figura 5) mostrou 9 picos. Porém, os polióis utilizados como compostos padrões (inositol, sorbitol, arabitol, xylitol, manitol) não corresponderam aos tempos de retenção dos picos encontrados nas amostras. Apenas o tempo de retenção de arabitol e de manitol, que eluíram juntos, foi coincidente com o pico 9 dos extratos. Esta ocorrência e o fato de o cromatógrafo líquido utilizado não estar acoplado a um espectômetro de massas dificultaram a determinação da identidade dos picos. Além disso, a coluna utilizada não se ajustava para a operação em cromatógrafos adicionais e três outros laboratórios com cromatógrafos mais modernos não puderam estabelecer parceria ou prestação de serviços, devido à indisponibilidade do equipamento.

A despeito da identificação incompleta, foi possível caracterizar uma impressão digital cromatográfica particular para cada uma das espécies de formigas analisadas (Figura 5): picos 1,2,3,5,6,7,8,9 para *Atta sexdens*; 1,2,4,7,9 para *Acromyrmex lundii*; 2,6,9 para *Mycocepurus goeldii*. Assim, a diversidade de metabólitos secretados nos jardins de fungos aumentou com a evolução das formigas. Os picos 2, 7 e 9 estiveram presentes nos jardins de fungos das três espécies de formigas; o pico 1 somente nos jardins das duas espécies de formigas cortadeiras; os picos 3 e 5 foram exclusivos de *Atta sexdens*; e o pico 4 foi exclusivo de *Acromyrmex lundii*. Esses resultados indicam especializações metabólicas características de cada espécie de formiga cortadeira e, como não houve pico exclusivo na attina basal *M. goeldii*, indicam a condição primitiva é menos especializada.

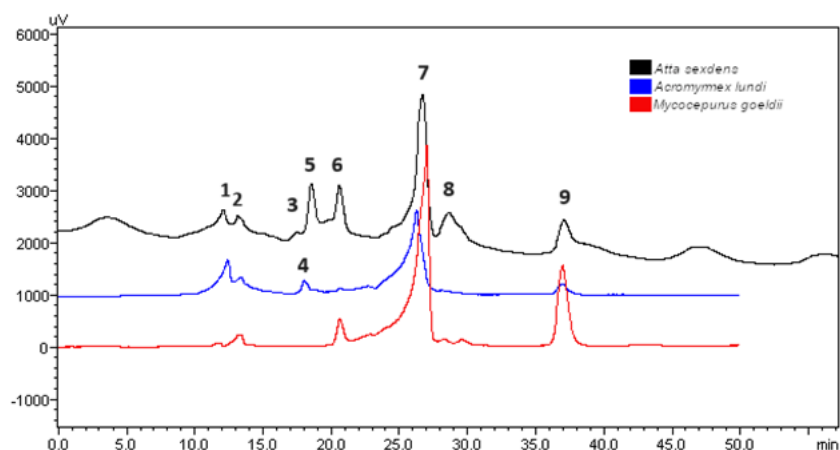


Figura 5. Cromatograma de extratos de jardins de três colônias de espécies diferentes de formiga. *Atta sexdens* e *Acromyrmex lundii* cultivam a mesma espécie de fungo (*Leucoagaricus gongylophorus*), e *Mycocepurus goeldii* cultiva uma espécie distinta e ainda não caracterizada taxonomicamente. Os tempos de retenção dos picos não identificados foram: 11,580 min; 12,144 min; 17,387 min; 18,063 min; 20,609 min; 26,196 min; 26,695 min; 28,627 min; e manitol/arabitol = 37,030 min. Os tempos de retenção dos compostos padrões foram: Inositol = 29.522 min; manitol/arabitol = 36.977 min; xylitol = 45.185 min; sorbitol = 49.028 min.

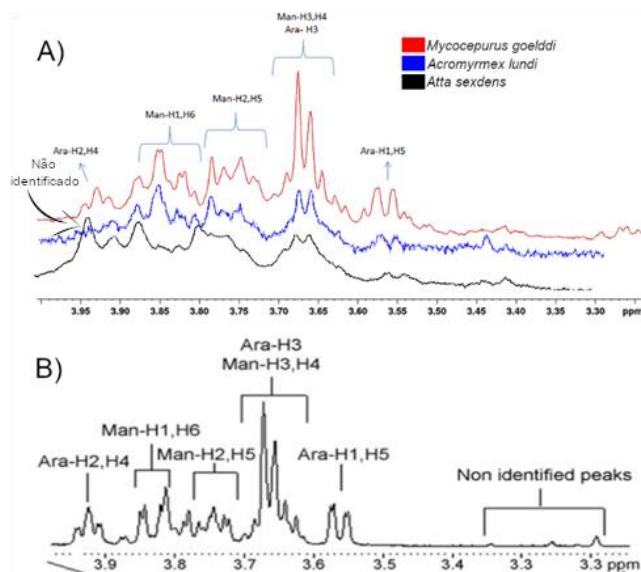


Figura 6: A) Espectro de RMN de ^1H obtido da fração de jardins de fungos de *Mycocepurus goeldii*, *Acromyrmex lundii* e *Atta sexdens* em D_2O ; B) Espectro de RMN ^1H de amostra de líquen obtido em D_2O , por Alcantara et al., 2007.

Na análise de RMN, entre os cinco polióis de interesse, foram examinadas apenas as regiões correspondentes ao arabitól e manitol, devido à predominância na produção destes compostos no jardim de fungo (Somera *et. al.*, 2015) e à disponibilidade de dados específicos para essas duas substâncias. Essa abordagem nos permite obter informações mais detalhadas e significativas sobre esses polióis específicos. Embora nosso foco tenha sido prioritariamente o poliól manitol, o arabitól elui em um tempo de retenção muito próximo, o que possibilitou a identificação do composto juntamente com o manitol.

A análise de RMN de jardins de fungos resultou em espectros distintos para as três espécies de formigas (Figura 6A). Comparando com os espectros de Alcantara (2007) (Figura 6B), foi possível verificar que o jardim de fungo de *Atta sexdens* apresenta manitol em sua composição, com sinal (e, portanto, porcentagem) menor do que o observado no jardim de *Acromyrmex lundii* e este menor do que no jardim de *M. goeldii*. Portanto, a evolução das formigas foi acompanhada da diminuição da porcentagem de manitol nos jardins de fungos.

Chama a atenção a grande diferença na porcentagem de manitol nos jardins de *Atta* e de *Acromyrmex*, pois ambas as formigas são cortadeiras de folhas e ambas cultivam a mesma espécie de fungo, *Leucoagaricus gongylophorus*. Adicionalmente, o jardim de *Atta sexdens* apresentou um sinal não identificado que não foi observado nas outras duas espécies. Este sinal não é característico de inositol, sorbitol, arabitól ou xylitol.

Estes dados, e a presença de picos nos cromatogramas dos jardins de *Atta* que não estão presentes nos jardins de *Acromyrmex*, vão ao encontro à nossa prévia proposta (Somera et al., 2015) da presença de outros parceiros microbianos além de *L. gongylophorus* atuando na produção de polióis nos jardins de fungos.

Entretanto, não foi possível quantificar as amostras a partir da integralização dos sinais, pois na região onde estão os sinais do manitol há a presença de mais sinais (em menor proporção) provavelmente de algum poliól que pode estar na amostra em menor quantidade. Com essa interferência nos sinais do manitol, não é possível integrá-los de forma precisa a garantir uma quantificação confiável.

Identificação de vias metabólicas de síntese de polióis

Foram analisadas as vias de síntese dos polióis inositol, sorbitol, arabitól, manitol e xylitol, em dois fungos cultivados por formigas distintos: *Leucoagaricus gongylophorus*, que é mutualista das formigas cortadeiras (derivadas), e o fungo mutualista *Mycocepurus goeldii* (primitiva). Os

transcriptomas desses fungos estavam disponíveis em nosso laboratório, permitindo uma análise das enzimas envolvidas nos processos de biossíntese desses importantes compostos.

Para avaliar o potencial de produção de polióis, nós buscamos por rotas metabólicas nos transcriptomas dos fungos mutualistas de *Atta sexdens* (uma formiga cortadeira (derivada), que cultiva o fungo *Leucoagaricus gongylophorus*), e no fungo mutualista de *Mycocepurus goeldii* (uma formiga primitiva) e conseguimos identificar enzimas necessárias para produção dos polióis.

Para a produção de inositol, foram encontradas três enzimas-chave: Glicocinase, Inositol-3-fosfato sintase e Inositol monofosfatase. No caso do sorbitol, as enzimas identificadas foram a Aldose redutase e a Sorbitol desidrogenase. Para a síntese de arabitól, encontramos as enzimas Glucocinase (no fungo de *Mycocepurus goeldii*), hexocinase (em *Leucoagaricus gongylophorus* e no fungo de *Mycocepurus goeldii*) e, para a produção de manitol, foram encontradas as enzimas glucocinase (exclusivamente no fungo de *Mycocepurus goeldii*), hexocinase (presente tanto em *L. gongylophorus* quanto no fungo de *Mycocepurus goeldii*), Phosphoglucose isomerase no fungo de *Mycocepurus goeldii* e Glucose-6-fosfato isomerase em *L. gongylophorus*, Manitol-1-P desidrogenase e Manitol-1-Fosfatase. Por fim, para a síntese de xilitol foram encontradas as enzimas arabitól redutase, Arabitól desidrogenase e xilulose redutase.

Apenas para sorbitol, parece haver uma rota alternativa da presente na literatura, muito provavelmente utilizando frutose como substrato. A rota tradicional do sorbitol, que se utiliza da enzima Aldose Redutase para produção de sorbitol via glicose, não foi encontrada em *Leucoagaricus gongylophorus*, porém a enzima Sorbitol Desidrogenase foi encontrada. Esta enzima se utiliza de sorbitol para produção de frutose. Entretanto, alguns estudos mostram que ela pode catalisar a reação inversa e auxiliar na transformação de frutose em sorbitol (He et al., 2014). Outro dado interessante foi a diferença entre as rotas apresentadas por *L. gongylophorus*, que é o fungo cultivado por uma espécie de Neotattina, e aquela apresentada pelo fungo cultivado por *Mycocepurus goeldii*: ambos apresentaram a rota para produção de manitol, como citado acima, porém a enzima responsável para adição do Fosfato no carbono 6 da glicose foi diferente nos dois grupos. Para o *L. gongylophorus*, encontramos a enzima Hexocinase (Hk) enquanto para o fungo mutualista de *M. goeldii* a responsável foi a Glicocinase (Gk). Hexocinase é uma enzima generalista que incorpora o grupo fosfato no carbono 6 das hexoses (Arora et al., 1991), porém não é específica, diferentemente da glicocinase, que apenas acrescenta o fosfato em glicoses. Nossos resultados mostram que pode ter havido uma pressão evolutiva sobre as neotattinas favorecendo uma maior generalização, uma enzima fosforilando mais de um composto, enquanto para as menos derivadas (paleotattinas) foi mantida a Gk, uma enzima específica para glicose.

Atratividade:

Foi conduzida uma análise da atratividade das formigas *Atta sexdens*, *Acromyrmex subterraneus* e *Mycocepurus goeldii* em relação a diversos polióis de interesse, incluindo inositol, sorbitol, arabitól, manitol e xilitol, bem como o extrato proveniente do jardim de fungo de *Acromyrmex subterraneus*. Todavia, não houve atratividade, pois as formigas de ambas as espécies não seguiram qualquer uma das trilhas. Quando feromônios são utilizados, provocam uma resposta de atração, o que gera nas formigas um gatilho de seguir a trilha deixada pelas companheiras de colônia (Carroll and Janzen, 1973; Sumpter and Beekman, 2003). Os polióis ou os extratos dos jardins de fungos, por outro lado, não devem gerar este gatilho nas formigas. Desta forma, os substratos energéticos produzidos pelo fungo mutualista (Somera et al., 2015) não elicitam atração tal como o fazem os feromônios.

Polióis como fonte nutricional:

Foram analisados os consumos de cada um dos polióis (inositol, sorbitol, arabitól, manitol e xilitol) e de glicose, ambos em diferentes concentrações (1 mol/L e 0,1 mol/L). Como esperado, houve predileção por glicose 1,0 mol/L em relação aos polióis ou glicose 0,1 mol/L ($p < 0.01$) e não houve diferença significativa entre as demais condições experimentais (Fig. 7). Os desvios padrões obtidos foram muito altos (entre 0,778 e 0,455 para glicose 0,1 mol/L e xilitol 0,1 mol/L, respectivamente), mascarando a detecção de eventuais diferenças, mas um teste estatístico menos estrito utilizando um modelo linear generalizado com uma distribuição ‘*quasipoisson*’ para dados

contínuos, indicou o inositol a 1,0 mol/L como o segundo composto mais consumido pelas formigas e visualmente foi detectado um maior número de visitas ao poço contendo este composto (Fig. 7).

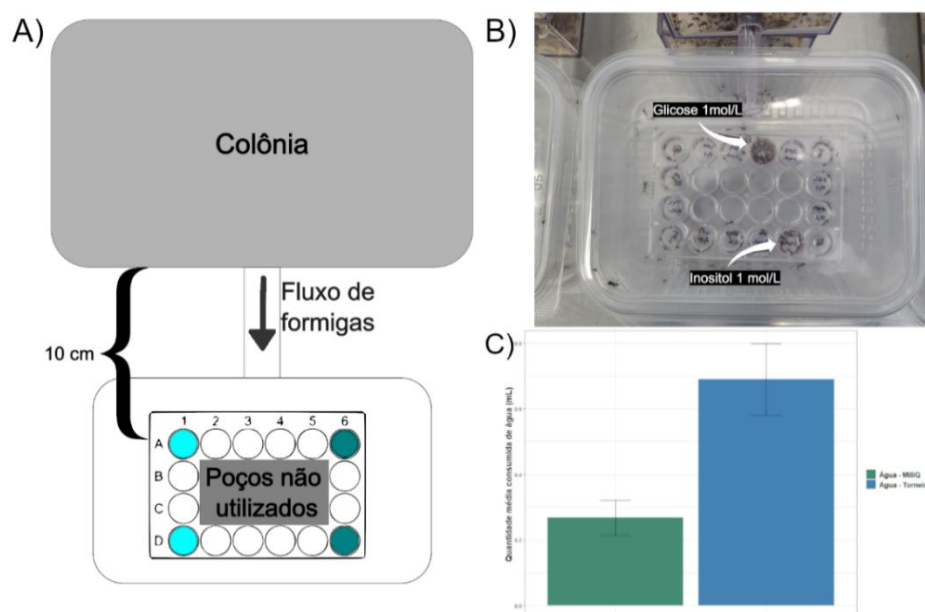


Figura 7. A) Modelo da arena onde foram realizados os testes comportamentais de atratividade por polióis; B) Imagem demonstrando a quantidade e formigas nos poços, os poços com glicose e inositol, ambos a 1 mol/L. C) Escolha da água mais coletada no experimento (em verde água MilliQ®, mesma utilizada para as soluções e em azul, água oriunda da torneira, a qual geralmente é oferecida às colônias, houve uma diferença significativa na escolha da água da torneira ($p < 0,01$).

As distâncias e o consumo foram inicialmente analisados sem categorização dos compostos. Nos poços próximos, houve mais visitas ($p < 0,01$) e mais consumo ($p < 0,01$), mas não houve diferenças entre os poços intermediários ou distantes ($p > 0,05$) (Fig. 8). Nossos dados estão de acordo com a Teoria do Forrageamento Ótimo (TFO) (Pianka & MacArthur, 1966) onde diz que espécies tendem a maximizar a energia obtida dos recursos pelo tempo gasto. Compostos próximos à entrada da colônia foram mais consumidos, corroborando o modelo da TFO. Muito provavelmente as forrageiras consumiam os recursos próximos com alto valor (exemplo glicose), enquanto outras saíam em busca de outros recursos.

O trade-off entre qualidade do recurso e distância é muito estudado (revisado por Carroll & Janzen, 1973). Por exemplo, *Atta cephalotes* pode aumentar a distância de forrageio se os recursos próximos a colônia forem 'pobres' (Rockwood, & Hubbell, 1987). Isso corrobora nossos dados quando analisamos os polióis e a glicose. Nossos dados mostram que a glicose é um composto de alto valor para as formigas cultivadoras de fungos. Silva e colaboradores (2003) mostram que a glicose aumenta a sobrevivência das operárias, e quando em altas concentrações a sobrevivência também tende a aumentar. A média de concentração de glicose que os autores encontraram no jardim de fungos foi de 27,7 mg/g de fungo, enquanto nossa menor concentração foi de 0,1 mol/L (ou seja, nossos poços continham aproximadamente 36 mg de glicose na menor concentração), muito similar ao encontrado por Silva e coautores. Nossos dados mostram que mesmo a glicose mais distante da entrada da colônia ainda é um recurso que vale o trade-off entre

distância e qualidade do recurso.

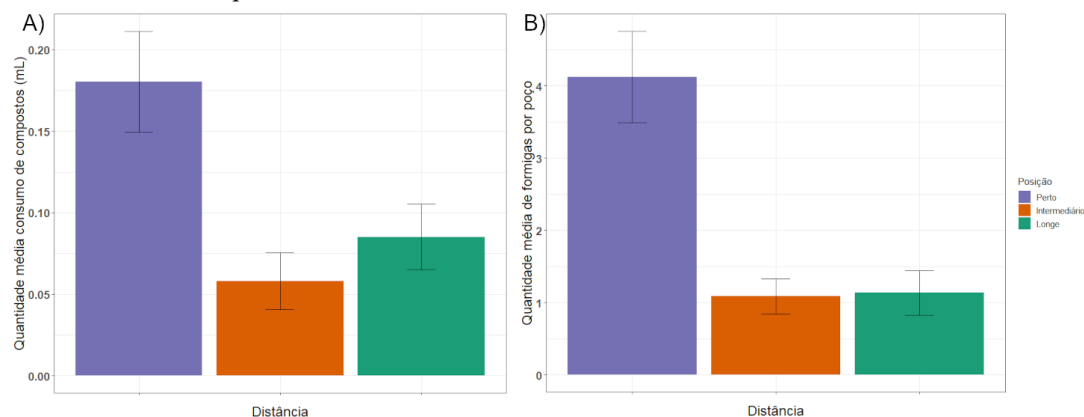


Figura 8. Quantidade de compostos consumidos (A) e de formigas (B) após 24 h nos poços em diferentes distâncias a entrada dos ninhos. Barras de erro são representadas pelo erro padrão. Há uma diferença significativa entre os poços próximos, e os demais, porém, não houve diferença significativa para os poços intermediários e distantes.

Soluções a 1 mol/L quando adicionadas próximas à entrada das colônias, a solução de glicose foi mais consumida do que todos os polióis. Adicionalmente, inositol foi mais consumido que os demais polióis, exceto xilitol e não houve diferença significativa entre os consumos de arabitol, manitol, sorbitol ou xilitol (Fig. 9). As análises com distâncias longas ou com soluções 0,1 mol/L foram menos informativas para diferenciar o consumo desses substratos (Fig. 10). O maior consumo de glicose está de acordo com a destacada importância deste nutriente para a sobrevivência das formigas (Silva et al., 2003).

Apesar de consumirem mais glicose, as formigas visitaram igualmente os poços contendo glicose e os demais polióis, exceto arabitol, quando esses compostos estavam próximos à entrada dos ninhos e a 1 mol/L (Fig. 10). Em menor concentração, 0,1 mol/L, os poços com xilitol e manitol foram menos visitados do que os poços com os demais compostos (Fig. 10). As análises em médias ou longas distâncias foram menos informativas para diferenciar o consumo desses substratos (Fig. 10).

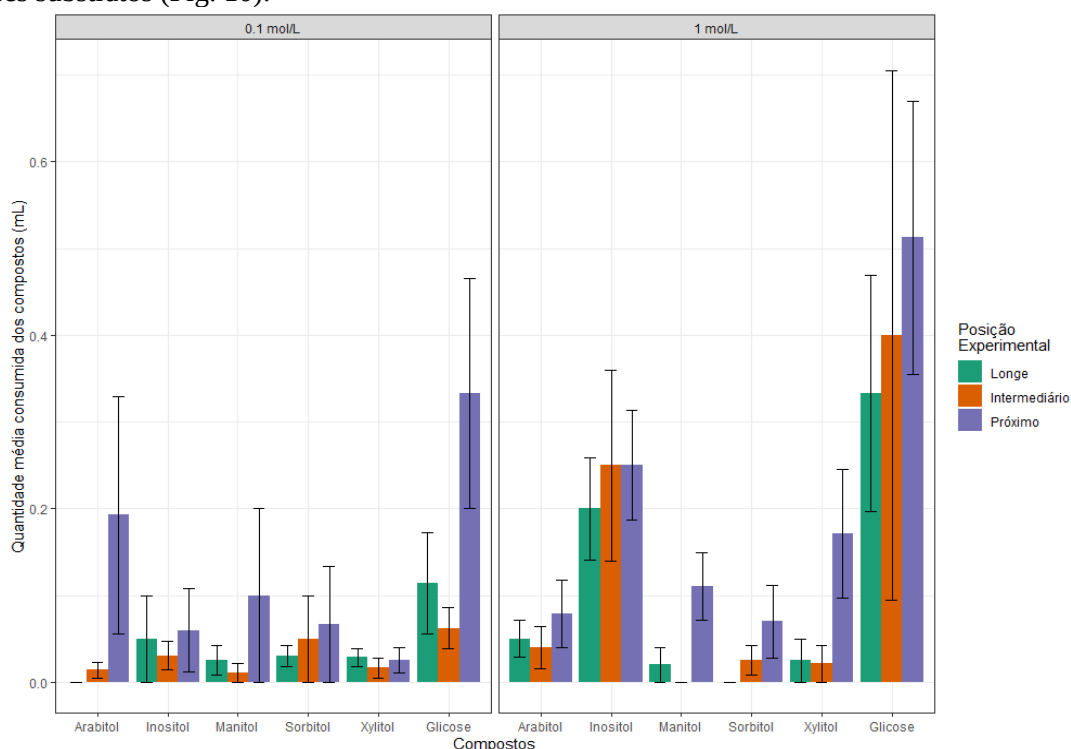


Figura 9. Quantidade consumida de compostos adicionados a diferentes distâncias da entrada da colônia. Barras indicam erro padrão e barras sobrepostas indicam ausência de diferença ($p > 0,05$).

Para a glicose em altas concentrações, houve problemas para quantificação, uma vez que em muitos poços, a solução já tinha sido totalmente consumida, não havendo formigas nestes poços ($n = 3$, um poço perto, outro intermediário e outro longe). Muito provavelmente, após a coleta da glicose, caso alguma formiga tivesse morrido no poço, ela tenha sido removida para o lixo da colônia, uma vez que é um comportamento higiênico das formigas retirar carcaças próximas a fontes de alimento (Pereira et al., 2020).

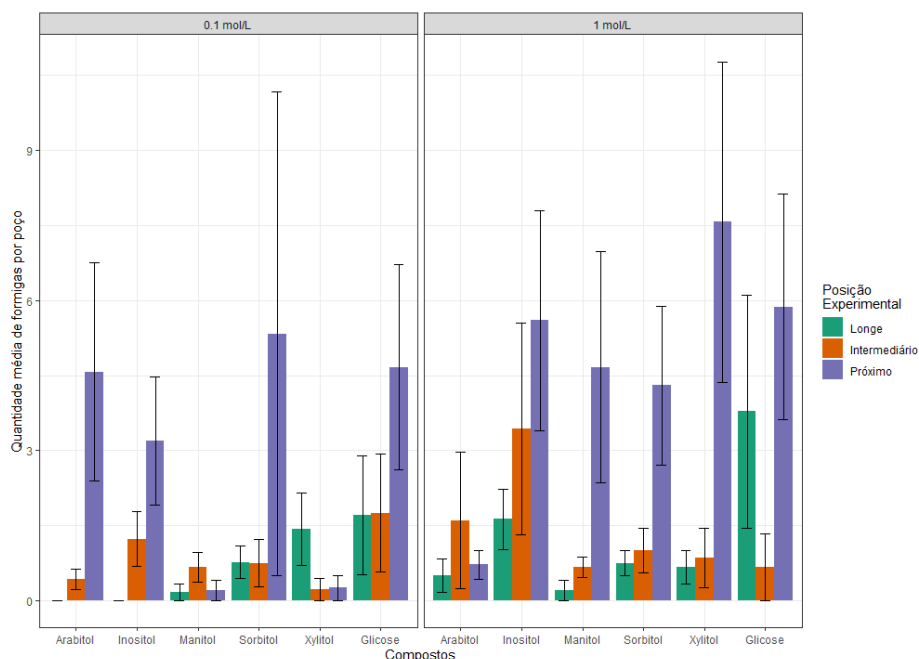


Figura 10. Quantidade de formigas nos poços a diferentes distâncias e contendo diferentes compostos a 1 ou 0,1 mol/L.

Crescimento de fungos em polióis:

Dos cinco polióis de interesse foi analisado o crescimento fúngico nos polióis manitol, sorbitol e inositol. Essa seleção baseou-se na presença de seus genes associados nos transcriptomas do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* e em análises conduzidas por Somera e colaboradores (2015), onde houve congruência apenas nestes três polióis. Além disso, utilizamos extratos do jardim de fungo de *Acromyrmex subterraneus*, bem como celulose e glicose como controles, a fim de investigar a capacidade de fungos parasitas/oportunistas de metabolizar esses substratos diretamente, sem a intervenção do fungo mutualista das formigas-cortadeiras (*L. gongylophorus*).

O diâmetro de crescimento das hifas variou de 0 a 8 cm. O fungo *Syncephalastrum* sp. foi o que mais cresceu em todos os compostos, desde 2,2 cm em celulose até 8 cm em manitol. *Escovopsis* sp. não cresceu em celulose, mas alcançou 8 cm em manitol (Fig 11).

O parasita *Syncephalastrum* sp. (Barcoto et al., 2017) cresceu no extrato de jardim do hospedeiro *L. gongylophorus* ($\bar{x} = 5,13$ cm), indicando utilização de produtos do hospedeiro. O parasita cresceu em celulose ($\bar{x} = 2,9$ cm), glicose ($\bar{x} = 7,5$ cm) e manitol ($\bar{x} = 8,0$ cm), indicando também competição com *L. gongylophorus* e com as formigas por estes nutrientes. Manitol é um composto descrito como relevante para diversos aspectos da vida do fungo, como reserva de carbonos, proteção contra o estresse osmótico e oxidativo, útil na esporulação, na regulação de coenzimas e no armazenamento de energia redutora (Meena et al., 2015; Patel & Williamson, 2016).

Escovopsis sp. cresceu pouco no extrato do jardim de *L. gongylophorus* ($\bar{x} = 0,67$ cm), em celulose (zero) ou em glicose ($\bar{x} = 0,77$ cm), indicando pouca ou nenhuma competição por estes substratos. Entretanto, cresceu bem em manitol ($\bar{x} = 6,83$ cm).

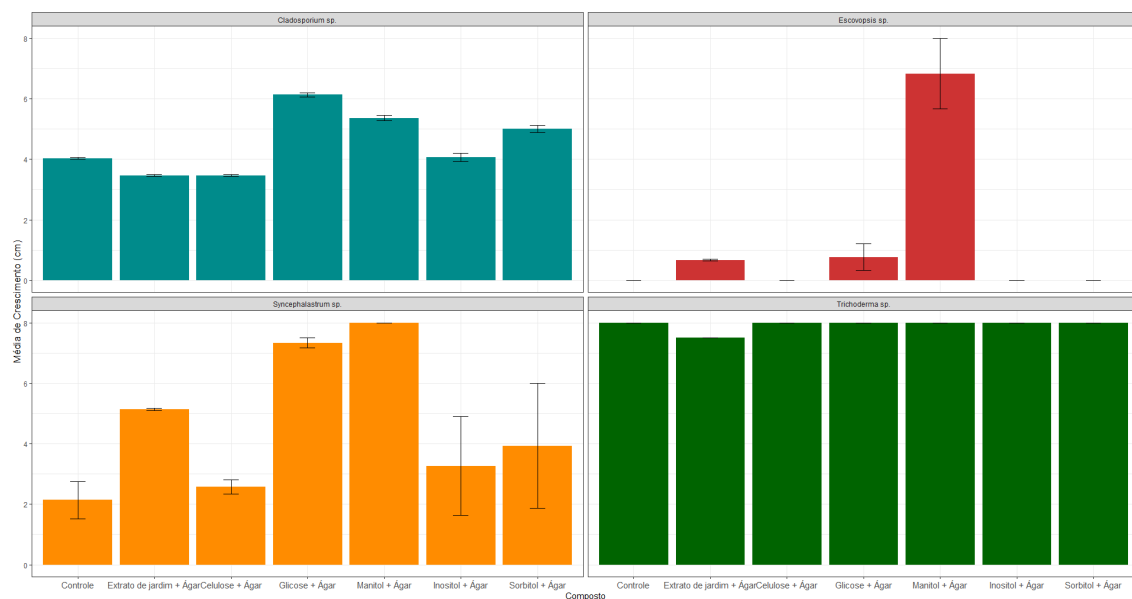


Figura 11. Crescimento dos fungos parasitas/oportunistas em diferentes compostos. As cores representam diferentes fungos parasitas/oportunistas.

Houve diferença no crescimento das espécies de fungos ($p = 0,002$). A espécie *Trychoderma sp.* foi a que mais cresceu em todos os substratos. Quando inoculada sobre os polióis, ela teve crescimento total na placa, o que mostra que utiliza destes polióis como fonte de carbono para o crescimento. O fungo *Syncephalastrum sp.* teve um total crescimento quando inoculado em manitol e demonstrou uma ótima esporulação. Este resultado mostra que *Syncephalastrum sp.* é um potencial competidor com as demais espécies testadas quanto ao manitol. Nossos resultados mostram que o manitol é importante para esporulação deste e de outros fungos. Em contrapartida, *Escovopsis sp.* não cresceu em celulose, sorbitol e nem no controle (apenas ágar 1,5%), isso pode representar um erro metodológico (que está sendo testado), ou que o controle não teria fonte de carbono suficiente e utilizável pelo fungo. Para sanar tal questionamento, outra leva de testes está sendo feita utilizando outra cepa. *Escovopsis sp.* cresceu mais em manitol ($p < 0,005$), e mostrou uma ótima esporulação. *Cladosporium* apresentou crescimento mediano em quase todos os polióis testados (variação de crescimento de 4 cm a 6,5 cm), e houve pouca esporulação (Figura 12).

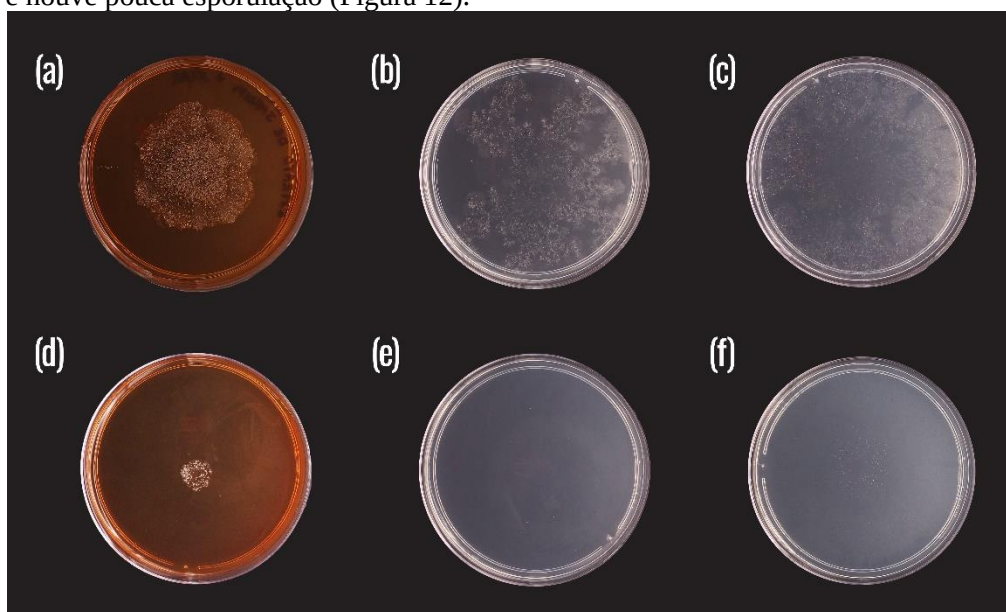


Figura 12. Imagem do crescimento dos fungos *Syncephalastrum sp.* (a-c), e *Escovopsis sp.* (d-f). As imagens a e d representam o crescimento dos fungos no extrato extraído do fungo mutualista de

Acromyrmex subterraneus; as imagens b e e são do crescimento dos fungos em glicose a 0,5 mol/L; e finalmente c e f representa o crescimento do fungo no manitol (0,5 mol/L).

Durante o experimento foram observadas esporulações dos fungos parasitas/oportunistas, sendo a esporulação mais proeminente em *Syncephalastrum* sp (Tabela 2).

Tabela 2. Esporulação dos fungos inoculados em diferentes tipos de compostos. -: sem esporulação. A análise qualitativa foi feita visualmente, ao observar a homogeneidade e quantidade de esporos formados.

ESPÉCIE DE FUNGO	COMPOSTOS	ESPORULAÇÃO	ANÁLISE QUALITATIVA
SYNCEPHALASTRUM SP.	Extrato do jardim	Sim	Ótima
	Celulose	Sim	Ótima
	Glicose	Sim	Boa
	Manitol	Sim	Boa
	Inositol	Sim	Boa
	Sorbitol	Sim	Boa
	Controle	Sim	Boa
ESCOVOPSIS SP.	Extrato do jardim	Não	-
	Celulose	Não	-
	Glicose	Não	-
	Manitol	Sim	Boa
	Inositol	Não	-
	Sorbitol	Não	-
	Controle	Não	-
TRICODERMA SP.	Extrato do jardim	Não	-
	Celulose	Não	-
	Glicose	Não	-
	Manitol	Não	-
	Inositol	Não	-
	Sorbitol	Não	-
	Controle	Não	-
CLADOSPORUM SP.	Extrato do jardim	Sim	Ótima
	Celulose	Não	-
	Glicose	Não	-
	Manitol	Não	-
	Inositol	Sim	Boa
	Sorbitol	Não	-
	Controle	Não	-

Solomon e colaboradores (2007) mostraram que o manitol foi um composto obrigatório para esporulação assexual de *Stagonospora nodorum*, responsável pela doença de ‘Mancha da Glumas’ em plantações de trigo. Este fungo produz manitol a partir de glicose ou frutose, que é produzida pela planta (Meena et al., 2015). No sistema attíneo, os fungos parasitas/oportunistas dispõem de manitol, uma vez que o composto já é produzido nos jardins das formigas, representando uma esporulação mais econômica do que a de *S. nodorum*. Assim, a produção e uso de manitol faz parte da teria de interações ecológicas nutricionais entre os múltiplos atores dos jardins. Tais interações favorecem os fungos parasitas e oportunista, que tendem a esporular

na presença de manitol e que utilizam compostos presentes nos jardins do fungo cultivado pelas formigas.

Manitol recentemente foi descrito como um metabólito que auxilia na proteção do fungo parasita contra as defesas químicas de plantas que são parasitadas (Patel & Williamson, 2016). Entretanto, o manitol foi utilizado por ambos os fungos, oportunista e parasita, para o crescimento. Este resultado levanta duas questões para serem testadas mais adiante: 1) Se ambos os fungos, *Escovopsis* sp. e *Syncephalastrum* sp, são considerados parasitas, e se utilizam do manitol para esporulação, o manitol seria um componente essencial para ambos os fungos, e eles utilizariam obrigatoriamente o manitol para propagação? 2) No sistema fúngico parasita/hospedeiro, dentro da colônia de formigas cultivadoras de fungo, existe alguma batalha química que envolva uma disputa pelos polióis?

Rotas metabólicas via transcriptômica:

Dos cinco polióis de interesse, analisamos apenas as vias metabólicas do manitol, sorbitol, inositol e xilitol. A via metabólica do arabitol não foi encontrada nos transcriptomas das duas espécies de fungo, a principal enzima da via metabólica, a enzima arabitol-desidrogenase, não foi encontrada. Essa enzima catalisa a conversão da ribulose em arabitol, ou, alternativamente, a produção de arabitol via xilitol. (Hang et al. 2022).

As buscas foram realizadas manualmente com base na literatura sobre enzimas envolvidas. Foram identificados caminhos para todos os polióis encontrados em fungos mutualísticos associados a formigas cultivadoras. Conseguimos identificar enzimas das rotas anabólicas para quatro polióis (manitol, sorbitol, inositol e xilitol) (Figura 1A, no apêndice) em jardins de fungos, tanto de neoattinas quanto de paleoattinas. Todas as enzimas da via metabólica foram encontradas, começando pela celulase e levando até à responsável pela produção do polioli. Apenas para o manitol, houve uma diferença em uma enzima ao comparar paleoatíneos com neoatíneos. Nos neoatíneos, a enzima responsável pela fosforilação da glicose foi a hexocinase, enquanto nos paleoatíneos, era a glicocinase. Uma hipótese que propomos para essa diferença é que, para os neoatíneos, que formam colônias maiores e produzem mais compostos (Aguilar-

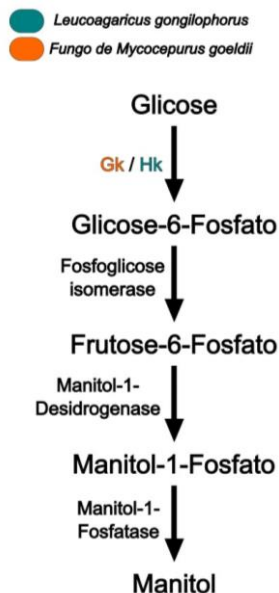


Figura 13. Sequência metabólica dos fungos de paleo e neoattina na produção de Manitol. Gk – Glicocinase, e Hk- Hexocinase

Colorado & Rivera-Chávez, 2023), a presença de uma enzima mais generalizada pode ser evolutivamente vantajosa, pois uma única enzima pode fosforilar vários compostos. Em contraste, ao observar a glicocinase no fungo mutualístico associado aos paleoatíneos, a especificidade parece ter sido mantida neste grupo, e talvez seja um caractere plesiomórfico (Figura 13).

Adicionalmente, em contraste com as descobertas de Somera e colaboradores (2015), não constatamos a presença de alguns genes para produção de arabitol nos nossos transcritos. Contudo, ao examinarmos os dados sob uma perspectiva química por meio de técnicas como HPLC e RMN, observamos a presença de picos correspondentes ao polioli arabitol. A possível explicação para esta presença nos dados químicos pode residir na abordagem metodológica empregada na coleta desses dados. Enquanto os dados químicos foram obtidos a partir do jardim completo do fungo (região periférica), os dados genéticos foram obtidos exclusivamente do fungo mutualista associado às formigas, através da metodologia de isolamento e posterior cultivo em amido como fonte de carbono.

É plausível considerar que o arabitol possa ser produzido por outros microrganismos presentes no jardim de fungos. Essa hipótese encontra respaldo nas descobertas de Aguilar-Colorado e Rivera-Chávez (2023), os quais evidenciaram que diversos microrganismos podem sintetizar compostos distintos dentro das colônias nos jardins de fungos associados às formigas. Contudo, permanece incerto qual dos microrganismos poderia ser responsável por produzir arabitol, bem

como se o composto é gerado por meio de uma rota metabólica distinta daquelas até então conhecidas.

Portanto, os fungos das attíneas basais ou das derivadas apresentam capacidade de sintetizar polióis, uma descoberta corroborada tanto por análises químicas quanto por estudos transcriptômicos. Esses achados são significativos, pois demonstram que, apesar da produção desses compostos ser um fenômeno comum entre os fungos estudados, existem variações nas enzimas envolvidas no mesmo processo metabólico. Especificamente, observamos diferenças nas enzimas que catalisam a fosforilação da glicose para formar Glicose-6-Fosfato. Essa etapa é crucial na via glicolítica e sua eficiência pode ter implicações diretas na produtividade e adaptação metabólica dos fungos. Portanto, a identificação dessas enzimas não apenas enriquece nosso entendimento das vias metabólicas envolvidas, mas também pode fornecer “insights” valiosos sobre as estratégias adaptativas desses fungos em seus respectivos nichos ecológicos.

Evolução do ORCO, grupo de genes, responsável pela captação de odores em formigas attinas:
Após o alinhamento da sequência gênica o comprimento foi de 4308 nucleotídeos e 1436 proteínas traduzidas, e o melhor modelo de evolução do gene foi Tomura 1992 (t92), baseado no critério de informação bayesiano. As frequências de nucleotídeos foram 24,71% (a), 29,49% (t/u), 20,96% (c) e 24,84% (g) para as cinco espécies. As razões de taxa de transição/transversão dentro de nossas espécies foram $k1 = 20,853$ (purinas) e $k2 = 20,280$ (pirimidinas), e o viés geral de transição/transversão foi $r = 10,134$ entre as espécies. Encontramos uma diversidade de nucleotídeos de 1,155% e 276 sítios segregantes. Para identificar se os genes orco são um bom gene para análise filogenética, usamos *Daceton armigerum* (Dacetini: Formicidae) como grupo raiz e realizamos uma análise de máxima verossimilhança para construir uma árvore filogenética.

Nossa análise mostrou que o gene ORCO pode ser usado para análise evolutiva em filogenética, e a filogenia gerada foi a mesma encontrada quando usados outros genes, como COI e UCE. O gene ORCO é um dos genes mais importantes na evolução da comunicação nos insetos.

Yan e colaboradores (2017) mostraram que o gene ORCO é responsável pela detecção de diversos tipos de odores. E que quando silenciado formigas tendem a criar um comportamento solitário. Como essas detecções são feitas pelas proteínas codificadas pelos genes, que em sua grande maioria está presente nas sensilas (Wicher & Miazzi, 2021), o entendimento por completo deste grupamento de genes é de suma importância para o entendimento por completo do mecanismo de detecção destes compostos. Nosso próximo passo será a análise dos genes gustatórios (Grs) das formigas atíneas e incrementação de dados aos já coletados e analisados. Já estamos com diversas espécies novas coletadas e prontas para enviar para sequenciamento do transcriptoma. Além disso, muitas amostras já voltaram e estão em fase de processamento e anotação de genes para posterior trabalho com expressões gênicas e receptores gustativos e olfativos.

Esta parte do projeto não foi proposta, porém é vital para o entendimento de como a evolução do sistema olfativo das formigas cultivadoras de fungo. Sabendo sobre a evolução deste sistema podemos, no futuro, fazer inferências sobre quantidade e tipos de odores, e como estes podem estar relacionados aos fungos e, conseqüentemente, à interação dentro da colônia. Identificando se a complexidade dos compostos dentro da colônia pode ser oriunda de uma pressão evolutiva ou corroborando a hipótese da rainha vermelha.

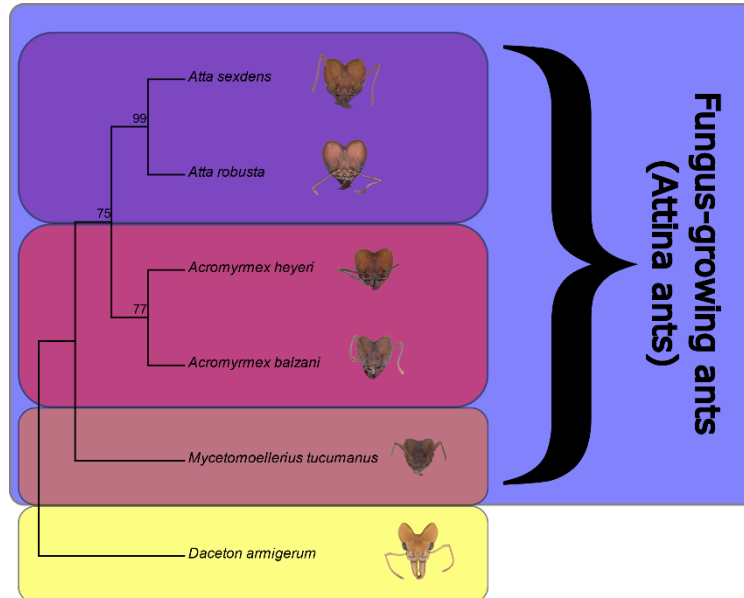


Figura 14. Filogenia construída baseada nas sequências de genes Orco de formigas cultivadoras de fungo. *Daceton armigerum* foi utilizada como espécie root na filogenia.

Objetivos respondidos até agora

(1) Quais polióis estão presentes nos jardins de fungos em cada um dos cinco tipos de agricultura?

Infelizmente não foi ainda possível coletar e analisar todos os tipos de jardins fungo. Nas nossas coletas conseguimos apenas encontrar jardins fungos mutualistas das formigas basais (*Mycocepurus*, *Mycetophylax*), uma colônia de formigas que cultivam leveduras (*Cyphomyrmex* sp.) e colônias de neolatinas (*Atta* e *Acromyrmex*). A extração e identificação de polióis dos fungos mutualistas de *Mycocepurus goeldii* e neolatinas (*Atta* e *Acromyrmex*) foi realizada como mostrado no relatório. Porém, as leveduras produzidas pelo gênero *Cyphomyrmex* mostraram uma quantidade ínfima de jardim de fungo. Por esta razão, ainda não conseguimos extrair os polióis ou cultivar as leveduras em placas de petri. Porém para o próximo ano teremos viagens de coleta, planejadas para localizar mais destas colônias e tentar realizar a extração de micélios para transcriptômica e metatranscriptômica. Como mostrado no presente documento, esta pode ser uma alternativa viável para responder às questões de produção e rotas metabólicas.

(2) Entre eles, há os que apresentem valor econômico?

Sim, tanto em Paleoatina quanto em Neoatina foram encontrados diversos polióis com alto valor agregado. Foram encontrados sorbitol, manitol, inositol e xylitol.

(3) Há assinaturas químicas distintas para grupos de formigas filogeneticamente distintas?

Sim, a proporção de compostos produzidos pelos jardins de fungo é diferente. Mesmo colônias de mesma espécie produzem quantidades diferentes de compostos. Nossos resultados mostram que há uma relação entre tamanho da colônia e quantidade de Manitol produzido, por exemplo. Espécies com grande quantidade de indivíduos geralmente acumulam menos Manitol que espécies com poucos indivíduos.

(4) Há respostas espécie-específicas aos diferentes tipos de polióis?

Como mostrado aqui no nosso relatório não há uma resposta espécie-específica para os polióis pelas formigas. Nossa hipótese é que mesmo podendo haver consumo dos polióis eles não são a fonte energética principal para as formigas. Muito provavelmente os polióis produzidos pelos fungos são utilizados por outros microrganismos, bactérias e outros fungos.

Conclusão e futuros direcionamentos

Nos jardins de fungos da formiga cortadeira *Atta bisphaerica*, o fungo mutualista *Leucoagaricus gongylophorus* produz os polióis manitol, arabitol e inositol, enquanto outro microrganismo não identificado produz o poliol sorbitol (Somera et al. 2015). Na época, não era claro o significado dessa produção, principalmente porque a maioria dos carboidratos simples gerados a partir da degradação dos polissacarídeos não era imediatamente consumida pelas formigas, mas sim convertida em polióis. Nosso grupo de trabalho levantou várias hipóteses sobre as possíveis utilidades do acúmulo de polióis, tais como preservação da meia vida das exoenzimas despolimerases fúngicas responsáveis pela digestão da matéria vegetal coletada pelas formigas ou mesmo a conservação da energia excedente, pois os polióis são compostos reduzidos e ricos em elétrons (Somera et al. 2015), que seriam utilizados como reserva para as formigas consumirem em tempos de escassez de alimentos. Também na época surgiu uma questão se tal estratégia de acumular polióis era exclusiva das formigas cortadeiras ou se ela estaria também presente em formigas mais primitivas da subtribo Attina.

No presente projeto de pós-doutorado, nós identificamos que os jardins de fungos da neoattínea cortadeira *Acromyrmex lundii* produzem manitol, enquanto os jardins da paleoattínea primitiva *Mycocepurus goeldii* produzem manitol e arabitol. Além disso, demonstramos que os fungos mutualistas de *Atta sexdens* ou de *Mycocepurus goeldii* expressam todas as enzimas necessárias para a conversão de glicose em manitol. Esses dados indicam que a produção de manitol e arabitol pelos fungos mutualistas é um fator comum entre as attíneas derivadas e primitivas. Adicionalmente, nosso estudo complementa o trabalho realizado por Somera e coautores (2015), ao mostrar diferenças entre as composições e quantidades dos polióis produzidos por fungos.

Os polióis gerados pelos fungos mutualistas de attíneas apresentam um amplo espectro de aplicações no campo da biotecnologia. Entre as aplicações mais notáveis, podemos citar a produção de xylitol, que é de grande importância para indivíduos com diabetes; manitol, que tem relevância para pacientes com glaucoma; e sorbitol, que é amplamente utilizado na indústria alimentícia. As rotas metabólicas propostas em nosso projeto demonstram a viabilidade da produção desses compostos em um número reduzido de etapas. Um exemplo notável é a produção de sorbitol. Conforme elucidado por Sauzem e colaboradores (2019), a maior parte do sorbitol consumido pela indústria brasileira é importada, o que ressalta a necessidade de desenvolver métodos de produção doméstica. Ao analisar a rota de produção do sorbitol pelos fungos mutualistas, observamos que a produção do composto via glicose em apenas uma etapa é altamente viável, especialmente com a utilização da enzima aldose redutase. A produção desses compostos por fungos, através de uma rota metabólica simplificada – com um número mínimo de passos –, representa uma alternativa viável para a indústria brasileira na produção desses polióis. Portanto, acreditamos que a continuação de nossa pesquisa nesse campo pode trazer benefícios significativos para a indústria biotecnológica, contribuindo para a autossuficiência na produção desses compostos essenciais.

A produção de polióis não é exclusiva dos fungos mutualistas, mas está amplamente distribuída entre muitos fungos e bactérias de vida livre (Rice et al. 2020). Em nosso estudo, identificamos que as formigas consomem os polióis produzidos nos jardins de fungos. No entanto, descobrimos que os polióis não pouco consumidos pelas formigas quanto comparados à glicose, que se mostrou uma fonte de carbono preferencial. Assim, a preferência por glicose, que já havia sido demonstrada frente a outros carboidratos (Silva et al. 2015), também ocorreu quando comparada aos polióis. Adicionalmente, nosso projeto demonstrou que a atratividade das formigas por polióis é inferior àquela apresentada por glicose.

Além de serem uma importante fonte de carbono para o crescimento e esporulação de fungos oportunistas ou parasitas, os polióis são amplamente distribuídos entre muitos fungos e bactérias de vida livre. Neste relatório, demonstramos que, em relação aos fungos *Cladosporium* e *Trichoderma*, a importância dos polióis rivaliza com a da glicose. O poliol manitol mostrou-se mais efetivo do que a glicose para a promoção do crescimento e indução da esporulação de *Escovopsis* e de *Syncephalastrum*. A esporulação é um fator importante para a rápida

disseminação dos fungos e, dessa forma, é provável que a alta produção de manitol pelos fungos mutualistas tenha aberto uma porta para a disseminação de fungos contaminantes no interior dos jardins de fungos das formigas, estimulando o rápido crescimento e a esporulação desses fungos.

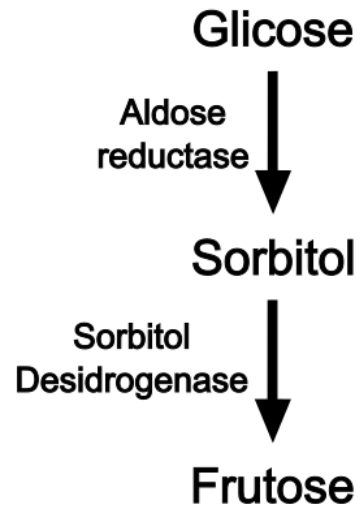
Do ponto de vista evolutivo, os resultados do presente relatório também indicam que (a) a diversidade de metabólitos secretados nos jardins de fungos aumentou com a evolução das formigas; (b) há especializações metabólicas características de cada espécie de formigas cortadeira; (c) as attíneas primitivas são menos especializadas na produção de polióis do que as attíneas derivadas; (d) a evolução das formigas foi acompanhada da diminuição da porcentagem de manitol nos jardins de fungos; (e) há outros parceiros microbianos além de *L. gongylophorus* atuam na produção de polióis nos jardins de fungos.

Embora os avanços do presente projeto de pós-doutorado tenham sido importantes para elucidar esses aspectos, muitas dúvidas ainda restam com relação a este assunto. Por esta razão, propomos uma extensão da bolsa, de modo a complementar os resultados com as seguintes atividades:

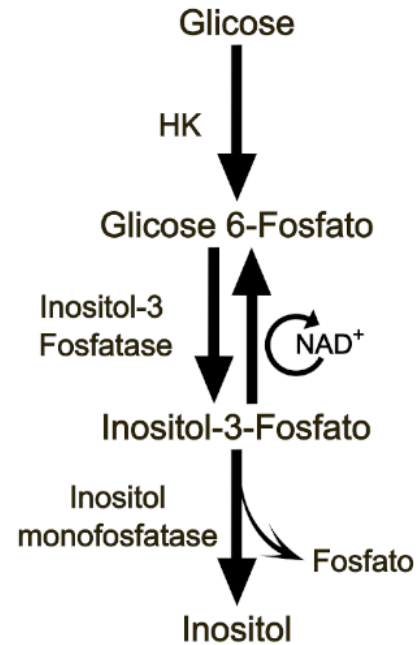
1. Coletar e analisar jardins de fungos de formigas nos gêneros *Cyphomyrmex*, *Apterostigma* e *Trachymyrmex*, para abranger os cinco grupos evolutivos de fungos já caracterizados pela literatura.
2. Analisar os jardins de fungos e fungos isolados já disponíveis em nosso laboratório, mas ainda não caracterizados (Apêndices, Tabela 1A).

Apêndices

A)



B)



C)

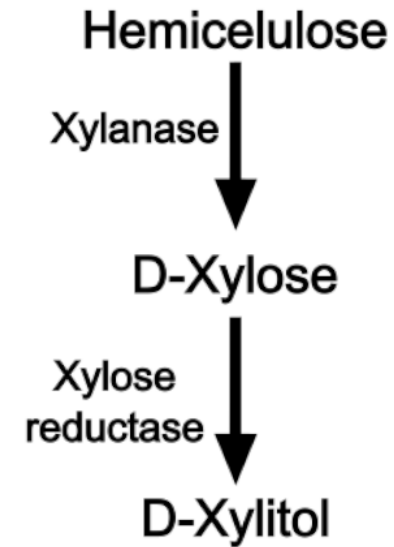


Figura 1A. Rotas metabólicas propostas baseadas na análise dos transcritos em ambos os fungos de Paleoattina e Neoattina. A) Rota proposta para o poliol sorbitol, nesta rota o sorbitol funciona como substrato para produção da frutose; B) Rota proposta para o inositol, com diversas enzimas e substratos para formação do poliol; C) Rota proposta para o poliol xylitol, diferentemente dos outros polióis este utiliza como substrato primário a hemicelulose, enquanto os demais glicose, para produção, apenas duas enzimas são necessárias para produção do xylitol pelos fungos.

Tabela 1A. Colônias coletadas durante o projeto. A impossibilidade de analisar muitas das amostras se deveu ao reduzido tamanho da colônia ou à morte das colônias mantidas em laboratório, o que resultou quantidade insuficiente de amostras de jardins de fungos. Outras coletas serão realizadas durante o ano de 2024, para aumentar o tamanho amostral. * Espécies já analisadas; demais espécies serão utilizadas para as análises nos próximos 12 meses de projeto (prorrogação solicitada).

Espécies	Quantidade de Colônias	Formigas preservadas	Fungos para extração química	Fungos em placa para cultivo em YNB
<i>Acromyrmex bruneus</i>	1	Sim	Sim (1 colônia)	Sim
<i>Acromyrmex lundii</i> *	45	Sim	Sim (20 colônias)	Sim
<i>Acromyrmex rugosus</i>	2	Sim	Sim (1 colônia)	Sim
<i>Acromyrmex sp 1</i>	1	Sim	Não	Sim
<i>Acromyrmex sp 2.</i>	3	Sim	Não (	Sim
<i>Acromyrmex subterraneus</i>	1	Sim	Sim (1 colônia)	Sim
<i>Atta cephalotes</i>	2	Sim	Sim	Sim
<i>Atta laevigata</i>	2	Sim	Sim (1 colônia)	Sim
<i>Atta sexdens</i> *	10	Sim	Sim (3 colônias)	Sim
<i>Cyphomyrmex sp 1</i>	1	Sim	Não	Não
<i>Mycetophylax morshi</i>	8	Sim	Não	Sim
<i>Mycocetopus goeldii</i> *	40	Sim	Sim (20 colônias)	Sim
Total	116			

Resumos apresentados

Poster

Assis, DS; Ferro, M; Bacci Jr, M. **ORCO genes analysis in five species of fungus growing ants (Formicidae)** -- 68th Brazilian Congress of Genetics. 2023 (de 12/09 a 15/09)

Silva, RAP, Assis, DS, Marin, V; Bacci Jr, M. **Preference of leaf cutter ants (Hymenoptera: Formicidae): Over different polyols** -- XXVI Simpósio de Mirmecologia: An International Ant Meeting. 2023 (de 22/10 a 26/10)

Oral

Assis, DS; Marin, V; Ferro, M; Sass, D; Bacci Jr, M. **Mannitol factories inside attina colonies may help with social immunization.** XXVI Simpósio de Mirmecologia: An International Ant Meeting. 2023 (de 22/10 a 26/10)

Artigos submetidos

Assis et al. **Commensalism among fungus-growing ants.** Insectes Sociaux. 2023.

Artigos aceitos para publicação

Assis et al. **Environment influences the volatiles of fungus gardens in the colonies of fungus-farming ants** – Sociobiology. 2023

Programas de divulgação científica onde o beneficiário participou

Programa Papo Acadêmico – TV UNESP - link para o programa

[Papo Acadêmico | Por que estudar microrganismos de formigas-cortadeiras? - YouTube](#)

Palestras ministradas

Evolução dos hidrocarbonetos cuticulares em formigas cultivadoras de fungos – Seminários em Biologia Celular, Molecular e Microbiologia II

Formigas cultivadoras de fungo: o estado da arte – Ministrada no Instituto de Biociências, IB, Unesp Rio Claro/SP

Participação em eventos

II Encontro BCMM do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, Molecular e Microbiologia, 2023

68th Brazilian Congress of Genetics – 2023

XXVI Simpósio de Mirmecologia: An International Ant Meeting. 2023 (de 22/10 a 26/10)

Tabela A1. Cronograma proposto para renovação do financiamento de pesquisa

[illegible]

Referências bibliográficas

- Aguilar-Colorado, Á. S., & Rivera-Chávez, J. (2023). Ants/Nest-Associated Fungi and Their Specialized Metabolites: Taxonomy, Chemistry, and Bioactivity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 33(5), 901–923. <https://doi.org/10.1007/s43450-023-00417-3>
- Arora, K. K., Filburn, C. R., & Pedersen, P. L. (1991). Glucose phosphorylation. Site-directed mutations which impair the catalytic function of hexokinase. *Journal of Biological Chemistry*, 266(9), 5359–5362. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)67600-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)67600-3)
- Assis, D. S., Camargo, G. A. R., Barrios, K., Tannure-Nascimento, I. C., & Nascimento, F. S. D. (2021). Neighbor Colonies Affect Level of Foraging in the Generalist Ant Pheidole oxyops (Hymenoptera: Formicidae). *Florida Entomologist*, 104(2), 71–76. <https://doi.org/10.1653/024.104.0202>
- Barcoto, M. O., Pedrosa, F., Bueno, O. C., & Rodrigues, A. (2017). Pathogenic nature of *Syncephalastrum* in *Atta sexdens rubropilosa* fungus gardens. *Pest Management Science*, 73(5), 999–1009. <https://doi.org/10.1002/ps.4416>
- Billen, J., Beeckman, W., & Morgan, E. D. (1992). Active trail pheromone compounds and trail following in the ant *Atta sexdens sexdens* (Hymenoptera Formicidae). *Ethology Ecology & Evolution*, 4(2), 197–202. <https://doi.org/10.1080/08927014.1992.9525342>
- Blomquist, G. J., & Bagnères, A.-G. (Orgs.). (2010). *Insect Hydrocarbons: Biology, Biochemistry, and Chemical Ecology*. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511711909>
- Carroll, C. R., & Janzen, D. H. (1973). Ecology of Foraging by Ants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 4(1), 231–257. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.04.110173.001311>
- Chen, M., Zhang, W., Wu, H., Guang, C., & Mu, W. (2020). Mannitol: Physiological functionalities, determination methods, biotechnological production, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(16), 6941–6951. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10757-y>

- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792–1797.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- He, M. X., Wu, B., Qin, H., Ruan, Z. Y., Tan, F. R., Wang, J. L., Shui, Z. X., Dai, L. C., Zhu, Q. L., Pan, K., Tang, X. Y., Wang, W. G., & Hu, Q. C. (2014). *Zymomonas mobilis*: A novel platform for future biorefineries. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 101.
<https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-101>
- Holman, L., Helanterä, H., Trontti, K., & Mikheyev, A. S. (2019). Comparative transcriptomics of social insect queen pheromones. *Nature Communications*, 10(1), Artigo 1.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-09567-2>
- Huang, J., An, Y., Zayed, H. M., Ravikumar, Y., Zhao, M., Yun, J., Zhang, G., Zhang, Y., Li, X., & Qi, X. (2022). Enhanced Biosynthesis of D-Arabitol by *Metschnikowia reukaufii* Through Optimizing Medium Composition and Fermentation Conditions. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 194(7), 3119–3135. <https://doi.org/10.1007/s12010-022-03910-y>
- Jennings, D. H. (1985). Polyol Metabolism in Fungi. Em A. H. Rose & D. W. Tempest (Orgs.), *Advances in Microbial Physiology* (Vol. 25, p. 149–193). Academic Press.
[https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60292-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60292-1)
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Li, C., Lev, S., Saiardi, A., Desmarini, D., Sorrell, T. C., & Djordjevic, J. T. (2016). Inositol Polyphosphate Kinases, Fungal Virulence and Drug Discovery. *Journal of Fungi*, 2(3), Artigo 3. <https://doi.org/10.3390/jof2030024>
- Mani-López, E., Cortés-Zavaleta, O., & López-Malo, A. (2021). A review of the methods used to determine the target site or the mechanism of action of essential oils and their components against fungi. *SN Applied Sciences*, 3(1), 44.
<https://doi.org/10.1007/s42452-020-04102-1>

- Meena, M., Prasad, V., Zehra, A., Gupta, V., & Upadhyay, R. (2015). Mannitol metabolism during pathogenic fungal–host interactions under stressed conditions. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2015.01019>
- Michell, R. H. (2008). Inositol derivatives: Evolution and functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(2), Artigo 2. <https://doi.org/10.1038/nrm2334>
- Patel, T. K., & Williamson, J. D. (2016). Mannitol in Plants, Fungi, and Plant–Fungal Interactions. *Trends in Plant Science*, 21(6), 486–497. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.006>
- Pereira, H., Jossart, M., & Detrain, C. (2020). Waste management by ants: The enhancing role of larvae. *Animal Behaviour*, 168, 187–198. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2020.08.017>
- Reynolds, T. B. (2009). Strategies for acquiring the phospholipid metabolite inositol in pathogenic bacteria, fungi and protozoa: Making it and taking it. *Microbiology*, 155(Pt 5), 1386–1396. <https://doi.org/10.1099/mic.0.025718-0>
- Rice, T., Zannini, E., K. Arendt, E., & Coffey, A. (2020). A review of polyols – biotechnological production, food applications, regulation, labeling and health effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(12), 2034–2051. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1625859>
- Richard, F.-J., Hefetz, A., Christides, J.-P., & Errard, C. (2004). Food influence on colonial recognition and chemical signature between nestmates in the fungus-growing ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. *CHEMOECOLOGY*, 14(1), 9–16. <https://doi.org/10.1007/s00049-003-0251-3>
- Saiardi, A., Azevedo, C., Desfougères, Y., Portela-Torres, P., & Wilson, M. S. C. (2018). Microbial inositol polyphosphate metabolic pathway as drug development target. *Advances in Biological Regulation*, 67, 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2017.09.007>

- Searle, S. R., Speed, F. M., & Milliken, G. A. (1980). Population Marginal Means in the Linear Model: An Alternative to Least Squares Means. *The American Statistician*, 34(4), 216–221. <https://doi.org/10.1080/00031305.1980.10483031>
- Silva, A., Bacci Jr., M., Gomes de Siqueira, C., Correa Bueno, O., Pagnocca, F. C., & Aparecida Hebling, M. J. (2003). Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. *Journal of Insect Physiology*, 49(4), 307–313. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(03\)00004-0](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(03)00004-0)
- Solomon, P. S., Waters, O. D. C., & Oliver, R. P. (2007). Decoding the mannitol enigma in filamentous fungi. *Trends in Microbiology*, 15(6), 257–262. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.04.002>
- Somera, A. F., Lima, A. M., dos Santos-Neto, Á. J., Lanças, F. M., & Bacci, M. (2015). Leaf-Cutter Ant Fungus Gardens Are Biphasic Mixed Microbial Bioreactors That Convert Plant Biomass to Polyols with Biotechnological Applications. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(13), 4525–4535. <https://doi.org/10.1128/AEM.00046-15>
- Sumpter, D. J. T., & Beekman, M. (2003). From nonlinearity to optimality: Pheromone trail foraging by ants. *Animal Behaviour*, 66(2), 273–280. <https://doi.org/10.1006/anbe.2003.2224>
- Ur-Rehman, S., Mushtaq, Z., Zahoor, T., Jamil, A., & Murtaza, M. A. (2015). Xylitol: A Review on Bioproduction, Application, Health Benefits, and Related Safety Issues. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(11), 1514–1528. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.702288>
- Wicher, D., & Miazzi, F. (2021). Functional properties of insect olfactory receptors: Ionotropic receptors and odorant receptors. *Cell and Tissue Research*, 383(1), 7–19. <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03363-x>
- Yan, H., Opachaloemphan, C., Mancini, G., Yang, H., Gallitto, M., Mlejnek, J., Leibholz, A., Haight, K., Ghaninia, M., Huo, L., Perry, M., Slone, J., Zhou, X., Traficante, M., Penick, C. A., Dolezal, K., Gokhale, K., Stevens, K., Fetter-Pruneda, I., ... Desplan, C.

(2017). An Engineered orco Mutation Produces Aberrant Social Behavior and Defective Neural Development in Ants. *Cell*, 170(4), 736-747.e9.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.051>

Certificados

Resumos

Apresentado pelo bolsista como formato pôster

Apresentado no *Brasilian Congress of Genetics 2023*, Ouro Preto-MG. De 12 a 15 de setembro de 2023.



GENÉTICA
EVOLUTIVA

ORCO GENES ANALYSIS IN FIVE SPECIES OF FUNGUS GROWING ANTS (FORMICIDAE)

Diego Santana Assis¹; Milene Ferro¹; Maurício Bacci Júnior¹
¹. Av 24A, 1515, Rio Claro, São Paulo. Universidade Estadual Paulista

Abstract:

The olfactory receptor co-receptor (ORCO) is a highly conserved gene found in most insects, which plays a vital role in detecting chemical signals. Despite its widespread presence, the ORCO gene has undergone significant changes during the evolution of different insect species, leading to a variety of effects on insect behavior. The ORCO gene is an essential co-receptor for all odorant receptors (ORs) and performs a crucial role in the social behavior of ants. Ants have evolved to communicate via biochemical cues and possess a large repertoire of chemosensory genes, including approximately 400 odorant receptors, nevertheless just one ORCO gene. In this study, using transcriptomes, we analyze the evolution of ORCO genes in five species of higher fungus growing ants (Attini: Formicidae) - *Atta sexdens* and *Atta robusta*; *Acromyrmex heyeri* and *Acromyrmex balzani*; and *Trachymyrmex fuscus*. The sequences were aligned using the MUSCLE algorithm, after the alignment the sequence had the length of 4308 nucleotides and 1436 translated proteins. The best model of evolution of the gene was Tomura 1992 (T92), based on Bayesian Information Criterion. The nucleotide frequencies were 24.71% (A), 29.49% (T/U), 20.96% (C), and 24.84% (G) for the five species. The transition/transversion rate ratios inside our species were $k1 = 20.853$ (purines) and $k2 = 20.280$ (pyrimidines), and overall transition/transversion bias was $R = 10.134$ among the species. We found a nucleotide diversity of 1.155%, and 276 segregating sites. To identify if ORCO genes is a good gene for phylogenetic analysis we used *Daceton armigerum* (Dacetini: Formicidae) as a root group and performed a Maximum Likelihood analysis to build a phylogenetic tree. Our analysis showed that ORCO gene can be used for evolutionary analysis in phylogenetics, and the phylogeny generated was the same as found when used other genes, as COI and UCE ones. ORCO gene is one of the most important genes in the evolution of communication in insects. Our findings show that ORCO is highly conserved in fungus growing ants, and this conservation is the key for cohesion and maintenance of eusociality in the fungus growing ants. Our findings have important implications for understanding the evolution of insect sensory systems and the molecular basis of eusocial behavior in ants.

Palavras-chave: ORCO; Attina; Fungus-Growing Ants; Communication;

Support / Acknowledgment

We thank to FAPESP for the financial support of this work (Proc. nº 2020/12423-7)

721



O simpósio de Mirmecologia: An International Ant Meeting (2023) ainda não possui os anais, desta maneira seguem as cartas de aceite e os resumos apresentados no simpósio.

O resumo “**Preference of leaf cutter ants (Hymenoptera: Formicidae) over different polyols**” foi apresentado na modalidade posters.

PREFERENCE OF LEAF-CUTTER ANTS (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) OVER DIFFERENT POLYOLS

R. A. P. SILVA¹, D. S. ASSIS¹, V. MARIN¹ & M. BACCI JR.¹

¹Departamento de Biologia Geral e Aplicada, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Av. 24-A, 1515, CEP: 13506-900 - Rio Claro, São Paulo, **Brazil**, e-mail: rap.silva@unesp.br

Leaf-cutting ants maintain a mutualistic relationship with the fungus *Leucoagaricus gongylophorus*, cultivated by ants using fresh plant material. Plant material offered (composed of polysaccharides, such as starch, hemicellulose, cellulose, and pectin) is degraded by enzymes produced by the mutualistic fungus and other microorganisms present in the colony, degrading the biomass into compounds, such as glucose and polyols. During the cultivation and manipulation of the mutualistic fungus, the workers can ingest these polyols. Since polyols are present in leaf-cutting ant's colonies, and can be used as a food source, the present study aimed to analyze the preference of leaf-cutting ants when presented different polyol types. To answer our questions, we used 20 colonies of *Atta sexdens* and deprived of food 24 hours before the experiment. In the colony's feeding chamber, they received 2 mL of glucose and polyols (Arabitol, Inositol, Mannitol, Sorbitol, and Xylitol) at one mol/L and 0.1 mol/L concentrations. The polyols and glucose solutions were placed in cell culture plates containing wells. The distribution of the compounds in the wells was made randomly and the wells were classified according to the distance to the entrance of the colony (near, medium, and far). After 24 hours, the plates were removed, and the remaining compounds were pipetted and measured. We counted the ants present in the wells and separated into minors, medium, and major workers. In addition, we performed a duplicate with an interval of one week between tests. We performed statistical analyzes in R software, with GLMMTMB package to fit the analysis to the beta dispersion of our data. For both concentrations (one and 0.1 mol/L), glucose was the most consumed compound. When presented in lower concentration it was more consumed than the highest concentration of arabitol, mannitol, and sorbitol. The most consumed polyols at a concentration of one mol/L were inositol and xylitol, xylitol in the higher concentration had the same amount of consumption than glucose at lower concentration. Most ants were found in the wells of glucose, followed by those in the inositol wells. Regarding the distance of the wells, ants were found in the most distant glucose wells at both concentrations. In wells containing arabitol and inositol at the lowest concentration, we found no ants. Our study shows that glucose is the compound most aimed by the ants, however, polyols when presented in higher concentrations can be attractive to the colony.

[CAPES, FAPESP (2020/12423-7; 2019/03746-0)]



Manaus, 21 de agosto de 2023

DECLARAÇÃO DE ACEITE DE RESUMO

É com grande prazer que o Comitê Científico do XXVI Simpósio de Mirmecologia: An International Ant Meeting, certifica por meio desta declaração que o resumo intitulado "PREFERENCE OF LEAF CUTTER ANTS (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) OVER DIFFERENT POLYOLS", de autoria de Diego Santana Assis e colaboradores, foi selecionado e aceito para apresentação durante o evento.

Atenciosamente,
Comissão Organizadora do XXVI Simpósio de Mirmecologia
Site | Instagram | Facebook | Twitter

Dr. Fabricio B. Baccaro

Presidente da Comissão Organizadora do XXVI Simpósio de Mirmecologia

Dra. Livia Pires do Prado
Comissão Científica



The Organizing Committee

CERTIFIES THAT

PREFERENCE OF LEAF CUTTER ANTS (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) OVER DIFFERENT POLYOLS

R. A. P. SILVA, D. S. ASSIS, V. MARIN & M. BACCI JR

Was presented at the XXVI Simpósio de Mirmecologia at Manaus, Amazonas, Brazil,
October 22 to October 26, 2023 in the Poster Presentation Modality.

Dr. Fabricio Beggiano Baccaro
Mirmeco 2023 - Chair

Dra. Itanna Fernandes
Mirmeco 2023 - Co-Chair

Dra. Livia Pires do Prado
Mirmeco 2023 - Scientific Committee
Coordinator

Organization



Support

Bocaina

Resumo apresentados na modalidade Apresentação Oral, no Simpósio de Mirmecologia (2023)

MANNITOL FACTORIES INSIDE ATTINA COLONIES MAY HELP WITH SOCIAL IMMUNIZATION[¶]

D.S. ASSIS¹, V. MARIN¹, M. FERRO, D. SASS¹ & M. BACCI JR¹ ¶

¹ Instituto de Biociências, Departamento de Biologia Geral e Aplicada, Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Campus Rio Claro, Avenida 24-A, 1515 - Rio Claro/SP - CEP 13506-900 ¶

Ants and fungi have a long evolutionary history. Ants provide food and care to the fungi, meanwhile the fungi provide to the ants several kinds of resources. Some resources provided by the fungi are glucose and sugar alcohols (polyols). Polyols compounds are small, generally five to six carbons, with more than three hydroxyls (OH) in the chain. They may play several roles for both, ants, and fungi. For the fungi they can be used as energy food stock, for the ants can be consumed when ants lick the fungus garden material. Here we show the production of Mannitol by the symbiotic fungi in three species of fungus growing ants, *Acromyrmex subterraneus*, *Atta sexdens*, *Mycocrepus goeldii*, and how this compound can be used by the colony. We sampled approximately 0.5 g of the fungus garden. To extract the polyols, we used 10 mL of solution of 0.1 mol/L of acetate of ammonium. Consequently, the solution with polyols was filtered, lyophilized, and finally weighted. The polyols were resuspended in ultrapure milliQ water, and the concentration was fitted to 10 µg/mL. We were able to find several types of polyols (mannitol, xylitol, and inositol) in the fungus garden materials. However, our focus was to find the presence of Mannitol on our samples. Mannitol has an important role in the host/pathogen interaction, protecting the host from pathogenic fungi. In our samples we were able to find approximately 18% of polyol composition for *Mycocrepus goeldii*, 17% for *Acromyrmex subterraneus* and 9% for *Atta sexdens*. These results can open a discussion about the fungi working as a source of social immunity inside the colony against others pathogenic microorganism. In our results the quantity found in each species may be related to different colony sizes or ants' specialization, resulting distinct rates between polyol production and consumption. *Atta* can build giant colonies showing more specialized features than *Ac. subterraneus* or *M. goeldii*, which may include more efficient sanitary protection of the colony. In the small colony of *M. goeldii* mannitol production was higher, maybe because in those colonies the fungi need to be more active in immunization. In this work we were able to show that the fungi can produce compounds that may protect the ant colony and propose that this production could be related to colony size and specialization in attina ants. ¶

[Financial Support: FAPESP n°2019/03746-0, 2020/12423-7, and 2021/10639-5] ¶



Manaus, 21 de agosto de 2023

DECLARAÇÃO DE ACEITE DE RESUMO

É com grande prazer que o Comitê Científico do XXVI Simpósio de Mirmecologia: An International Ant Meeting, certifica por meio desta declaração que o resumo intitulado "MANNITOL FACTORIES INSIDE ATTINA COLONIES MAY HELP WITH SOCIAL IMMUNIZATION", de autoria de Diego Santana Assis e colaboradores, foi selecionado e aceito para apresentação durante o evento.

Atenciosamente,
Comissão Organizadora do XXVI Simpósio de Mirmecologia
Site | Instagram | Facebook | Twitter

Dr. Fabrício B. Baccaro

Presidente da Comissão Organizadora do XXVI Simpósio de Mirmecologia

Dra. Livia Pires do Prado
Comissão Científica



XXVI

Simpósio de Mirmecologia:
An International Ant Meeting
2023 - MANAUS - AMAZONAS

The Organizing Committee

CERTIFIES THAT

MANNITOL FACTORIES INSIDE ATTINA COLONIES MAY HELP WITH SOCIAL IMMUNIZATION

D.S. ASSIS, V. MARIN, D. SASS & M. BACCI JR

Was presented at the XXVI Simpósio de Mirmecologia at Manaus, Amazonas, Brazil,
October 22 to October 26, 2023 in the Oral Presentation Modality.

Dr. Fabrício Beggiano Baccaro
Mirmeco 2023 - Chair

Dra. Itanna Fernandes
Mirmeco 2023 - Co-Chair

Dra. Livia Pires do Prado
Mirmeco 2023 - Scientific Committee
Coordinator

Organization



Support



Resumo enviado e aceito para apresentação

19 a 23 de fevereiro de 2024 | Belo Horizonte - MG

www.cbmic2024.com.br



X Congresso Brasileiro de

Micologia

Carta de Aceite

Belo Horizonte - MG, 25/01/2024

A comissão científica do X Congresso Brasileiro de Micologia informa que o trabalho intitulado **METABOLISMO DE POLÍDIOS POR FUNGOS ASSOCIADOS A FUNGICULTURA DAS FORMIGAS ATINEAS**, de autoria de Maria Izabela Tavares dos Santos; Diego Santana de Assis; Mateus Oliveira da Cruz; Maurício Bacchi Jr; Andre Rodrigues foi **APROVADO** para apresentação no referido evento, entretanto, a carta de aceite não impede que correções adicionais sejam solicitadas e não garante a publicação sem as correções.

O formato de apresentação, Pôster ou Oral, será informado posteriormente no site do evento, bem como os dias e horários de apresentação.

Artigos publicados durante a vigência da bolsa (ano de 2022)

- 1) Silva, R.R., Martello, F., Feitosa, R.M., Silva, O.G.M., do Prado, L.P., Brandão, C.R.F., de Albuquerque, E.Z., Morini, M.S.C., Delabie, J.H.C., dos Santos Monteiro, E.C. and Emanuel Oliveira Alves, A., 2022. **ATLANTIC ANTS: a data set of ants in Atlantic Forests of South America.**
<https://doi.org/10.1002/ecy.3580>

Abstract

Ants, an ecologically successful and numerically dominant group of animals, play key ecological roles as soil engineers, predators, nutrient recyclers, and regulators of plant growth and reproduction in most terrestrial ecosystems. Further, ants are widely used as bioindicators of the ecological impact of land use. We gathered information of ant species in the Atlantic Forest of South America. The ATLANTIC ANTS data set, which is part of the ATLANTIC SERIES data papers, is a compilation of ant records from collections (18,713 records), unpublished data (29,651 records), and published sources (106,910 records; 1,059 references), including papers, theses, dissertations, and book chapters published from 1886 to 2020. In total, the data set contains 153,818 ant records from 7,636 study locations in the Atlantic Forest, representing 10 subfamilies, 99 genera, 1,114 ant species identified with updated taxonomic certainty, and 2,235 morphospecies codes. Our data set reflects the heterogeneity in ant records, which include ants sampled at the beginning of the taxonomic history of myrmecology (the 19th and 20th centuries) and more recent ant surveys designed to address specific questions in ecology and biology. The data set can be used by researchers to develop strategies to deal with different macroecological and region-wide questions, focusing on assemblages, species occurrences, and distribution patterns. Furthermore, the data can be used to assess the consequences of changes in land use in the Atlantic Forest on different ecological processes. No copyright restrictions apply to the use of this data set, but we request that authors cite this data paper when using these data in publications or teaching events.

- 2) Prato, A., da Silva, R. C., Assis, D. S., Mateus, S., Hartfelder, K., & do Nascimento, F. S. (2021). **Juvenile hormone affects age polyethism, ovarian status and cuticular hydrocarbon profile in workers of the wasp *Polybia occidentalis*.** Journal of Experimental Biology, 224(13), jeb240200.

Abstract

Division of labor is one of the most striking features in the evolution of eusociality. Juvenile hormone (JH) mediates reproductive status and aggression among nestmates in primitively eusocial Hymenoptera (species without morphologically distinct castes). In highly social species it has apparently lost its gonadotropic role and primarily regulates the division of labor in the worker caste. *Polybia occidentalis*, a Neotropical swarm-founding wasp, is an ideal model to understand how JH levels mirror social context and reproductive opportunities because of the absence of a clear morphological caste dimorphism. In this study, we tested the hypothesis that JH influences division of labor, ovary activation and cuticular hydrocarbon profiles of workers. Our observations confirmed that a JH analog (methoprene) and an inhibitor of JH biosynthesis (precocene)

affected the cuticular chemical profile associated with age polyethism. Also, Methoprene and precocene-I treatment of females influenced ovarian activation differently (individuals treated with methoprene expressed more activated ovaries while precocene treatment did not have significant effect). These results suggest that different hormonal levels induce a differential expression of cuticular chemicals associated with workers' age polyethism, which may be essential for keeping the social cohesion among workers throughout their lives in the colony. Furthermore, JH is likely to play a gonadotropic role in *P. occidentalis*. JH has apparently undergone certain modifications in social Hymenoptera, presenting multifaceted functions in different species.



Diego Assis <santanaphoenix@gmail.com>

[Sociobiology] Editor Decision

6 mensagens

Kleber Del-Claro <ojs@uefs.br>

21 de julho de 2023 às 08:44

Para: Diego Santana Assis <assis.entomo@gmail.com>, Skylar Brodowski <skye.broductie@gmail.com>, Gabriel Asher Newsome <NewsomeG@si.edu>, Fabio Santos do Nascimento <fsnascim@usp.br>, Ted Schultz <schultz@si.edu>

Diego Santana Assis, Skylar Brodowski, Gabriel Asher Newsome, Fabio Santos do Nascimento, Ted Schultz:

We have decided on your submission to Sociobiology, "Environment influences the volatiles of fungus gardens in the colonies of fungus-farming ants".

EDITOR'S EVALUATION:

Our decision is: ACCEPT THE MANUSCRIPT - after REVISIONS REQUIRED

REMINDER TO EDITORS:

Please import the reviews and make them available to the authors.

Tutorial video for Section Editors (Making a decision)

https://www.youtube.com/watch?v=X_E7A3q7mQU

REMINDER TO AUTHORS:

Now, you must present a final version of your article. We ask you to carefully analyze the comments of the reviewers and the editor to improve your article.

Follow the formatting requirements in the Authors' Guidelines in SECTION 2 – Accepted Manuscripts

<http://periodicos.uefs.br/index.php/sociobiology/about/submissions>.

- Pay special attention to the guidelines for References and Authors' Contribution Sections.
- The correct formatting of your article will speed up the copyediting and typesetting work and shorten publication time.
- It is very important that you return a revised version of the manuscript within the next 30 days to help us publish the paper as soon as possible.
- Please see the instructions in this video on uploading a revised version of your manuscript.

Este artigo já foi submetido e estamos aguardando as informações de DOI e possível data de publicação.

Artigos preparados ou em fase de preparação para submissão

1) Commensalism among fungus-growing ants

Authors: Assis*, DS; Sousa, RL; Kooij, PW.

Centro de Estudos de Insetos Sociais, Universidade Estadual Paulista, campus Rio Claro
Department of General and Applied Biology, São Paulo State University (UNESP), Rio Claro, SP, Brazil.

* Corresponding author: Diego S Assis (ds.assis@unesp.br)

Revista pretendida: Insectes Sociaux

2) Not so sweet: preferences of fungus-growing ants for polyols

Authors: Assis*, DS; Silva, RA; Rodrigues, A; Bacci, M

Centro de Estudos de Insetos Sociais, Universidade Estadual Paulista, campus Rio Claro
Department of General and Applied Biology, São Paulo State University (UNESP), Rio Claro, SP, Brazil.

* Corresponding author: Diego S Assis (ds.assis@unesp.br)

Revista pretendida: Behavioural Ecology and Sociobiology

***Sendo finalizado

3) Parasitic fungi of *Leucoagaricus gongylophorus* use polyols to accelerate sporulation within colonies of fungus-growing ants.

Authors: Assis*, DS; Cruz, MO, Rodrigues, A; Bacci, M

Centro de Estudos de Insetos Sociais, Universidade Estadual Paulista, campus Rio Claro
Department of General and Applied Biology, São Paulo State University (UNESP), Rio Claro, SP, Brazil.

Corresponding author: Diego S Assis (ds.assis@unesp.br)

Revista pretendida: Frontiers in Microbiology

***Sendo finalizado

4) Mutualistic fungi of ants can produce different enzymes for the same secondary metabolites

Authors: Assis*, DS; Ferro, M; Bacci, M

Centro de Estudos de Insetos Sociais, Universidade Estadual Paulista, campus Rio Claro

Department of General and Applied Biology, São Paulo State University (UNESP), Rio Claro, SP, Brazil.

Corresponding author: Diego S Assis (ds.assis@unesp.br)

Revista pretendida: Behavioural Ecology and Sociobiology

***Sendo finalizado

Palestras Ministradas na Instituição de Origem



**UNIVERSIDADE ESTADUAL
PAULISTA**
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Instituto de Biociências – Campus de Rio
Claro



DECLARAÇÃO

Eu, André Rodrigues, declaro para os devidos fins que, **Diego Santana Assis**, portador do CPF 087.989.926-35, ministrou a palestra “Formigas cultivadoras de fungo: o estado da arte”, no dia 01/11/2022, no Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Rio Claro, SP. A palestra foi ministrada para estudantes de pós-graduação e de graduação do Instituto, como parte das atividades do grupo de pesquisa do Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos, o qual coordeno.

Cordialmente,

Rio Claro, 25 de setembro de 2023.

Documento assinado digitalmente
gov.br ANDRE RODRIGUES
Data: 25/09/2023 11:54:50-0300
Verifique em <https://validar.itu.gov.br>

Prof. Dr. André Rodrigues

Departamento de Biologia Geral e Aplicada
UNESP – IB – Câmpus de Rio Claro, Rio Claro, SP.
andre.rodrigues@unesp.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro
Seção Técnica de Pós-Graduação



ATESTADO

ATESTO que o **Dr. Diego Santana Assis** ministrou, no dia 25/08/2023, a palestra intitulada "Evolução dos hidrocarbonetos cuticulares em formigas cultivadoras de fungos", como parte das atividades da disciplina "Seminários em Biologia Celular, Molecular e Microbiologia II" (BCM00033), obrigatória para os discentes do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular, Molecular e Microbiologia), deste Instituto.

Rio Claro, 28 de agosto de 2023

Documento assinado digitalmente
gov.br MAURICIO BACCI JUNIOR
Data: 28/08/2023 14:24:02-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Dr. Maurício Bacci Júnior

Coordenador do Programa

Relatório Processo Fapesp 2020/12423-7

Beneficiário: Diego Santana Assis

Responsável: Maurício Bacci Jr

Resumo Projeto

As formigas da subtribo Attina (Formicidae: Myrmicinae), conhecidas como Formigas cortadeiras estão distribuídas no Continente Americano, com a maioria das espécies na América do Sul. Ocorrem em 15 gêneros e mais de 250 espécies. As formigas cortadeiras durante sua história evolutiva desenvolveram uma relação mutualista com fungos Basidiomycetos (Leucocoprineae: Agaricaceae). Os fungos digerem uma variedade de substratos proporcionados pelas formigas dentro dos seus ninhos, formando o chamado “Jardim de fungos”, e as formigas se alimentam desses fungos. Durante o processo de digestão dos substratos os fungos produzem diversos metabolitos secundários. No caso específico de *Atta bisphaerica*, o fungo degrada monocotiledôneas em monossacarídeos e diversos polióis. Os polióis dois deles com altíssimo valor econômico. Além dos fungos de formigas cortadeiras, que digerem folhas frescas, existem outros quatro grupos de fungos associados a attinas que são especialistas em digerir diferentes tipos de biomassa: sementes, carcaças de insetos, fezes de insetos, folhas e flores que caem das plantas, monocotiledôneas, dicotiledôneas. As enzimas e os produtos destes processos metabólicos não são conhecidos, não se sabe se esses quatro especialistas geram também polióis, que podem ser estocados em grandes quantidades sem causar alterações osmóticas relevantes, não são facilmente assimiláveis por microrganismos invasores, podem estabilizar exoenzimas digestórias dos jardins e são fontes nutricionais para as formigas. Vantagens como estas fazem da produção de polióis uma importante inovação para o mutualismo entre as formigas e fungos, cuja origem e evolução permanecem desconhecidas. Adicionalmente, os polióis podem representar um importante meio de comunicação química direcionando a preferência das formigas, o que é um fenômeno chave na origem do mutualismo. Buscando testar estas hipóteses e responder àquelas questões, o presente projeto de pós-doutorado tem os seguintes objetivos: (1) Determinar a diversidade, abundância e evolução da produção de polióis nas attíneas; (2) Determinar a participação dos polióis como mediadores da comunicação química entre os mutualistas.

Projeto FAPESP no qual se inseriu a presente proposta O presente projeto de pós-doutorado se enquadrou especificamente no Objetivo 3 “Aim 3: Determine the chemical ecology mediating interactions in the fungus-farming ant symbiosis”, proposto no seguinte projeto temático: 2019/03746-0 Auxílio Pesquisa - Programa Biota – Projeto Temático: Pesquisa Colaborativa: Dimensions US-São Paulo: Integrando filogenia, genética e ecologia química para desvendar a emaranhada simbiose multipartida das formigas cultivadoras de fungos. Pesquisadores Principais: André Rodrigues (Unesp, Rio Claro) e Bryn Dentinger (University of Utah). E este projeto faz parte do projeto CEPID (2021/10639-5) dentro da área: “Work Pack 4 - Microbiome diagnosis for natural and sustainable solutions” – CEPID, intitulado Center for Research on Biodiversity Dynamics and Climate Change; sob comando dos pesquisadores Dr^a. Patrícia Morellato e Dr. Maurício Bacci Jr., ambos da Unesp Rio Claro.

Introdução

Attinas: As formigas apresentam grande sucesso ecológico e ocupam a maioria dos habitats terrestres (Hölldobler & Wilson, 1990). Dentro desse grupo as formigas da subtribo Attina (Formicidae: Myrmicinae), ou attinas, estão distribuídas no Continente Americano, com a maioria das espécies na região neotropical (Hölldobler & Wilson, 1990). Atualmente existem 17 gêneros e 253 espécies (Schultz, 2022), todas dependentes, para sua nutrição, de fungos mutualistas que cultivam em uma variedade de substratos no interior de seus ninhos (Hölldobler & Wilson, 1990; Schultz & Brady, 2008; Weber, 1972). Filogeneticamente, as Attini são divididas em: basalmente ou apicalmente derivadas com base em análises de DNA mitocondrial e morfologia larval (Schultz & Brady, 2008), ou em Paleoattini ou Neoattini (Schultz & Brady, 2008), com base em sequências de genes nucleares. Dentro desses grupos, identificam-se cinco sistemas de agricultura (fungiculturas), definidos de acordo com a afiliação filogenética dos fungos mutualistas (Schultz & Brady, 2008): (A) agricultura das cortadeiras, (B) agricultura derivada, (C) agricultura de leveduras, (D) agricultura basal, (E) agricultura de fungos corais (Fig. 1). A relação simbiótica entre formigas attinas e seus fungos cultivados possibilita a sobrevivência e o sucesso ecológico dessas formigas, resultando em interações bioquímicas complexas dentro dos ninhos.

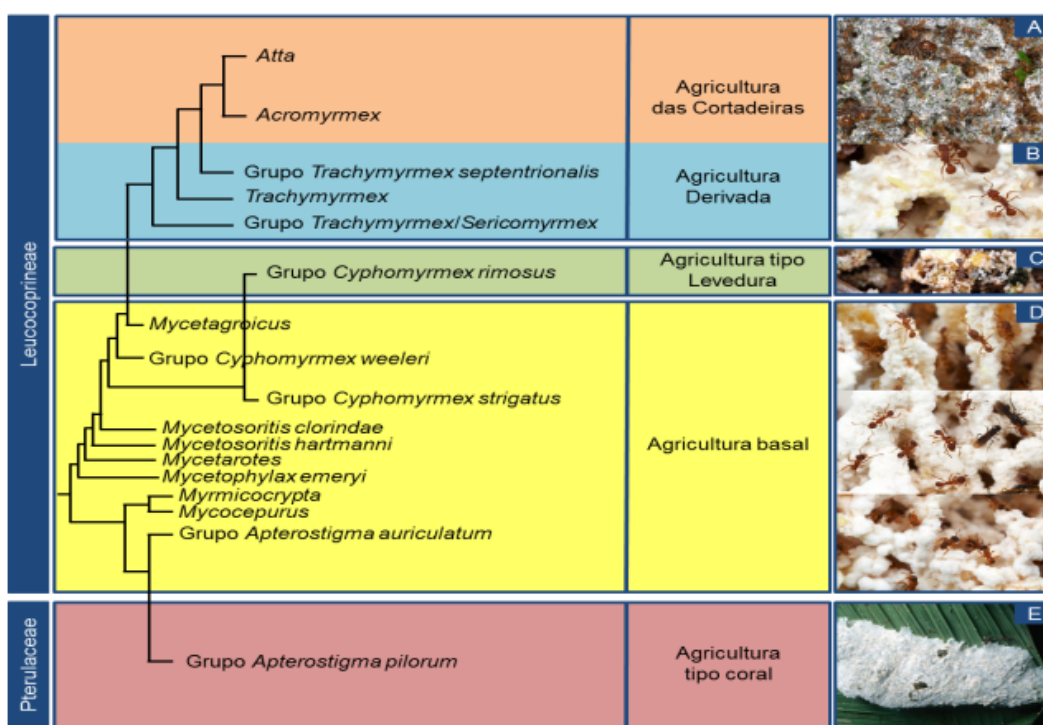


Figura 1. Filogenia das formigas Attini e os cinco tipos de agricultura. Os tipos de agricultura estão separados por retângulos coloridos, cada um correspondendo a um grupo filogeneticamente distinto de fungos mutualistas. (A) Agricultura das cortadeiras: jardim de fungo de *Atta* (Wild, 2001); (B) Agricultura derivada: jardim de fungo de *Trachymyrmex* (Wild, 2001); (C) Agricultura tipo levedura: jardim de fungo de *Cyphomyrmex* (Wild, 2001); (D) Agricultura basal: jardins de fungo de *Mycocephurus*, *Mycetarotes* e *Cyphomyrmex* (Wild, 2001); (E) Agricultura tipo coral: jardim de fungo de *Apterostigma* (Schultz & Brady, 2008). Figura adaptada por Ana Carolina Marchiori a partir da original produzida por Mehdiabadi & Schultz, 2010

Polióis dentro da colônia de formigas: Os polióis, também conhecidos como álcoois de açúcar, são metabólitos secundários, de grande relevância biológica e

industrial, produzidos por uma ampla variedade de fungos (Jennings, 1985). Além de atuar como intermediários metabólicos, os polióis são elementos-chave para a adaptação dos fungos a diferentes condições ambientais (Calmes et al., 2013; Jennings, 1985), funcionando como fontes de energia e osmoprotetores, protegendo contra estresses osmóticos decorrentes de variações hídricas (Jennings, 1985; Kosugi et al., 2013; Rice et al., 2020), o que contribui para sua sobrevivência e adaptabilidade em habitats diversos (Patel & Williamson, 2016; Rice et al., 2020).

No contexto da simbiose entre fungos e formigas cortadeiras, a produção de polióis assume um papel estratégico. Fungos cultivados por formigas, como *Leucoagaricus gongylophorus* e *Leucocoprinus* sp., sintetizam polióis que não apenas sustentam seu próprio metabolismo, mas também influenciam a nutrição e o comportamento das formigas hospedeiras. Estudos recentes têm demonstrado que a capacidade de síntese de polióis varia entre espécies de fungos mutualistas, refletindo adaptações específicas aos seus respectivos hospedeiros e ambientes (Assis et al. 2025 no prelo). Por exemplo, *Leucocoprinus* sp. expressa uma gama ampla de enzimas envolvidas na produção de xilitol e arabitol, enquanto *L. gongylophorus* se especializa nas sínteses de sorbitol, manitol e inositol (Assis et al. 2025 no prelo). Essas variações metabólicas podem estar relacionadas à estabilidade ambiental garantida pelas formigas cortadeiras e à especialização desses fungos em nichos ecológicos distintos ou a diferenças fisiológicas e evolutivas dos fungos.

Produção de polióis como inovação estratégica para o mutualismo: As formigas cortadeiras são as mais derivadas entre as attinas e seus ninhos apresentam um sistema altamente eficiente para a degradação de material vegetal (Somera et al., 2015). Em *Atta bisphaerica*, por exemplo, os fungos degradam monocotiledôneas em monossacarídeos e polióis (Somera et al., 2015), dois produtos de altíssimo valor econômico. Os fungos cultivados por formigas produzem e acumulam compostos de baixo peso molecular para lidar com situações de estresse (Meena et al., 2015). Estes compostos são chamados de "solutos compatíveis", por não inibirem o metabolismo, ainda que presentes em altas concentrações intracelulares. Solutos compatíveis incluem álcoois derivados de açúcares (polióis), compostos de amônio quaternário, prolina e compostos sulfônicos terciários (Seekles et al., 2023). Os álcoois derivados de açúcares (tais como glicerol, manitol, arabitol e sorbitol) correspondem à forma quimicamente reduzida de uma aldose ou de uma cetose, acumulam energia livre e mantêm uma esfera de hidratação ao redor de moléculas. Eles podem ainda agir como sequestradores de espécies reativas de oxigênio (ROS), prevenindo peroxidação de lipídios que poderiam causar danos celulares (Stoop et al., 1996; Saha & Racine, 2011).

Nos ninhos de *Atta bisphaerica* ao menos 70% da biomassa vegetal, composta principalmente por amido e hemicelulose, é transformada em monossacarídeos e polióis pelos microorganismos simbiotes. Em laboratório, a produção pode ser canalizada preferencialmente para a produção de glicose e xilose ou dos polióis manitol e arabitol (Fig. 2).

Sistemas attíneos inspiram a biotecnologia: O consumo microbiano dos polióis gerados nos ninhos é mínimo (Somera et al., 2015) o que indica que as enzimas envolvidas no processo não são submetidas à severa repressão catabólica (Silva et al., 2006). Este mecanismo provavelmente evoluiu garantir o estoque de carbonos que servem à nutrição das formigas (Bacci et al., 2013). Esta característica tem um enorme potencial biotecnológico, especialmente para a produção sustentável de biocombustíveis. A hidrólise de polissacarídeos vegetais é uma limitação no processo de produção de

biocombustíveis a partir de biomassa vegetal. Isto porque a hidrólise química é economicamente dispendiosa e a hidrólise microbiana pode ser pouco rentável, devido ao consumo de parte dos produtos gerados pelos micro-organismos (Lynd et al., 2002).

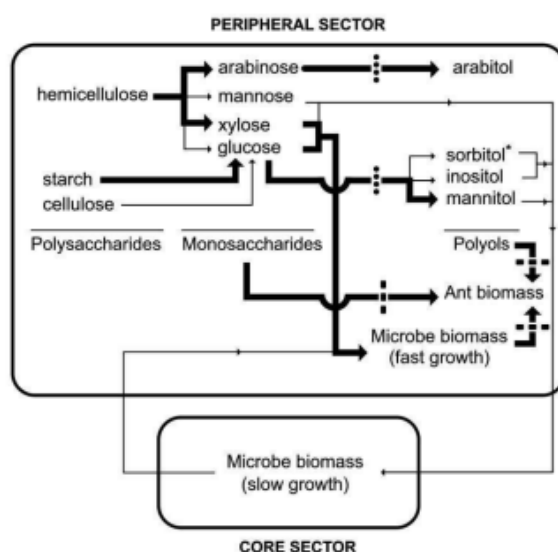


Figura 2: Fluxo de carbonos nos jardins de fungos de formigas cortadeiras e manipulação deste fluxo para gerar produtos de valor econômico. No setor periférico dos jardins, os polissacarídeos vegetais são degradados em monossacarídeos, e alguns destes monossacarídeos são reduzidos a polióis. O fungo mutualista *Leucoagaricus gongylophorus* produz a maioria dos polióis, enquanto sorbitol (*) é produzido por um micro-organismo ainda não identificado. As setas mais grossas indicam os passos metabólicos prevalentes quantitativamente. Alguns polióis sustentam o crescimento lento da biomassa microbiana no setor interno dos jardins. Porções de hifas de *L. gongylophorus*, estocadas no setor interno, são transferidas pelas formigas para crescer rapidamente nos fragmentos de folhas recentemente incorporados no setor periférico. As formigas alimentam-se de biomassa fúngica, monossacarídeos e polióis. A remoção artificial das formigas dos ninhos de laboratório bloqueia o fluxo de carbonos que ocorreria para a biomassa dos insetos (linhas tracejadas), induzindo o rápido acúmulo de monossacarídeos, polióis e biomassa microbiana. A inibição da respiração microbiana induzida por azida sódica bloqueia a produção de polióis (linha pontilhada), causando o rápido acúmulo de monossacarídeos. A manipulação laboratorial dos fluxos de carbonos nos jardins de fungos das formigas cortadeiras podem ser úteis para processos biotecnológicos para gerar tanto polióis como monossacarídeos, estes últimos úteis para a geração de biocombustíveis. Tanto estes como os polióis têm alto valor de mercado (figura extraída de Somera et al. (2015)).

Os polióis produzidos nos ninhos das formigas são altamente valorizados no mercado. O manitol e arabitol alcançam valores de 100 e 500 milhões de dólares anuais, respectivamente (Bhatt et al., 2013). Estes compostos têm diversas aplicações industriais; Indústria alimentícia: aditivos de alimentos, adoçantes de baixa caloria, agentes texturizantes; Indústria farmacêutica: formulação de fármacos e produção de fluidos intravenosos; Indústria química: precursores de resinas e polímeros sintéticos (Chen et al., 2010; Saha e Racine, 2010). Atualmente, a produção industrial da maior parte do polióis ocorre por redução catalítica de açúcares em alta temperatura e pressão, o que requer açúcares altamente puros e dispendiosos passos de purificação cromatográficos (Kumdam et al., 2013; Zhang et al., 2014). Ultimamente, os processos de bioconversão ou biotransformação utilizando bactérias e leveduras têm sido uma alternativa eficiente e de baixo custo para a produção de polióis (Monedero et al., 2010; Kordowska-Wiater, 2015). Em nosso trabalho sobre a caracterização da produção de polióis em *Atta bisphaerica* (Somera et al., 2015), as técnicas analíticas foram direcionadas para identificar os produtos de hidrólise de polissacarídeos vegetais e alguns polióis. No entanto, ainda não foram avaliados outros possíveis produtos gerados nos ninhos das

formigas, o que limita a análise completadas potenciais aplicações biotecnológicas dos jardins de fungos.

Metodologia

Rota metabólica da produção utilizando transcritos

Os fungos *L. gongylophorus* e *Leucocoprinus* sp. foram cultivados em meio Yeast Nitrogen Base (Thermo Fischer Scientific, Q30009) contendo 1,0 g/100 mL de amido como única fonte de carbono. Os dados transcriptômicos foram gerados pela MacroGen Inc. utilizando a plataforma HiSeq 2000, com leituras pareadas de 100 pb. A qualidade das sequências e a identificação de sequências super-representadas foram determinadas utilizando o FASTQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Para o processamento das leituras o Fastx_trimmer (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/index.html) foi utilizado para remover os primeiros 15 nucleotídeos de todas as leituras, e o SeqyClean (<https://github.com/ibest/seqyclean>) foi empregado para eliminar leituras brutas de baixa qualidade (pontuação Phred Q < 30).

Após o pré-processamento, a montagem de sequências de alta qualidade foi realizada com Trinity, aplicando normalização digital para reduzir a redundância e melhorar a qualidade de montagem dos transcritos, com cobertura mínima de 20X. A completude da montagem foi avaliada pelo BUSCO, utilizando bancos de dados de ortólogos universais de cópia única Fungi_odb10 (OrthoDB). Para minimizar a redundância, o CD-HIT-EST foi aplicando usando um limiar de similaridade de 90%.

A anotação dos genes foi realizada com o OmicsBox utilizando BlastX, com um valor de E de 1e-05 contra o banco de dados não redundante do NCBI. A classificação funcional dos genes foi realizada de acordo com os termos do Gene Ontology, categorizados em: Processos Biológicos, Função Molecular e Componentes Celulares. Além disso, O software InterProScan foi utilizado para identificar domínios proteicos, enquanto o OmicsBox atribuiu termos da Comissão de Enzimas (EC). Para identificar enzimas envolvidas na produção de polióis, realizamos: buscas manuais por palavras-chave em listas de genes de ambas as espécies de fungos, com base em revisões da literatura sobre vias metabólicas de polióis, e Busca BlastN utilizando sequências fúngicas conhecidas (Tabela 1) com um valor de E de corte de 1e-05, contra o banco de dados não redundante do NCBI, para identificar transcritos enzimáticos. Os transcritos enzimáticos identificados de vias biossintéticas completas de polióis indicaram a capacidade dos fungos de produção desses compostos. Por fim, utilizamos o OmicsBox para mapear os transcritos dos fungos mutualistas contra dados genômicos de *L. gongylophorus* cultivados por *Atta colombica* e *Atta mexicana*.

Crescimento dos mutualistas em diferentes meios

Os fungos mutualistas de formigas cultivadoras, *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer, 1986), *Leucocoprinus atinorum* (Urrea-Valência et al., 2023) e *Myrmecopterula* sp. (Leal-Dutra et al., 2020), foram primeiramente isolados dos respectivos jardins. Após

a identificação taxonômica realizada pelos especialistas do Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos (LESF), da Unesp em Rio Claro, os fungos foram armazenados em placas de Petri com meio de cultivo PDA (Potato Dextrose Agar, Neogen®) em BOD a 25 °C, sendo replicados mensalmente para os trabalhos. Para avaliar o crescimento dos fungos, foram utilizados meios de cultura em placas com diferentes compostos (0,1 mol/L): 1) Manitol (selecionado com base em resultados prévios que indicaram o aumento da esporulação em fungos oportunistas com esse poliol), 2) Celulose, 3) Frutose, 4) Glicose e 5) Controle (sem suplementação). Os meios foram preparados com ágar (1,5%) e com a suplementação dos compostos citados acima. O crescimento dos fungos foi monitorado por 45 dias, com medições do raio do crescimento a cada 3 dias. Para a estatística, os dados do último dia de crescimento dos fungos (Dia 45) foram analisados com um teste de análise de variância (ANOVA), seguido por um teste post-hoc EMMEANS (Searle *et al.*, 1980) com a correção de taxa de falsa descoberta (fdr). Além disso, foi criado um gráfico para demonstrar o crescimento dos fungos durante o período analisado (Fig. 8), e a análise de crescimento dos fungos foi feita com o auxílio do pacote “nparLD” para análises não paramétricas com medidas repetida, para os modelos significativos uma análise *pairwise* com o auxílio do pacote “nparcomp” com o método de Tukey foi realizada. As análises foram feitas no software R (v 4.3.3) (R Core Team, 2023).

Deteção de Manitol no fungo mutualista isolado

Para a detecção da produção de manitol, foram selecionados fungos de três diferentes espécies, cada um associado a um tipo distinto de cultivo: *Leucoagaricus gongylophorus*, fungo mutualista de *Atta sexdens* (neoattina); *Leucocoprinus atinorum*, fungo mutualista de *Mycocepurus goeldii* (paleoattina), e *Myrmecopterula* sp., fungo mutualista de *Apterostigma* sp. – (paleoattina).

Os fungos foram cultivados em meio líquido Potato Dextrose Broth (PDB, Neogen® Culture Media, Lansing, MI, EUA), em trélicas. Para cada cultura: Três discos contendo hifas de fungo crescidos em PDA (Potato Dextrose Agar, Neogen®, meio sólido) de 8 mm de diâmetro foram retirados de culturas com crescimento fúngico vigoroso (aproximadamente 0,13 g cada). Os discos foram transferidos para frascos contendo 200 mL de meio líquido PDB. Os frascos foram incubados por 15 dias em agitador orbital, sobre condições controladas (25 °C e 110 RPM).

Após o período de incubação, os meios de cultivo foram sequencialmente filtrados a vácuo utilizando membranas de diferentes porosidades: 0,95; 0,7 e 0,45 µm. O filtrado recuperado foi centrifugado a 10.000 RPM por 10 minutos e armazenado a -20 °C até a realização das análises de produção de manitol.

A análise dos filtrados foi conduzida por espectrofotometria, utilizando o kit D-Manitol (Megazyme, Bray, Co. Wicklow, Irlanda), seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante. O kit é composto por uma solução tampão (pH 9), NAD⁺, suspensão de manitol desidrogenase e solução padrão de manitol. A concentração de manitol foi determinada com base no coeficiente de extinção do NADH, medido pelo aumento da absorbância a 340 nm. Inicialmente, foram pipetados em cubetas 2 mL de água destilada, 0,10 mL do filtrado da cultura fúngica, 0,10 mL do tampão e 0,10 mL de NAD⁺ [Solução A1]. A absorbância da Solução A1 foi avaliada após 2 minutos sob luz monocromática.

Em seguida, 0,02 mL da suspensão de manitol desidrogenase foi adicionado à Solução A1, que passou a ser denominada Solução A2. A leitura da absorbância da Solução A2 foi realizada ao final da reação (4 minutos). Cada amostra foi acompanhada de um branco (sem o filtrado da cultura). A diferença de absorbância entre a amostra e o branco foi utilizada para calcular o valor de ΔA -D-manitol, necessário para a determinação da concentração de manitol. O cálculo foi realizado utilizando a equação proposta pelo fabricante do Kit de detecção (Equação 1):

$$C = \frac{V \times MW \times \Delta A}{\epsilon \times d \times v} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

V = volume final [mL]

MW = peso molecular da substância a ser analisada [g/mol]

ϵ = coeficiente de extinção do NADH a 340 nm = 6300 [L·mol⁻¹·cm⁻¹]

d = caminho óptico [cm]

v = volume da amostra [mL]

Para facilitar o cálculo, foi utilizada a planilha disponibilizada pelo fabricante (pode ser acessada via https://www.megazyme.com/documents/Data_Calculator/K-MANOL_CALC.xlsx). A solução padrão de manitol foi empregada para verificar a precisão do espectrofotômetro e para confirmar a ausência de inibição da absorbância por substâncias presentes na amostra.

Após o crescimento em meio líquido, a massa do fungo foi mensurada. Para isso o fungo foi transferido para quadrados de papel filtro de 10x10 cm e deixados a temperatura ambiente por 5 minutos, para que houvesse perda da umidade, tanto pelo fator de tempo quanto pelo fator de absorção do papel filtro. Em seguida, a massa dos fungos foi determinada e a diferença no crescimento do fungo foi analisada por meio de um teste ANOVA com nível de significância de 5% (alfa=0,05). Os discos de crescimento foram separados das amostras e pesados, essa diferença foi extraída do peso final do fungo.

Crescimento dos fungos oportunistas no extrato de *Leucoagaricus gongylophorus* e produção de Manitol

Para determinar se o extrato do jardim do fungo mutualista de *Leucoagaricus gongylophorus* poderia servir como uma fonte de carbono para o crescimento dos fungos oportunistas/parasitas, foi realizada uma extração com água destilada, como uma espécie de lavagem superficial do fungo. O extrato foi preparado na proporção de 5 g de jardim de fungo para um litro de água destilada. O jardim de fungo foi coletado de uma colônia de *Atta sexdens* no campus da Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo (Figura 3). Após a coleta o jardim foi mantido em laboratório por dois dias para que as operárias realizassem uma limpeza, removendo terra e outras impurezas presentes. Após este período, o jardim foi deixado durante 2 horas a 4 °C para que as operárias entrassem em estado de hibernação. As operárias foram gentilmente removidas do jardim com auxílio de pinças entomológicas. Foram pesados 10 gramas de jardim e a massa foi transferida para um frasco Scott de um litro para extração. O frasco foi agitado manualmente por cinco minutos. Após a agitação, o volume foi filtrado em filtro de papel

filtro de porosidade 0,9 µm em um Becker de dois litros e foi adicionado um litro de água para obter a concentração de 5 gramas de jardim por litro de solvente (5g/L de água). Além do extrato do jardim de fungo, também foi preparado o controle com utilização do composto PDB (Potato Dextrose Broth, Neogen®), que é utilizado para o crescimento de fungos em laboratório em meio líquido, na proporção pedida pelo fabricante de 24 gramas por litro de água.



Figura 3. Jardim de fungo de *Atta sexdens* coletado para preparação dos extratos.

Nós utilizamos os fungos oportunistas de *L. gongylophorus*, *Escovopsis* sp. e *Trichoderma* sp., que são atualmente os mais estudados dentro do mutualismo entre formigas cultivadoras e fungos (Birnbaum & Gerardo, 2016; Rocha *et al.*, 2017) como oportunistas/parasitas do sistema de formigas cultivadoras de fungos. Os fungos oportunistas/parasitas foram obtidos da coleção do Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos da Unesp em Rio Claro. Os fungos foram reativados e inoculados em meio de PDA (Potato Dextrose Agar, Neogen ®) e mantidos a 25 °C por 10 dias; quando obtivemos um crescimento

vigoroso nas placas de cultura, foram retirados pequenos círculos de 8 mm de diâmetro, que foram transferidos para as soluções de crescimento. A solução de PDB foi esterilizada em autoclave seguindo o protocolo estabelecido pelo Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos da Unesp Rio Claro, porém o extrato obtido da lavagem do fungo não foi autoclavado para evitar possíveis mudanças na composição dos açúcares presentes na solução. Os fungos foram cultivados em meio líquido a 25 °C por 10 dias, após este período a solução foi filtrada para separar as hifas dos discos iniciais. A massa das hifas foi seca por 24h em estufa a 50°C e então pesadas em balança de precisão.

O líquido foi filtrado seguindo a metodologia descrita na seção anterior (Detecção de Manitol no fungo mutualista isolado) para quantificar a produção de manitol por parte dos fungos, e armazenado em freezer -20°C até a data da quantificação. Por fim, as massas dos fungos foram analisadas estatisticamente, utilizando análises de variância (ANOVA) para possíveis diferenças na produção de manitol nos diferentes meios.

‘Fingerprint’ de Manitol no jardim de fungos via LC-RID

A identificação dos monossacarídeos e polióis presentes em cada extrato realizada por meio de análises cromatográfica líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção por índice de refração (LC-RID). As análises foram conduzidas em um LC-RID (Liquid Chromatography Refractive Index Detection) (Agilent 1200 series) equipado com a coluna Phenomenex Rezex RPM – Monosaccharide Pb+2 (8%) (Phenomenex, Torrance, CA – EUA). As condições de análise foram: temperatura da coluna: 85 °C, volume de injeção: 5 µL em uma fase móvel isocrática (1 mL.min⁻¹) de água como

proposta por Somera et al. (2015). As análises foram realizadas na Universidade de Campinas (Unicamp) no Departamento de Química na Central Analítica.

Resultado e Discussão

Rota metabólica para produção de polióis: Os dados obtidos foram tratados e permitiram a construção de uma montagem genômica de alta qualidade tanto para *Leucocoprinus* sp. quanto para *Leucoagaricus gongylophorus*, uma vez que a maioria das sequências gênicas correspondia a sequências fúngicas completas (Fig. 4, A). A análise transcriptômica resultou na recuperação de mais de 150 milhões de leituras filtradas (Tabela 1), o que é necessário para detectar genes expressos. Com base na literatura sobre metabolismo fúngico, reconstruímos as vias biossintéticas de polióis e identificamos transcritos para a biossíntese de xilitol, arabitól, sorbitol, manitol e inositol em culturas de *Leucocoprinus* sp. cultivadas em amido. Por outro lado, em culturas de *Leucoagaricus gongylophorus* sobre as mesmas condições, encontramos apenas transcritos para a biossíntese de sorbitol, manitol e inositol (Fig. 4, B). Isso indica que *L. gongylophorus* não expressou muitas das enzimas para a biossíntese de xilitol e arabitól, como ALR, XDH, AR2DH e AR4DH, que estavam presentes em *Leucocoprinus* sp. (Fig. 4, B). Por fim, no genoma de *L. gongylophorus*, mutualista com *Atta colombica* ou *Atta mexicana*, identificamos a presença dos genes ALR, XDH, AR2DH e AR4DH, indicando que essa espécie possui potencial genético para a biossíntese de xilitol e arabitól, apesar de sua ausência de

expressão nas culturas analisadas (Tabela 2).

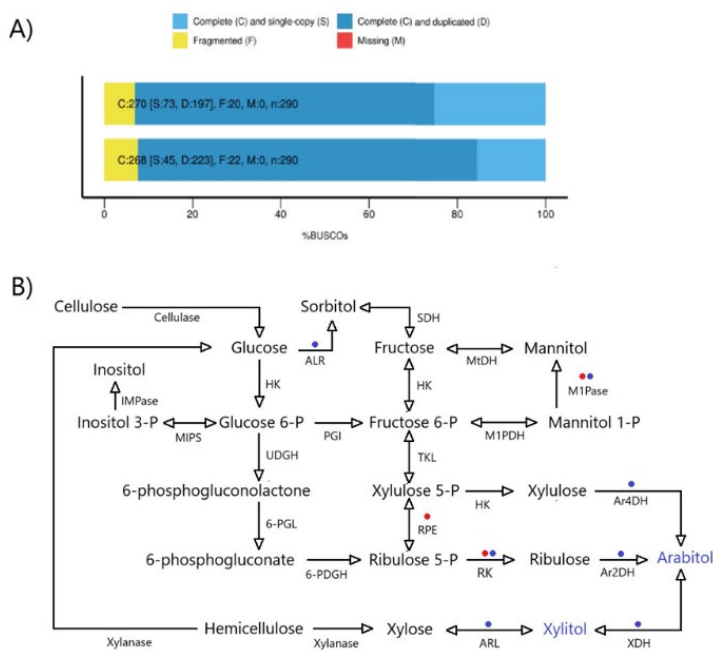


Figura 4. Resultados da avaliação BUSCO para os fungos mutualistas Paleoattina (*Leucocoprinus* sp.) ou Neoattina (*Leucoagaricus gongylophorus*) (A). Vias metabólicas de polióis em fungos mutualistas Paleoattina ou Neoattina com base em dados transcriptômicos (B). Montamos as vias metabólicas de polióis fúngicos e buscamos os transcritos de cada enzima nos fungos mutualistas. O círculo indica a ausência de transcrito no fungo mutualista Paleoattina *Leucocoprinus* sp. (vermelho) ou no mutualista Neoattina *Leucoagaricus gongylophorus* (azul). Xilanase [Endo-1,4-β-xilanase (EC:3.2.1.8)]; Xilitol desidrogenase, XDH (EC:1.1.1.9); Celulase [Endocelulases

(EC:3.2.1.4); β-Glicosidases (EC:3.2.1.21); Celulose 1,4-beta-celobiosidase (EC:3.2.1.91)]; Redutase de aldose, ALR (EC:1.1.1.21); Sorbitol desidrogenase, SDH (EC:1.1.1.14); Manitol desidrogenase, MtDH (EC:1.1.1.138); Manitol 1-fosfatase, M1Pase (EC:3.1.3.22); Manitol 1-fosfato 5-desidrogenase, M1PDH (EC:1.1.1.17); Glucose 6-fosfato isomerase, PGI (EC:5.3.1.9); Hexoquinase, HK (EC:2.7.1.1); Inositol monofosfatase, IMPase (EC:3.1.3.25); Inositol 3-fosfato sintase, MIPS (EC:5.5.1.4); Via das Pentoses Fosfato não oxidativa (PPP) [Transcetolase, TKL (EC:2.2.1.1); Ribulose-fosfato 3-epimerase, RPE (EC:5.1.3.1)]; Via das Pentoses Fosfato oxidativa [UDP-glucose 6-desidrogenase, UGDH (EC:1.1.1.22); 6-Fosfogluconolactonase, 6PGL (EC:3.1.1.31); Fosfogluconato desidrogenase (dependente de NADP+, descarboxilante), 6PDGH (EC:1.1.1.44)]; Ribulocinase, RK (EC:2.7.1.16); Ribulose fosfato 3-epimerase, RPE (EC:5.1.3.1); Xilulocinase, XK (EC:2.7.1.17); Arabitól-4 desidrogenase, Ar4DH (EC:1.1.1.11); Arabitól-2 desidrogenase, Ar2DH (EC:1.1.1.250). Observe que *Leucoagaricus gongylophorus*, o fungo mutualista com cortadeiras mais derivadas, não expressou ALR, XDH, Ar2DH e Ar4DH, necessários para a produção de xilitol e arabitól (destacados em azul). No entanto, *Leucocoprinus* sp., o fungo simbiote da Paleoattina *Mycocephurus goeldii*, expressou esses quatro genes.

Tabela 1. Dados transcriptômicos obtidos a partir de culturas laboratoriais de fungos mutualistas de formigas.

Parâmetro	Isolado simbiote fúngico: <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	Isolado simbiote fúngico: <i>Leucocoprinus sp.</i>
Pares de bases	16.661.050.092	15.682.369.384
Leituras filtradas	164.960.892	155.270.984
Q30 (%)	89,28	88,35
Contigs	56.725	90.451
Tamanho médio do contig	2.062,89	1.653,88
Conteúdo GC (%)	46,87	48,95
Contigs acima de 300 pb	53.718	82.940

Conseguimos montar as vias metabólicas para produção de polióis pelos fungos mutualistas das formigas (Figura 4, B), identificando transcritos relacionados a enzimas envolvidas nas vias anabólicas de xilitol, sorbitol, manitol, arabitól e inositol em culturas de fungos mutualísticos isolados dos jardins de fungos de paleoattinas. Essa identificação permitiu traçar vias metabólicas completas que conduzem os átomos de carbono provenientes da celulose e hemicelulose das plantas até os polióis nesses fungos (Figura 4, B), elucidando os mecanismos bioquímicos subjacentes à conversão de carboidratos vegetais em compostos de importância simbiótica.

No entanto, observamos que culturas de fungos mutualísticos associados a neoattinas não expressam enzimas cruciais para a biossíntese de xilitol e arabitól. A ausência dessa expressão enzimática pode refletir uma supressão transcricional específica, uma vez que os genes correspondentes estão presentes no genoma de *Leucoagaricus gongylophorus* (Tabela 2). Isso sugere uma regulação genética diferenciada, que pode afetar a capacidade metabólica e adaptativa desses fungos no ambiente simbiótico.

Além disso, é possível que essa supressão transcricional também ocorra no ambiente do ninho das formigas, já que o arabitól não foi detectado nos jardins de fungos, conforme aos resultados obtidos nas análises de ressonância magnética nuclear – RMN) (Relatório anterior). A ausência de arabitól nos jardins sugere que fatores ecológicos ou interacionais presentes no ninho podem influenciar a expressão gênica e, consequentemente, a via biossintética desse poliól. Essa descoberta abre perspectivas para investigar como as interações ecológicas dentro do ninho afetam a fisiologia fúngica e a dinâmica da simbiose entre formigas e fungos.

“Fingerprint” dos espectros dos jardins de fungos mutualistas: A análise das amostras por LC-RID revelou que apenas os picos de manitol e arabitol (Figura 5, A e B, respectivamente) estavam presentes, porém eluíram juntos no tempo de 15,6 minutos. Nossos resultados anteriores, obtidos por HPLC e RMN, já haviam confirmado a presença desses dois polióis nos jardins de fungos. Embora tenham sido detectados outros picos nas amostras de LC-RID, a quantidade foi menor em comparação com os dados obtidos durante a execução do relatório anterior, e esses picos não puderam ser identificados.

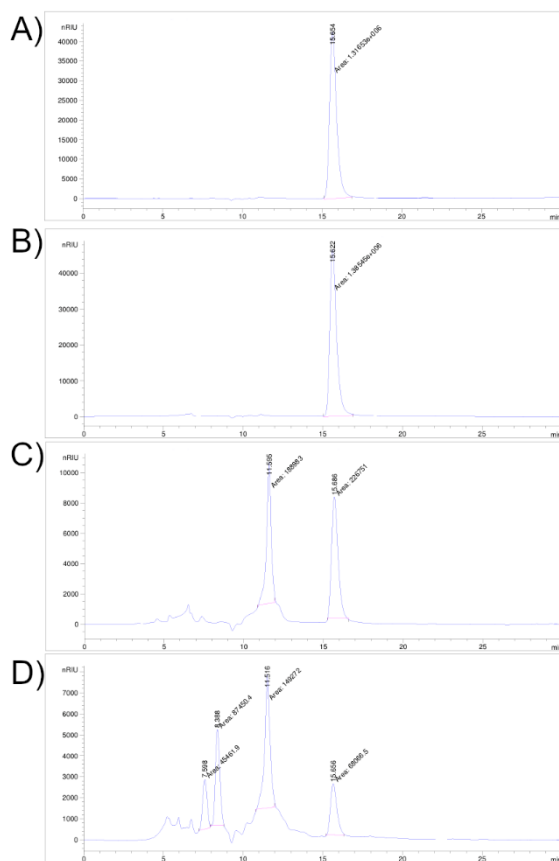


Figura 5. Espectros obtidos do A) Manitol; B) Arabitol; C) *Leucocoprinus attinorum*, mutualista de *Mycocephalus goeldii*; D) *Leucoagaricus gongylophorus*, mutualista de *Atta sexdens*. É possível observar que em fungos mais derivados há uma presença maior de compostos, que em basais. Porém, para os demais picos não foi possível a identificação. O composto Manitol pode ser visualizado em 15,6 min em ambos os jardins de fungos, de *Atta sexdens* e *Mycocephalus goeldii*.

Especificamente, o jardim de fungos da formiga *Atta sexdens*, apresentou quatro picos principais nas análises LC-RID (Figura 5, D), sendo que apenas o pico de 15,6 min coincidiu com os padrões de referência (Anexo, Figura 13). Já no caso do jardim de fungo da espécie *Mycocephalus goeldii* (Figura 5 C) foram detectados apenas dois picos principais: um correspondendo ao manitol/arabitol e outro ainda não identificado.

A análise do jardim de fungos de *Mycocephalus goeldii* revelou que 54% da área total de picos correspondem a produção de manitol/arabitol evidenciando que o jardim funciona como uma fábrica desse composto. Nossos resultados transcriptômicos indicam que o fungo mutualista, *Leucocoprinus attinorum*, possui as rotas metabólicas para produção de diversos tipos de polióis como sorbitol, inositol, xylitol e arabitol. No entanto, a ausência desses compostos nas análises pode estar relacionada a sua baixa produção, que pode ter sido mascarada pela alta produção de manitol/arabitol e pela presença de outros compostos não classificados como polióis.

Além da baixa produção dos demais polióis, o jardim de fungos é composto por diversos fungos oportunistas/parasitas (Birnbbaum & Gerardo, 2016) e bactérias (Martirena et al., 2023). Um estudo recente, realizado em colaboração entre o Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos e o Laboratório de Evolução Molecular, demonstrou que fungos oportunistas/parasitas produzem quantidades significativas de manitol (Figura 6), superando até mesmo a produção de *Leucoagaricus gongylophorus*. Como nossas análises não distinguem a origem do manitol entre fungos mutualista e oportunistas, os resultados refletem a produção total de manitol na colônia.

De acordo com Assis *et al.* (2025 *no prelo*), o manitol desempenha um papel fundamental na esporulação dos fungos oportunistas dentro da colônia de formigas cultivadoras de fungo. A produção de manitol pelos fungos oportunistas desempenha um papel importante na dinâmica de fungos oportunistas e os mutualistas das formigas dentro do jardim de fungos. A produção deste poliol pode conferir vantagens para os oportunistas/parasitas, aumentando a esporulação e permitindo que estes organismos proliferem na colônia o que pode, em alguns casos, levar a morte da colônia como um todo (Heine *et al.* 2018). No entanto, o crescimento excessivo de fungos oportunistas/parasitas na colônia pode comprometer a estabilidade do mutualismo com as formigas (Heine *et al.* 2018). Isso pode levar à seleção de mecanismos evolutivos defensivos por parte das formigas para mitigar sua proliferação (como a remoção seletiva de esporos ou modificações no jardim de fungos) (Little *et al.* 2006).

Nossos dados reforçam essa ideia, mostrando que, embora a formiga atue como cuidadora do fungo mutualista, a produção de manitol pelo fungo mutualista não favorece a própria formiga (Assis *et al.* 2025 *no prelo*). Nossa hipótese sugere que o fungo mutualista produz manitol, o qual, combinado com o manitol produzido pelos fungos oportunistas, pode ser utilizado para a esporulação dos oportunistas. Isso pode intensificar a atividade dos fungos oportunistas/parasitas que se utilizam de manitol para esporulação (Assis *et al.* 2025). Assim, existe uma dinâmica evolutiva entre o fungo mutualista e a formiga, que a formiga oferece cuidado constante para o fungo retirando quaisquer fungos oportunistas/parasitas que apareçam no jardim de fungos e que venham a se beneficiar de metabólitos secundários produzidos pelos fungos mutualistas.

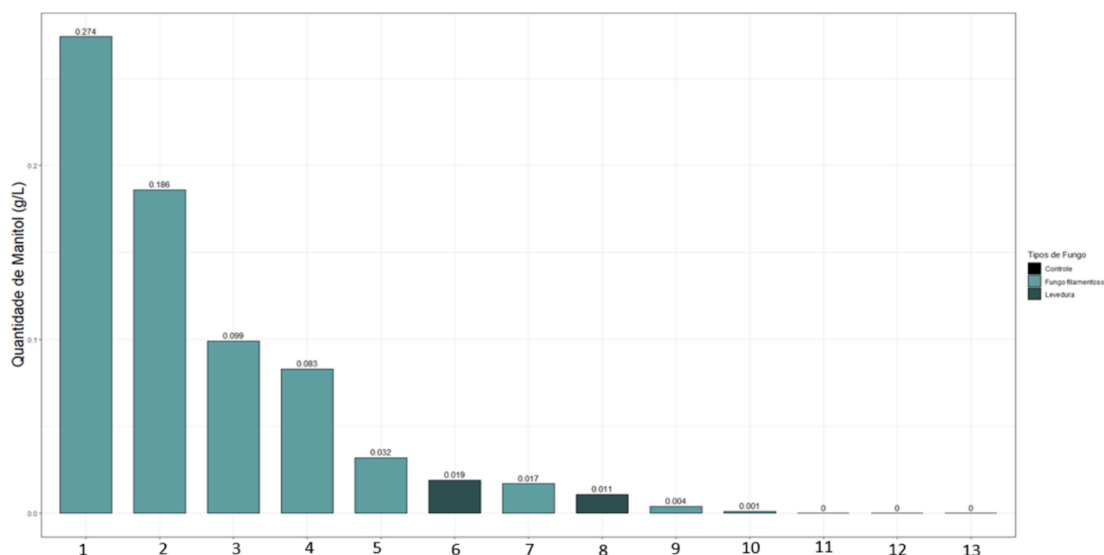


Figura 6. Quantidade de manitol produzida por fungos associados a *Leucoagaricus gongylophorus*, fungo mutualista de formigas cultivadoras de fungos. 1) *Escovopsis weberi*; 2) *Escovopsioides nivea*; 3) *Cladosporium* sp.; 4) *Trichoderma* sp.; 5) *Syncephalastrum* sp.; 6) *Wickerhamiella* sp.; 7) *Trichoderma viridans*; 8) *Candida margiris*; 9) *Nigrospora* sp.; 10) *Escovopsis* sp.; 11) *Starmerella etchellsii*; 12) *Cunninghamella elegans* e 13) Controle. Imagem do relatório de iniciação científica de Maria Izabela Tavares dos Santos. As barras em verde escuro são leveduras e em verde claro fungos filamentosos, as linhas (11, 12 e 13, 11) *Starmerella etchellsii*, *Cunninghamella elegans* e Controle, respectivamente não demonstraram a presença de Manitol.

Crescimento dos mutualistas em diferentes meios: Nossos resultados indicaram que *Leucocoprinus attinorum* apresenta crescimento em todos os substratos testados, sendo o fungo que mais se desenvolveu em quatro dos cinco substratos analisados (Figura 7). Esse fungo é cultivado pela formiga Paleoattina *Mycocepurus goeldii*, que utiliza uma ampla variedades de materiais como substrato, incluindo frutas, carcaças de insetos, fezes de

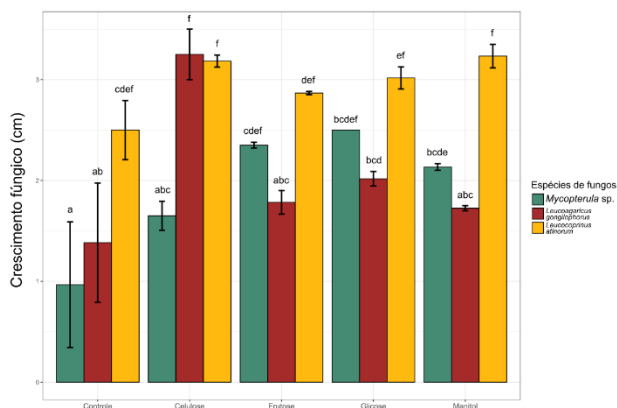


Figura 7. Crescimento fúngico dos mutualistas de formigas cultivadoras. Em verde, *Myrmecopterula* sp., mutualista de *Apterostigma* sp. (paleoattina); em vermelho, *Leucoagaricus gongylophorus*, mutualista de *Atta sexdens* (e outras neoattinas – Neoattina); e, em amarelo, o fungo *Leucocoprinus attinorum*, mutualista de *Mycocepurus goeldii* (paleoattina). As barras de erro representam o erro padrão da média e as letras representam a diferença estatística entre os crescimentos (letras iguais crescimento igual estatisticamente)

outros insetos (como lagartas) e flores (De Fine Licht & Boomsma, 2010). Essa diversidade de fonte de nutrientes sugere que este fungo tenha evoluído para crescer de maneira eficiente independentemente do substrato disponível. Por outro lado, *Leucoagaricus gongylophorus*, fungo mutualista de formigas cortadeiras (neoattinas), apresentou seu maior crescimento quando inoculado em celulose, o que corresponde ao principal substrato oferecido pelas formigas, geralmente folhas verdes recém cortadas. Isso reforça as observações feitas por De Fine Licht e Boomsma (2010), que demonstraram que a maioria das formigas cortadeiras oferece ao fungo mutualista (*L. gongylophorus*) predominantemente folhas jovens recém-cortadas, porém outros substratos

como frutas, sementes e carcaças também foram observados sendo levados e adicionados ao mutualista, em menor quantidade (De Fine Licht & Boomsma, 2010). Por sua vez, o fungo mutualista da formiga *Apterostigma* sp. (*Myrmecopterula* sp) apresentou um crescimento menor em tamanho do raio em comparação a quase todos os demais fungos. No entanto, foi observado um crescimento vertical significativo durante as medições (observação pessoal). O crescimento vertical acontece quando as hifas não crescem apenas no substrato, mas sim crescendo verticalmente em direção à parte superior da placa de Petri. Esse fungo é cultivado por Paleoattinas, que utilizam uma dieta semelhante ao *Leucocoprinus attinorum* com substratos sortidos (folhas secas, sementes, frutas, fezes e carcaças de insetos).

Ao analisar os fungos no decorrer do tempo, verificamos que, quando inoculado em celulose, *L. gongylophorus* apresentou um crescimento rápido, um padrão de não observado nos demais fungos (Figura 8) ($p < 0,001$). Esses resultados corroboram a especialização do fungo *L. gongylophorus* em degradação de celulose, enquanto o crescimento do fungo não se diferenciou nos demais substratos em que foram inoculados ($p > 0,050$). As taxas de crescimento mostram que a maioria dos fungos crescem aproximadamente $0,15 \text{ mm.dia}^{-1}$. Os dados podem ser vistos na tabela 3 logo abaixo.

O substrato nenhum representa a inoculação dos discos de PDA no ágar (sem suplementação de quaisquer outros substratos). O crescimento neste substrato pode ser devido ao halo de PDA que foi inoculado, provavelmente este crescimento deve ter exaurido a fonte de carbono presente no halo, e por isso não houve um crescimento tão alto (*Myrmecopterula* sp.: $0,064\text{cm}$; *Leucoagaricus gongylophorus*: $0,092\text{cm}$; e *Leucocoprinus attinorum*: $0,167\text{cm}$) (Tabela 3, Figura 8). O fungo *Leucocoprinus attinorum*, mutualista de *Mycocepurus goeldii*, teve o maior crescimento dentro da inoculação apenas em ágar ($0,167\text{cm}$), porém quando comparado com os demais substratos onde *Leucocoprinus attinorum* foi inoculado não houve diferença estatística na taxa de crescimento ($p > 0,050$).

Vigueras e colaboradores (2017), mostraram que há um alto crescimento em massa seca de *L. gongylophorus* em celulose, por volta do dia doze no experimento. Em contraste, nossos resultados mostram que houve um aumento significativo da dispersão dos micélios já no dia seis do experimento. Uma possível explicação para essa diferença é que, enquanto nós usamos inoculação de meio sólido (PDA, Potato Dextrose Agar), aqueles autores utilizaram suspensão líquida para espalhar os micélios na placa. O meio sólido pode ter servido de substrato adicional para os fungos durante os primeiros dias do experimento, acelerando seu crescimento inicial. Siqueira e colaboradores (1988) mostram que *L. gongylophorus* teve um crescimento de massa maior quando inoculado em glicose, e um crescimento menor em celulose. Os dados de Siqueira e coautores é contrastante com nossos achados. Uma possível explicação deve ser a diferença de metodologia e medida, enquanto nossos dados o crescimento foi realizado em placa com PDA (meio sólido) e raio de crescimento, Siqueira e colaboradores utilizaram YNB (Nitrogênio Levedura Base) e mediram a massa fúngica final. Nossos dados mostram que a taxa de crescimento foi maior em *L. gongylophorus* quando inoculado celulose, porém não quantificamos a massa fúngica. Tal crescimento em celulose pode se remeter a uma possível especialização do fungo para o substrato. Ao somarmos a inoculação em PDA

(substrato rico em fonte de carbono) à celulose, temos um meio ótimo de crescimento o que pode proporcionar um crescimento rápido nas placas inoculadas.

Tabela 3. Média e erro padrão da taxa de crescimento dos fungos nos substratos estudados. O substrato ‘Nenhum’ representa apenas o meio com ágar.

Substratos	Espécies de fungos	Taxa Média (cm/dia)	Erro padrão (se)
Celulose	<i>Myrmecopterula sp.</i>	0,110	0,015
	<i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	0,217	0,109
	<i>Leucocoprinus attinorum</i>	0,212	0,027
Nenhum	<i>Myrmecopterula sp.</i>	0,064	0,013
	<i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	0,092	0,017
	<i>Leucocoprinus attinorum</i>	0,167	0,021
Frutose	<i>Myrmecopterula sp.</i>	0,157	0,012
	<i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	0,119	0,012
	<i>Leucocoprinus attinorum</i>	0,191	0,015
Glicose	<i>Myrmecopterula sp.</i>	0,167	0,016
	<i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	0,134	0,012
	<i>Leucocoprinus attinorum</i>	0,201	0,017
Manitol	<i>Myrmecopterula sp.</i>	0,142	0,011
	<i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	0,114	0,015
	<i>Leucocoprinus attinorum</i>	0,216	0,022

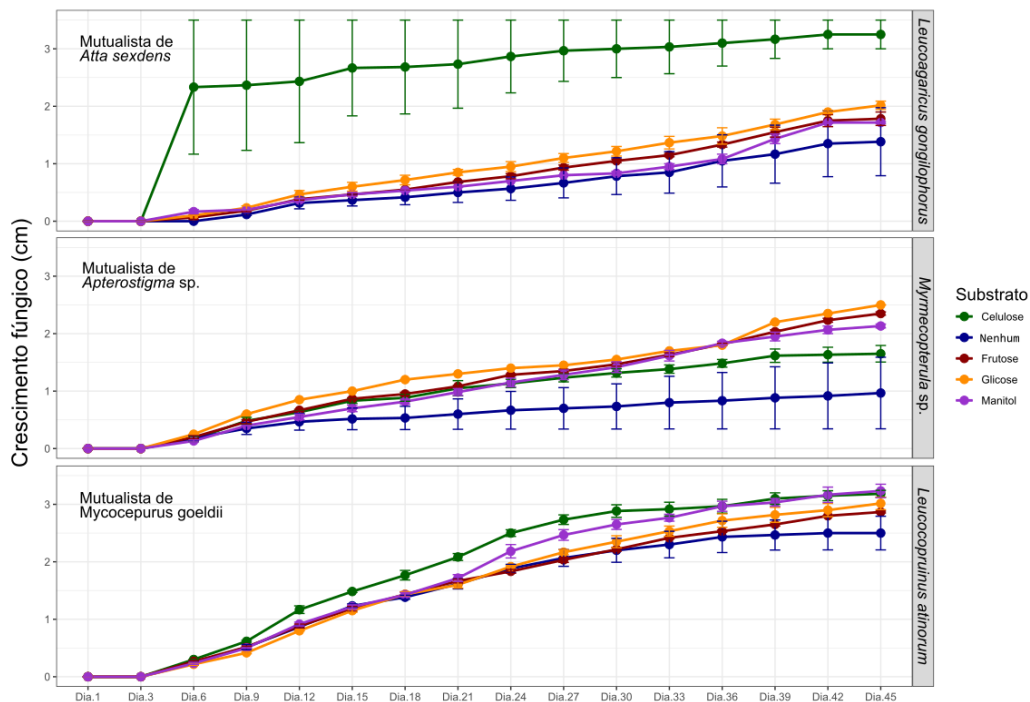


Figura 8. Crescimento dos fungos mutualistas em diferentes substratos. É possível ver o crescimento dos fungos mutualistas em diversos substratos, destacando o rápido crescimento de *Leucoagaricus gongylophorus* em celulose, enquanto os demais fungos apresentaram um crescimento moderado e mais uniforme em todos os substratos testados.

Detecção de Manitol no fungo mutualista isolado: Os fungos mutualistas analisados foram capazes produzir manitol, ainda que em baixas concentrações. Todos os fungos responderam positivamente aos testes de produção. Dentre os três fungos estudados, o fungo mutualista de *neoattinas*, *Leucoagaricus gongylophorus*, apresentou a maior produção de manitol. No entanto, a produção mostrou uma alta amplitude, variando entre 0,005 g/L e 0,051 g/L ($\bar{x} = 0,233$; variância = $5,94 \times 10^{-4}$; SD = 0,024). Em contraste os

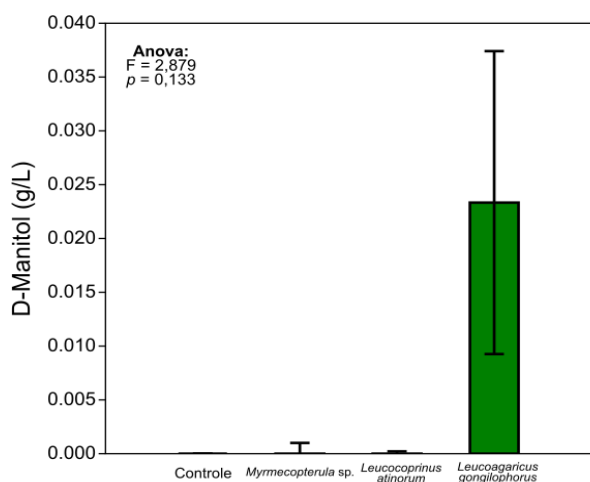


Figura 9. Quantidade de D-Manitol nas amostras de fungo. Barras significam a média e com o erro padrão. Não houve diferença estatística entre as quantidades de D-Manitol produzida pelos fungos com o controle (sem detecção).

fungos de Paleoattines, *Myrmecopterula* sp. e *Leucocoprinus atinorum*, exibiram uma produção significativamente menor, variando entre 0 g/L e 0,001 g/L. Devido à baixa quantidade produzida não foi possível determinar diferença entre a produção de Manitol entre os fungos e o controle (F = 2,879; p = 0,133). Mesmo visivelmente diferente, a análises estadística não indicou uma diferença significativa na produção de manitol pelos fungos e o controle (Figura 9).

Além de auxiliar na esporulação de fungos oportunistas/parasitas (Assis *et al.* 2025 no prelo) o manitol também aumenta a resistência ao estresse térmico em fungos (Seekles *et al.*, 2023), é fonte de

carbono (Calmes *et al.*, 2013; Meena *et al.*, 2015) e osmoprotetor (Meena *et al.*, 2015). O manitol foi o composto mais encontrado em conídios de fungos sob forte estresse térmico (Seekles *et al.*, 2023); nossos fungos mutualistas (*Leucoagaricus gongylophorus*, *Leucocoprinus atinorum* e *Myrmecopterula* sp.) não possuem conídios como local de armazenamento de substâncias para resistência ao estresse térmico (Mateus Cruz pers. comm). Todo o manitol produzido pelos mutualistas provavelmente é liberado para o meio externo, e este manitol liberado é então utilizado pelos fungos oportunistas (Assis *et al.* 2025 no prelo), e provavelmente por bactérias (Mathis *et al.*, 1986).

Por outro lado, ao avaliar o crescimento do fungo no meio PDB, observamos uma diferença significativa na biomassa fúngica (F= 57,21; p <0,001). O fungo mutualista da formiga basal *Apterostigma* sp., *Myrmecopterula* sp., apresentou o maior crescimento em comparação com *L. gongylophorus* e *Leucocoprinus atinorum*. O crescimento foi visivelmente diferente, enquanto *Myrmecopterula* sp. formou um condensado fúngico denso (Figura 10); os demais fungos apresentaram um desenvolvimento consideravelmente menor.

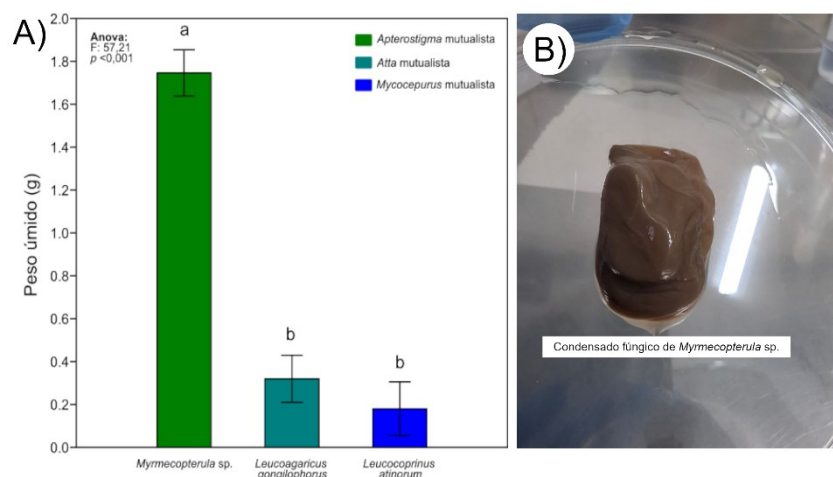


Figura 10. A) Peso úmido dos fungos após serem retirados do meio PDB e deixados secar por cinco minutos em papel filtro. Resultado do teste ANOVA mostra uma diferença entre os fungos de *Apterostigma* sp., de *Atta sexdens* e de *Mycocephalus goeldii*. As letras mostram diferença entre os crescimentos dos fungos dado pelo teste de Tukey. B) Condensado fúngico de *Myrmecopterula sp.* após 15 dias de crescimento.

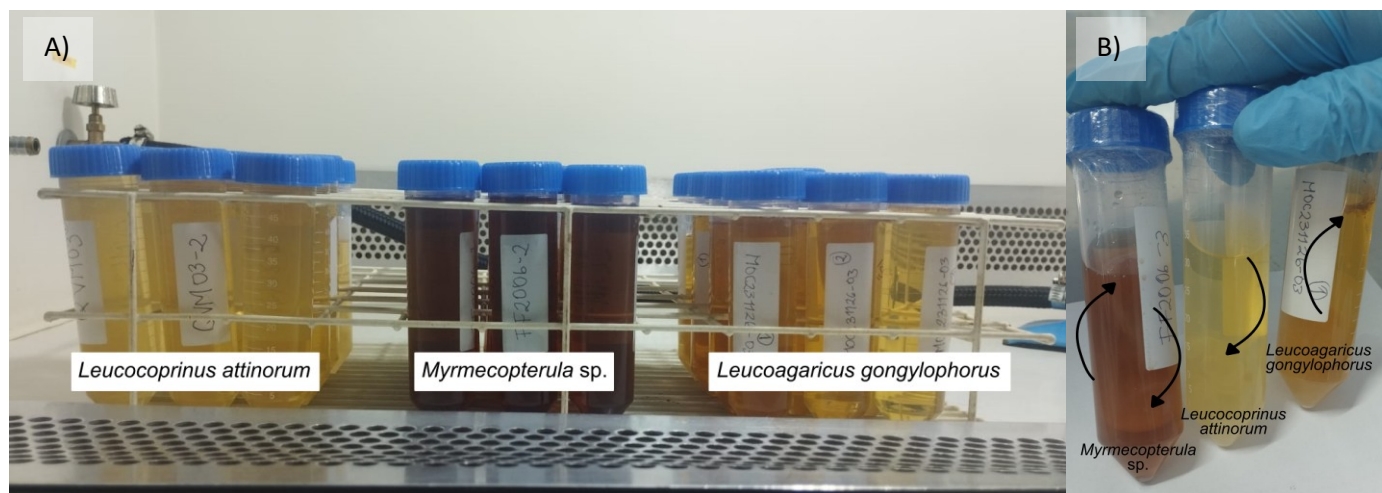


Figura 11. Soluções de crescimento do fungo em PDB (Potato Dextrose Broth) após 15 dias de incubação a 25 °C e 110 rpm. A) *Leucocoprinus attinorum*, fungo mutualista de *Mycocephalus goeldii*; *Myrmecopterula sp.*, fungo mutualista de *Apterostigma sp.*; e *Leucoagaricus gongylophorus*, fungo mutualista de *Atta sexdens*. Há uma evidente diferença entre a coloração dos meios após a inoculação e crescimento do fungo e liberação de metabólitos. B) Condensados fúngicos em evidência (as setas mostram os condensados fúngicos): é possível ver que o fungo *Myrmecopterula sp.* produz um condensado muito mais denso que os demais fungos.

Crescimento dos fungos oportunistas no extrato de *Leucoagaricus gongylophorus*:

Nossos resultados indicam diferenças significativas no crescimento em massa de *Escovopsis sp.* e *Trichoderma sp.* quando cultivados nos dois substratos: Extrato e PDB. Para *Escovopsis sp.* (Figura 12 A), o crescimento foi significativamente maior no meio PDB em comparação ao Extrato (Mistura de fungo com água destilada) ($t = 3,47$; $p < 0,001$). Esse resultado sugere que *Escovopsis sp.* apresenta maior aptidão para crescer em substratos ricos em nutrientes solúveis, como os presentes no meio PDB, que contém maior disponibilidade de carboidratos e outros compostos orgânicos de fácil assimilação. O crescimento mais modesto no Extrato pode refletir limitações para metabolizar a fonte

de carbono e nutrientes presentes no Extrato, porém mesmo com crescimento pequeno ainda se utiliza do extrato para crescimento e esporulação (Assis et al., 2025, no prelo).

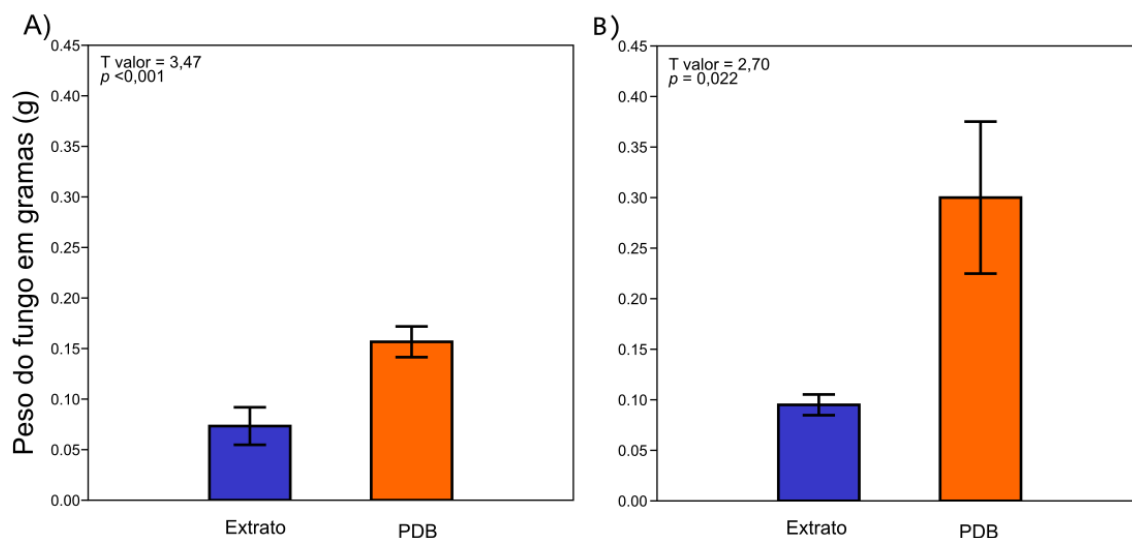


Figura 12. Crescimento em massa dos fungos oportunistas/parasitas de *Leucoagaricus gongilopohorus* em azul crescimento da massa em gramas no extrato do fungo mutualista, e em laranja crescimento em gramas do fungo oportunista/parasita em meio rico (PDB). A) Crescimento de *Escovopsis* sp.; B) Crescimento de *Trichoderma* sp. Barras mostram o erro padrão e no canto superior esquerdo os valores da estatística do teste T realizado.

Escovopsis é um fungo especializado, conhecido por seu papel como micoparasita/oportunista nos jardins de formigas cultivadoras de fungos (Gotting et al. 2022). Ele obtém nutrientes principalmente através da degradação necrotrófica do fungo cultivado pelas formigas (Gotting et al. 2022), demonstrando uma dependência metabólica significativa desse hospedeiro (Berasategui et al. 2023). Estudos genômicos revelaram que espécies como *E. weberi* possuem um genoma reduzido, com genes adaptados para metabolizar carboidratos simples, como α -glucanos (trealose e maltose), que são abundantes nos fungos cultivados pelas formigas (de Man et al. 2015). Apesar de ser capaz de crescer em meios com fontes orgânicas de carbono, o crescimento de *Escovopsis* é mais lento e limitado em comparação com outros fungos, reforçando a necessidade de um nicho específico (o jardim de fungos) e menor versatilidade metabólica para explorar substratos complexos (Berasategui et al. 2023), que podem ser obtidos diretamente pelo jardim de fungo *Leucoagaricus gongilopohorus*.

Por outro lado, *Trichoderma* sp. (Figura 12 B) também demonstrou um crescimento significativamente maior no meio PDB em relação ao Extrato ($t = 2,70$; $p = 0,022$), mas com uma variação maior nos valores, conforme indicado pelo aumento da barra de erro (Figura 12 B). Essa variabilidade pode indicar uma resposta heterogênea ao substrato, possivelmente devido à ampla capacidade saprofítica de *Trichoderma* sp. (Yao et al. 2023), que lhe confere versatilidade no aproveitamento de diferentes fontes de carbono e nitrogênio (Yao et al. 2023). A maior biomassa alcançada por *Trichoderma* sp. em PDB reforça seu potencial competitivo em ambientes ricos em carboidratos, o que pode ser um fator determinante em interações ecológicas, especialmente em contextos de competição com outros fungos. Estudos mostram que o gênero *Trichoderma* possui um repertório genético extenso para a produção de enzimas degradadoras de parede celular vegetal (CAZymes) (Yao et al., 2023) e proteínas auxiliares, muitas das quais adquiridas

por transferência lateral de genes ao longo da evolução (Druzhinina et al., 2018). Isso confere ao gênero uma capacidade explorar uma ampla gama de substratos, incluindo celulose e outros polímeros complexos (Druzhinina et al., 2018). Além disso, *Trichoderma* pode competir diretamente com outros organismos por nutrientes no solo, imobilizando-os em sua biomassa ou solubilizando fosfatos e outros minerais para disponibilizá-los às plantas (Druzhinina et al., 2018; Yao et al. 2023).

Além disso, observa-se que *Trichoderma* sp. apresentou maior biomassa total do que *Escovopsis* sp. em ambos os substratos, o que pode ser atribuído à sua alta eficiência metabólica e à produção de enzimas extracelulares capazes de degradar substratos complexos (Yao et al., 2023). Em contraste, o crescimento mais limitado de *Escovopsis* sp. pode refletir adaptações a nichos ecológicos mais específicos ou menor eficiência na utilização de recursos diversificados (Berasategui et al. 2023). Enquanto *Escovopsis* demonstra alta especialização em nichos ecológicos restritos (dentro do jardim de fungo das formigas cultivadoras), dependendo principalmente de carboidratos simples fornecidos pelo fungo mutualista das formigas; *Trichoderma* exibe uma estratégia oposta, com ampla capacidade metabólica para explorar diferentes fontes nutricionais (Berasategui et al. 2023). Essa diferença explica os padrões observados com substratos PDB e Extrato fúngico: o crescimento mais limitado de *Escovopsis* reflete sua dependência por nutrientes facilmente assimiláveis, enquanto o desempenho superior de *Trichoderma* destaca sua capacidade adaptativa e competitiva em ambientes ricos ou pobres em recursos.

Nossos resultados evidenciam que, embora ambas as espécies apresentem crescimento maior em meio PDB (meio rico em carboidratos), a magnitude e a variabilidade desse crescimento variam entre os táxons, refletindo diferenças adaptativas nas estratégias nutricionais e ecológicas de cada fungo.

Tabela 2. Genes de fungos mutualistas codificando enzimas de vias metabólicas que convertem celulose e hemicelulose em polióis.

Enzima	Abrev.	EC #	Kegg Link	GenBank #	Link GenBank	Transcriptoma (Leucocoprinus sp.)	Transcriptoma (L. gongylophorus)	Genoma (L. gongylophorus)
XILANASE								
Endo-1,4- β -xilanase		EC:3.2.1.8	✓	XM_036677610	✓	Y	Y	N
Celulases								
Endoglucanases		EC:3.2.1.4	✓	NC_0282405.1	✓	Y	Y	Y
β -glicosidases		EC:3.2.1.21	✓	NW_023503004.1	✓	Y	Y	Y
Celulase 1,4-beta-celobiosidase		EC:3.2.1.91	✓	XM_037352492	✓	Y	Y	Y
VIAS DE BIODIVERSIDADE DE POLIÓIS								
Redutase de aldose	ALR	EC:1.1.1.21	✓	XM_046180420.1	✓	Y	N	Y
Xilitol desidrogenase	XDH	EC:1.1.1.9	✓	XM_031386945	✓	Y	N	Y
Sorbitol desidrogenase	SDH	EC:1.1.1.14	✓	XM_014328970	✓	Y	Y	Y
Manitol desidrogenase	MtDH	EC:1.1.1.138	✓	XM_046180790	✓	Y	Y	Y
Manitol 1-fosfatase	M1Pase	EC:3.1.3.22	✓	NZ_CP013018.1	✓	N	N	Y
Manitol-1-fosfato 5-desidrogenase	M1PDH	EC:1.1.1.17	✓	XM_03770098	✓	Y	Y	Y
Isomerase glicose-6-fosfato	PGI	EC:5.3.1.9	✓	XM_069349660	✓	Y	Y	Y
Hexoquinase	Hk	EC:2.7.1.1	✓	XM_01878852.1	✓	Y	Y	Y
Monofosfatase de inositol	IMPase	EC:3.1.3.25	✓	XM_0676709.1	✓	Y	Y	Y
Inositol-3-fosfato sintase	MIPS	EC:5.5.1.4	✓	XM_062770731	✓	Y	Y	Y

PRODUÇÃO DE
POLIÓIS NÃO
OXIDATIVOS

Transcetolase	TKL	EC:2.2.1.1	✓	XM_062770731	✓	Y	Y	N
Ribulose-5-fosfato 3-epimerase	RPE	EC:5.1.3.1	✓	XM_069352554	✓	N	Y	Y
Produção oxidativa de polióis								
Desidrogenase UDP-glicose-6	UDGH	EC:1.1.1.22	✓	XM_06268098	✓	Y	Y	Y
6-fosfogluconolactonase	6PGL	EC:3.1.1.31	✓	XM_01873856	✓	Y	Y	Y
Fosfogluconato desidrogenase	6PDH	EC:1.1.1.43	✓	XM_01711234	✓	Y	Y	Y
Ribulocinase	RK	EC:2.7.1.16	✓	XM_025591120	✓	N	N	N
Xilulocinase	XK	EC:2.7.1.17	✓	XM_016418222	✓	Y	Y	Y
Arabitol-4-desidrogenase	Ar4DH	EC:1.1.1.11	✓	-	✓	N	N	Y
Arabitol-2-desidrogenase	Ar2DH	EC:1.1.1.250	✓	XM_064908036	✓	Y	N	Y

Anexo

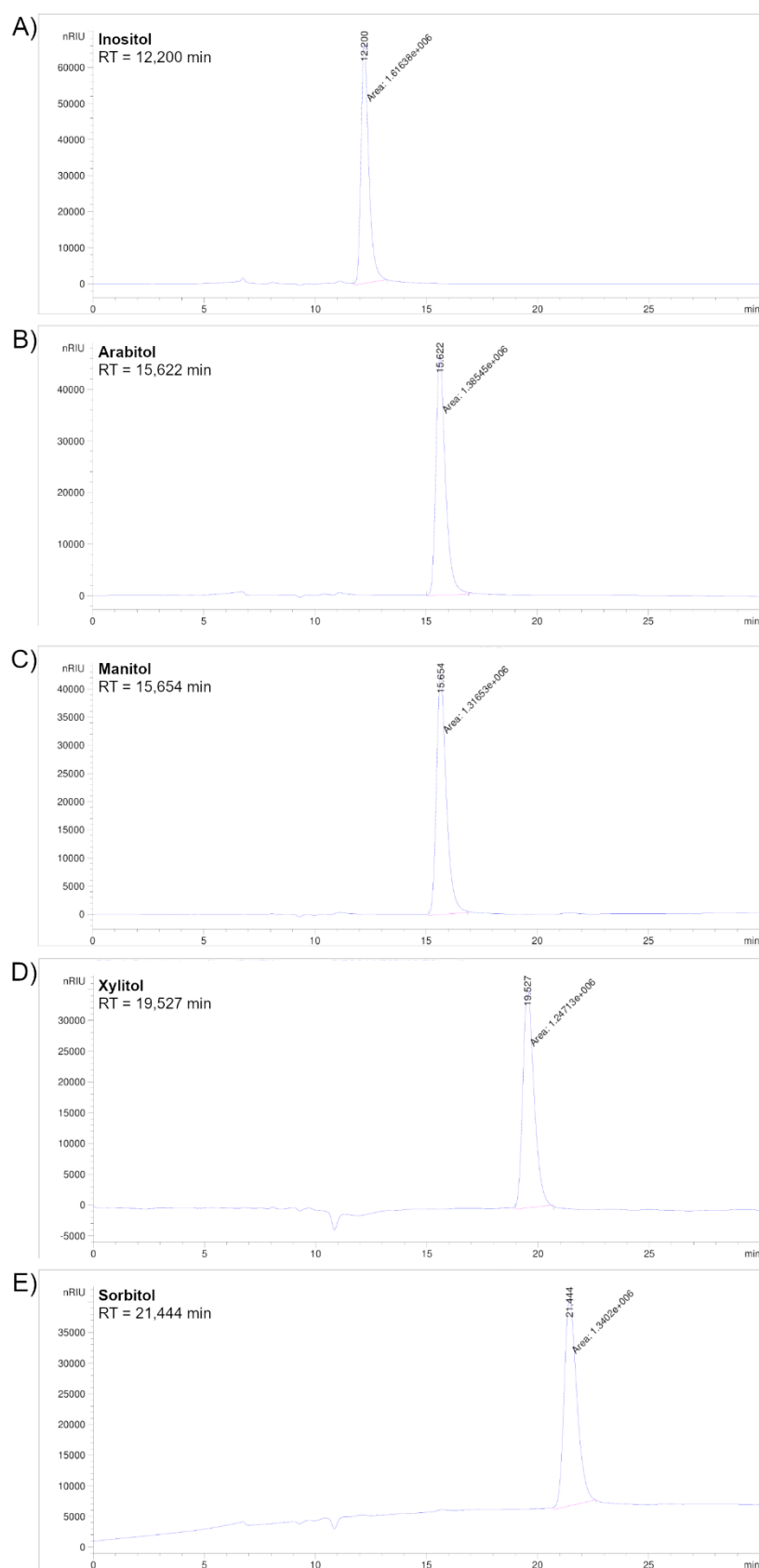


Figura 13. Cromatogramas dos padrões de polióis buscados nos jardins de fungos de *Atta sexdens* e *Leucocoprinus attinorum*. Dentro das imagens estão presentes os tempos de retenção respectivos. A) Padrão do inositol, tempo de retenção de 12,200 min.; B) Padrão do arabitol, tempo de retenção de 15,622 min.; C) Padrão do manitol, com o tempo de retenção de 15,654 min.; D) Padrão do xylitol, tempo de retenção 19,527 min.; e E) Padrão do sorbitol, tempo de retenção 21,444 min.

Referências bibliográficas

- Bacci, M., Bueno, O. C., Rodrigues, A., Pagnocca, F. C., Somera, A. F., & Silva, A. (2013). A metabolic pathway assembled by enzyme selection may support herbivory of leaf-cutter ants on plant starch. *Journal of Insect Physiology*, 59(5), 525–531. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2013.02.007>
- Berasategui, A., Salem, H., Moller, A. G., Christopher, Y., Vidaurre-Montoya, Q., Conn, C., Read, T. D., Rodrigues, A., Ziemert, N., & Gerardo, N. (2023). Genomic insights into the evolution of secondary metabolism of *Escovopsis* and its allies, specialized fungal symbionts of fungus-farming ants (p. 2023.11.06.564974). *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2023.11.06.564974>
- Birnbaum, S. S. L., & Gerardo, N. M. (2016). Patterns of specificity of the pathogen *escovopsis* across the fungus-growing ant symbiosis. *The American Naturalist*, 188(1), 52–65. <https://doi.org/10.1086/686911>
- Calmes, B., Guillemette, T., Teyssier, L., Siegler, B., Pigné, S., Landreau, A., Iacomini, B., Lemoine, R., Richomme, P., & Simoneau, P. (2013). Role of mannitol metabolism in the pathogenicity of the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola*. *Frontiers in Plant Science*, 4, 131. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00131>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.2010.01193.x>
- De Man, T. J. B., Stajich, J. E., Kubicek, C. P., Teiling, C., Chenthamara, K., Atanasova, L., Druzhinina, I. S., Levenkova, N., Birnbaum, S. S. L., Barribeau, S. M., Bozick, B. A., Suen, G., Currie, C. R., & Gerardo, N. M. (2016). Small genome of the fungus *Escovopsis weberi*, a specialized disease agent of ant agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(13), 3567–3572. <https://doi.org/10.1073/pnas.1518501113>
- Druzhinina, I. S., Chenthamara, K., Zhang, J., Atanasova, L., Yang, D., Miao, Y., Rahimi, M. J., Grujic, M., Cai, F., Pourmehdi, S., Salim, K. A., Pretzer, C., Kopchinskiy, A. G., Henrissat, B., Kuo, A., Hundley, H., Wang, M., Aerts, A., Salamov, A., ... Kubicek, C. P. (2018). Massive lateral transfer of genes encoding plant cell wall-degrading enzymes to the mycoparasitic fungus *Trichoderma* from its plant-associated hosts. *PLoS Genetics*, 14(4), e1007322. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007322>
- Gotting, K., May, D. S., Sosa-Calvo, J., Khadempour, L., Francoeur, C. B., Berasategui, A., Thairu, M. W., Sandstrom, S., Carlson, C. M., Chevrette, M. G., Pupo, M. T., Bugni, T. S., Schultz, T. R., Johnston, J. S., Gerardo, N. M., & Currie, C. R. (2022). Genomic diversification of the specialized parasite of the fungus-growing ant symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(51), e2213096119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2213096119>
- Heine, D., Holmes, N.A., Worsley, S.F. et al. Chemical warfare between leafcutter ant symbionts and a co-evolved pathogen. *Nat Commun* 9, 2208 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04520-1>
- Hölldobler, B., & Wilson, E. O. (1990). *The Ants*. Harvard University Press.
- Jennings, D. H. (1985). Polyol metabolism in fungi. Em A. H. Rose & D. W. Tempest (Orgs.), *Advances in Microbial Physiology* (Vol. 25, p. 149–193). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60292-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60292-1)
- Kosugi, M., Miyake, H., Yamakawa, H., Shibata, Y., Miyazawa, A., Sugimura, T., Satoh, K., Itoh, S., & Kashino, Y. (2013). Arabitol provided by lichenous fungi enhances ability to dissipate excess light energy in a symbiotic green alga under desiccation. *Plant and cell physiology*, 54(8), 1316–1325.

- Leal-Dutra CA, Griffith GW, Neves MA, McLaughlin DJ, McLaughlin EG, Clasen LA, Dentinger BTM. Reclassification of Pterulaceae Corner (Basidiomycota: Agaricales) introducing the ant-associated genus *Myrmecopterula* gen. nov., *Phaeopterula* Henn. and the corticioid Radulomycetaceae fam. nov. *IMA Fungus*. 2020 Jan 30;11:2. doi: 10.1186/s43008-019-0022-6. PMID: 32617254; PMCID: PMC7325140.
- Little AE, Murakami T, Mueller UG, Currie CR. Defending against parasites: fungus-growing ants combine specialized behaviours and microbial symbionts to protect their fungus gardens. *Biol Lett*. 2006 Mar 22;2(1):12-6. doi: 10.1098/rsbl.2005.0371. PMID: 17148313; PMCID: PMC1617182.
- Martiarena, M. J. S., Deveau, A., Montoya, Q. V., Flórez, L. V., & Rodrigues, A. (2023). The hyphosphere of leaf-cutting ant cultivars is enriched with helper bacteria. *Microbial Ecology*, 86(3), 1773–1788. <https://doi.org/10.1007/s00248-023-02187-w>
- Mathis, J. N., Barbour, W. M., Miller, T. B., Israel, D. W., & Elkan, G. H. (1986). Characterization of a Mannitol-Utilizing, Nitrogen-Fixing Bradyrhizobium japonicum USDA 110 Derivative. *Applied and Environmental Microbiology*, 52(1), 81–85. <https://doi.org/10.1128/aem.52.1.81-85.1986>
- Meena, M., Prasad, V., Zehra, A., Gupta, V., & Upadhyay, R. (2015). Mannitol metabolism during pathogenic fungal–host interactions under stressed conditions. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2015.01019>
- Patel, T. K., & Williamson, J. D. (2016). Mannitol in plants, fungi, and plant–fungal interactions. *Trends in Plant Science*, 21(6), 486–497. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.006>
- R Core Team. (2023). *R: A language and environment for statistical computing* (Versão R version 4.3.0 (2023-04-21 ucrt)) [Software]. R Foundation for statistical computing. <https://www.R-project.org/>
- Rice, T., Zannini, E., K. Arendt, E., & Coffey, A. (2020). A review of polyols – biotechnological production, food applications, regulation, labeling and health effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(12), 2034–2051. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1625859>
- Rocha, S. L., Evans, H. C., Jorge, V. L., Cardoso, L. A. O., Pereira, F. S. T., Rocha, F. B., Barreto, R. W., Hart, A. G., & Elliot, S. L. (2017). Recognition of endophytic Trichoderma species by leaf-cutting ants and their potential in a Trojan-horse management strategy. *Royal Society Open Science*, 4(4), 160628. <https://doi.org/10.1098/rsos.160628>
- Schultz, T. R. (2022). *The convergent evolution of agriculture in humans and fungus-farming ants*. <https://doi.org/10.7551/mitpress/13600.003.0021>
- Schultz, T. R., & Brady, S. G. (2008). Major evolutionary transitions in ant agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(14), 5435–5440. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711024105>
- Searle, S. R., Speed, F. M., & Milliken, G. A. (1980). Population marginal means in the linear model: An alternative to least squares means. *The American Statistician*, 34(4), 216–221. <https://doi.org/10.1080/00031305.1980.10483031>
- Seekles, S. J., van den Brule, T., Punt, M., Dijksterhuis, J., Arentshorst, M., Ijadpanahsaravi, M., Roseboom, W., Meuken, G., Ongenae, V., Zwerus, J., Ohm, R. A., Kramer, G., Wösten, H. A. B., de Winde, J. H., & Ram, A. F. J. (2023). Compatible solutes determine the heat resistance of conidia. *Fungal Biology and Biotechnology*, 10(1), 21. <https://doi.org/10.1186/s40694-023-00168-9>
- Shik, J. Z., Gomez, E. B., Kooij, P. W., Santos, J. C., Weislo, W. T., & Boomsma, J. J. (2016). Nutrition mediates the expression of cultivar–farmer conflict in a fungus-growing ant.

- Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(36), 10121–10126.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1606128113>
- Silva, A., Bacci, 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.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2005.11.001>
- Singer R. (1986). *The Agaricales in modern taxonomy*. 4th ed. Koenigstein, Germany: Koeltz Scientific Books. 981 p.
- Somera, A. F., Lima, A. M., dos Santos-Neto, Á. J., Lanças, F. M., & Bacci, M. (2015). Leaf-cutter ant fungus gardens are biphasic mixed microbial bioreactors that convert plant biomass to polyols with biotechnological applications. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(13), 4525–4535. <https://doi.org/10.1128/AEM.00046-15>
- Urrea-Valencia, S., Júnior, R.B., Kooij, P.W. et al. Unraveling fungal species cultivated by lower attine ants. *Mycol Progress* 22, 66 (2023). <https://doi.org/10.1007/s11557-023-01912-6>
- Vigueras, G., Paredes-Hernández, D., Revah, S., Valenzuela, J., Olivares-Hernández, R., & Le Borgne, S. (2017). Growth and enzymatic activity of *Leucoagaricus gongylophorus*, a mutualistic fungus isolated from the leaf-cutting ant *Atta mexicana*, on cellulose and lignocellulosic biomass. *Letters in Applied Microbiology*, 65(2), 173–181.
<https://doi.org/10.1111/lam.12759>
- Weber, N. A. (1972). The fungus-culturing behavior of ants. *American Zoologist*, 12(3), 577–587.
<https://doi.org/10.1093/icb/12.3.577>
- Yao, X., Guo, H., Zhang, K., Zhao, M., Ruan, J., & Chen, J. (2023). Trichoderma and its role in biological control of plant fungal and nematode disease. *Frontiers in Microbiology*, 14.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1160551>

Agradecimentos

Nós agradecemos aos professores André Rodrigues, pelo isolamento dos e instrumentações que não dispúnhamos no momento, além das conversas e discussões sobre os resultados. Também agradecemos a Prof^a. Milene Ferro por toda ajuda na parte de bioinformática que sem ela não seria possível dar prosseguimento ao trabalho. Além dos professores agradecemos ao doutorando Mateus Cruz pela ajuda com as placas de crescimento e discussões sobre os resultados, e a aluna de iniciação científica Maria Izabela (Iza), pela ajuda na inoculação dos fungos e toda a ajuda durante o trabalho.

Trabalhos publicados ou aceitos para publicação

1. Lima, L.D., Assis, D.S., Nascimento, F.S.d. and Kaminski, L.A. (2024), Chemical conspicuousness, ant organs, and specificity in myrmecophilous caterpillars partitioning ant–plant systems. *Insect Science*. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.13474> (trabalho amplamente divulgado pela mídia incluindo [CNN](#) e [Revista Fapesp](#))
2. Diego Santana Assis, Skylar Brodowski, Gabriel Asher Newsome, Fabio Santos do Nascimento, Ted Schultz (Em produção para publicação no primeiro trimestre de 2025). The laboratory environment affects the volatiles of fungus gardens in the colonies of fungus-farming ants. *Sociobiology*.
3. Diego Assis, Sérgio Kakazu, Mateus da Cruz, Raphael Affonso da Silva, Vitor Marin, Milene Ferro, Daiane Sass, André Rodrigues, and Maurício Bacci Jr. Ants manage polyol production to fight fungal antagonists. *Microbiology Spectrum*. (Aceito para publicação)

Submetido

1. Diego S. Assis; Sidnei Mateus, Amanda Prato da Silva, Rafael Carvalho da Silva and Fabio S. do Nascimento. Dead bodies still tell tales: A new noninvasive and nondestructive protocol to extract cuticular hydrocarbons from museum collections. (Submetido em 2024 – Em minor revision)

ORIGINAL ARTICLE

Chemical conspicuousness, ant organs, and specificity in myrmecophilous caterpillars partitioning ant–plant systems

Luan Dias Lima^{1,2} , Diego Santana Assis² , Fábio Santos do Nascimento² 
and Lucas Augusto Kaminski^{1,3} 

¹Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul—UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil; ²Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Departamento de Biologia, Universidade de São Paulo—USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil and ³Núcleo de Ecologia e Biodiversidade, Instituto de Ciências Básicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas—UFAL, Maceió, Alagoas, Brazil

Abstract Resource partitioning among sympatric species is crucial for assembling ecological communities, such as caterpillar–ant assemblages in tropical forests. Myrmecophilous caterpillars use behavioral and chemical strategies to coexist with ants, avoiding attacks. While these strategies are well-understood in single pair of interacting species, such as those involving myrmecophiles and ants, their role in complex multitrophic interactions that include several species of plants, herbivores and ants remains unclear. We aimed to identify the role of cuticular hydrocarbons and specialized morphological structures that caterpillars use to interact with ants (called ant organs) in the recognition process between two riordinid caterpillar species and their respective ant–plant systems. We hypothesized that caterpillars’ cuticular profiles would be conspicuous, possessing cues of rewards to ants, allowing specific ants to recognize and not attack them on plants. We performed experiments exposing caterpillars to ants to assess the role of larval ant organs and the specificity of caterpillar–ant interactions on plants. We analyzed cuticular hydrocarbons of caterpillars, ant workers and plants using gas chromatography/mass spectrometry. Our experiments showed that larval ant organs were activated according to each treatment and caterpillars were consistently accepted by their associated ants when transferred to host plants occupied by the same ant species. However, caterpillars transferred to plants with a non-associated ant species that do not tend them were often killed. This highlights the specificity of these interactions. Caterpillar cuticular hydrocarbon profiles, while present in far lower amounts than those of ant workers and plants, were distinctive, suggesting a strategy of chemical conspicuousness that helps caterpillars to be recognized by ants and prevents attacks in specific ant–plant systems. Our results indicate that ants recognize conspicuous cuticular hydrocarbons, while caterpillars convey multimodal signals from ant organs during interactions, which are essential for caterpillar survival in these specific interactions.

Key words cuticular hydrocarbons; defensive strategy; multitrophic; mutualism; recognition; resource partitioning



RESEARCH ARTICLE - ANTS

The laboratory environment affects the volatiles of fungus gardens in the colonies of fungus-farming ants

DIEGO SANTANA ASSIS, SKYLAR BRODOWSKI, GABRIEL ASHER NEWSOME, FABIO SANTOS DO NASCIMENTO, TED SCHULTZ

Universidade de São Paulo (USP), São Paulo-SP, Brazil

Article History

Edited by

Kleber Del-Claro, UFU, Brazil
Received 24 May 2023
Initial acceptance 19 February 2024
Final acceptance 20 November 2024
Publication date ? January 2025

Keywords

Attina, Volatiles, DEET, Naphthalene, Mutualism.

Corresponding author

Diego Santana Assis
Universidade de São Paulo (USP)
Rua da Reitoria, 374, Butantã
05508-220 - São Paulo-SP, Brasil.
E-Mail: ?

Abstract

The ability to recognize nestmates is critical to the ecological success of social insects. Fungus-farming "attine" ants (Formicidae: Myrmicinae: Attini: Attina) can recognize their nestmates and symbiotic fungi via chemoreception. Although it has been shown that mutualistic fungi release volatile compounds that elicit responses in fungus-farming ants, the compounds and the sensory mechanisms involved remain little studied. Here, we characterize compounds found in attine fungus gardens and explore the correlations between those compounds, fungal substrates, and the laboratory environment. We also characterize ant cuticular hydrocarbons from *Atta cephalotes* colonies of the same species maintained in the same laboratory conditions for two or more years. Using gas chromatography associated with mass spectrometry, we verified that both substrate (i.e., the food on which fungus gardens grow) and environmental origin may influence the volatiles the fungus releases. We found compounds related to the environment, including naphthalene. We show that the volatile profiles of fungal strains grown by *Atta cephalotes* are most similar to each other, whereas the profile of the fungus grown by ants in the genus *Cyphomyrmex* is more similar to that of their substrate than to the profiles of other cultivated fungi. Regarding cuticular hydrocarbons, we found that ants collected in the same location have more similar hydrocarbon profiles than ants of the same species collected in a different location, even if all the colonies had been maintained under the same conditions (temperature, substrate) for extended periods. Our results provide strong evidence that a combination of species genetics and environmental factors shape variations in the volatile chemical profiles of cultivated fungi. After long homogenization, ants still demonstrate a solid difference among the cuticular profiles.

Introduction

The symbiosis between "attine" ants (Formicidae: Myrmicinae: Attini: Attina) and their symbiotic fungi arose ≈ 60 million years ago in the ancestor of both groups (Mueller et al., 2001; Schultz & Brady, 2008; Branstetter et al., 2017). Attine ants comprise 245 species (Ferguson-Gow et al., 2014; Li et al., 2018) and are a monophyletic group (Schultz & Brady, 2008). They cultivate their food (Weber, 1958) by growing fungal species in five agricultural systems (Mehdiabadi &

Schultz, 2009). The fungi are multiple species in Agaricaceae and Pterulaceae (Mueller et al., 2001). The ants forage provides substrates for fungal growth and feed on fungal mycelium (Mueller et al., 2001).

The co-evolutionary history of the association between fungus-farming ants (e.g., in lower attinas *Mycocyclus*, *Mycetophylax*, *Apterostigma*, and higher attinas *Atta* and *Acromyrmex* species) and their cultivated fungi includes elements of both cooperation and potential conflict (Richard et al., 2007; Shik et al., 2016). For instance, in "lower-attine"



Open access journal: <http://periodicos.uefs.br/index.php/sociobiology>
ISSN: 0361-6525

Neste proof os autores e instituições foram corrigidas, a revista cometeu um erro e deixou apenas a Universidade de São Paulo (USP), mesmo tendo diversos vários autores de diferentes instituições. O correto é: Diego S. Assis^{1,2*}, Ted R. Schultz², Skylar Brodowski², G. Asher Newsome³, Fabio S. Nascimento¹

¹Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP)-Universidade de São Paulo, 14040-901, Ribeirão Preto-SP, Brazil; ² Department of Entomology, National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, Washington, DC 20013-7012; ³ Museum Conservation Institute, Smithsonian Institution, 4210 Silver Hill Road, Suitland, MD 20746

*Current address: Institute of Biosciences, Department of General and Applied Biology, São Paulo State University (UNESP), Rio Claro, São Paulo, Brazil.

Ants manage polyol production to fight fungal antagonists

Diego Santana Assis,¹ Sérgio Kakazu,¹ Mateus Oliveira da Cruz,¹ Raphael Affonso Pereira da Silva,¹ Vitor Rodrigues Marin,¹ Milene Ferro,¹ Daiane Cristina Sass,¹ André Rodrigues,¹ Maurício Bacci Jr¹

AUTHOR AFFILIATION See affiliation list on p. 13.

ABSTRACT The attinas, ants of the *Attina* subtribe (Formicidae: Myrmicinae), colonize vast areas in the American continent. This impressive fitness depends on culturing mutualistic fungi in their “fungus gardens” to digest biomass. *Atta bisphaerica*, a derived leafcutter attina, degrades plant biomass into polyols in their fungus gardens. The proposed strategic use of polyols to accumulate energy and preserve digestive fungal exoenzymes is a fascinating evolutionary development in ants. We found that polyol production is a conserved trait among derived and less derived attinas. However, *Leucoagaricus gongylophorus*, the mutualistic fungus with the more derived leafcutter ants, expresses an incomplete set of enzymes necessary to reduce carbohydrates to polyols compared to *Leucocoprinus* sp., the mutualistic fungus of less derived ants. Although ants search for and consume these polyols with lower priority than glucose, polyols are important for developing and sporulating antagonistic fungi living in the fungus gardens. Therefore, despite the massive and widespread production by the fungus garden and the proposed benefits, polyols do not attract or preferentially feed the ants but stimulate invading fungi. Thus, the production of polyols was not a decisive factor in attracting ants to establish mutualism with fungi but rather in spreading fungi that can threaten ant colonies. Ants’ evolution mitigated this setback by increasing by-product diversity, minimizing polyol concentration, and switching to mutualistic fungi lacking the expression of critical enzymes for polyol biosynthesis.

IMPORTANCE Microbial communities are critical elements of biodiversity modulating life on Earth. Insects interact intensely with microorganisms to obtain nutrients. They also suffer from diseases caused by microbial infections. The present study is an example of how the different actors of a microbial community interact with each other and their insect hosts. We found that polyols produced by microbes that digest plant matter affect nutrition and facilitate infections in leafcutter ants. This knowledge is crucial for understanding ant-microbe interaction and controlling agricultural pest leafcutter ants.

KEYWORDS *Acromyrmex*, *Atta*, *Attina*, insect infection, insect nutrition, *Leucoagaricus*, *Leucocoprinus*, mannitol, *Mycocetopus*, SDG 15 life on land

Ants in the subtribe *Attina* live in North, Central, and mainly South America (1, 2). Attinas harvest various substrates to culture mutualistic fungi inside their nest. The fungus grows in the so-called fungus garden, digesting substrates to feed the ants (3, 4). This ancient mutualism thrived for 65 million years, leading to morphological and metabolic specialization and reciprocal benefits for both partners (5, 6).

The most derived attinas are the leafcutters in the genera *Atta*, *Acromyrmex*,

Editor Blaire Steven, Connecticut Agricultural Experiment Station, New Haven, Connecticut, USA

Address correspondence to Maurício Bacci, mauricio.bacci@unesp.br.

The authors declare no conflict of interest.

See the funding table on p. 13.

Trabalho #266

METABOLISMO DE POLÍOIS POR FUNGOS ASSOCIADOS À FUNGICULTURA DAS FORMIGAS ATÍNEAS

Maria Izabela Tavares dos Santos ¹; Diego Santana de Assis ¹; Mateus Oliveira da Cruz ¹; Maurício Bacci Jr ²; Andre Rodrigues ²

¹Bolista. Avenida 24 A, 1515, Bela Vista, Rio Claro-SP, 13.506-900. Departamento de Biologia Geral e Aplicada, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro-SP.; ²Docente. Avenida 24 A, 1515, Bela Vista, Rio Claro-SP, 13.506-900. Departamento de Biologia Geral e Aplicada, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro-SP.

Resumo:

Formigas cultivadoras de fungos (Attini, Formicidae), como as do gênero *Acromyrmex*, coletam grande quantidade de material vegetal. Este é oferecido como substrato ao fungo mutualista, *Leucoagaricus gongylophorus* (Basidiomycota: Agaricales), que utiliza sua maquinaria enzimática para converter o material vegetal em glicose e, posteriormente, em polióis, acumulado em abundância no jardim de fungo. No entanto, não se sabe se outros organismos presentes no jardim de fungo atuam no metabolismo e/ou assimilam os polióis. Neste sentido, avaliamos o crescimento de *Cladosporium* sp., *Escovopsis weberi*, *Syncephalastrum* sp. e *Trichoderma spirale*, abundantes em colônias de *Acromyrmex lundii*, após 12 dias em meios de cultivo sólido contendo extrato de jardim, celulose, glicose e os polióis (manitol, inositol e sorbitol) como fontes de carbono. Todos os fungos, com exceção de *E. weberi*, se desenvolveram em todos os meios, bem como no tratamento controle, contendo apenas água. O crescimento dos fungos (diâmetro da colônia) variou em média de 0,8 a 8 cm, sendo que *Syncephalastrum* sp. e *T. spirale* apresentaram maior crescimento. O crescimento generalista nos diferentes meios aponta que esses fungos podem utilizar do metabolismo de polióis por *L. gongylophorus*, mas não apresentam dependência nutricional destes compostos, uma vez que conseguem se utilizar de celulose para o crescimento. No entanto, *E. weberi* se desenvolveu apenas em meio de cultivo com extrato de jardim (0,8 cm), glicose (0,8 cm) e manitol (7 cm). Mesmo com a necessidade de glicose e manitol para desenvolvimento, *E. weberi* não atua no metabolismo de polióis, assim indicando que esse fungo necessita de um microrganismo produtor de manitol. Estes resultados adicionam o conhecimento sobre ecologia química do jardim, uma vez que outros microrganismos devem participar do metabolismo de polióis, além do fungo cultivado.

Palavras-chave: Ecologia; Microfungos; Interação química



Certificamos que o trabalho intitulado **Polyols metabolic pathways analysis in Attina ant's fungi** de autoria de **Diego Santana Assis; Milene Ferro; Lara Cavalari Santello; Maurício Bacci Júnior**, foi apresentado na sessão de **Pôsteres** durante o **69º Congresso Brasileiro de Genética**, evento realizado de 20 à 23 de Agosto 2024, na cidade de Campos do Jordão - SP.


Célia Maria de Almeida Soares
Presidente da SBG

 **SOCIEDADE
BRASILEIRA
DE GENÉTICA**


Ana Maria Benko Iseppon
Primeira Secretária da SBG



Genética 2024
International Congress of the Brazilian Genetics Society

**GENÉTICA
EVOLUTIVA**

POLYOLS METABOLIC PATHWAYS ANALYSIS IN ATTINA ANT'S FUNGI

Diego Santana Assis¹; Milene Ferro¹; Lara Cavalari Santello¹; Maurício Bacci Júnior¹

¹. Av 24A, 1515, Rio Claro, São Paulo. Universidade Estadual Paulista

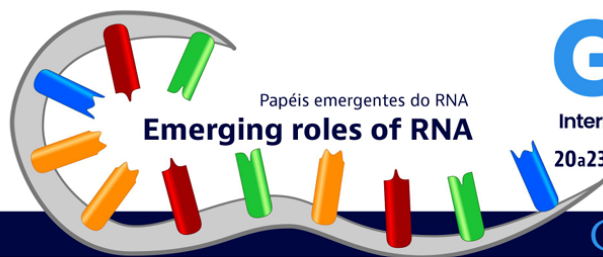
Abstract:

Ants of the Attina subtribe colonize the American Continent, with most species found in the Neotropical region. They occur in more than 250 species, all relying on mutualistic fungi for nutrition. Attinas split into two natural groups named Paleoattina and Neoattina, and they use five farming systems or fungi cultures defined according to the phylogenetic affiliation of the mutualistic fungi. The relationship allows the fungi to convert plant biomass into valuable compounds, such as polyols. We analyze four routes for distinct polyols throughout transcriptomes from *Leucoagaricus gongilophorus*, a mutualistic fungus associated with Neoattina ants (*Atta*, *Acromyrmex*, and *Mycetomollarius*), as well as a fungus cultivated by the Paleoattine ant, *Mycocrepus goeldii*. The transcripts used were obtained from fungi cultured in Yeast Nitrogen Base liquid culture medium with starch as a carbon source to induce the production of polysaccharides. We focused on enzymes related to the metabolic pathways converting cellulose to the polyols mannitol, sorbitol, inositol, and xylitol. We identified genes coding for 20 enzymes within nearly identical pathways for both fungi, except that paleoattines use glucokinase and neoattines use hexokinase to phosphorylate glucose. We hypothesize this difference is related to the broader substrate affinity of hexokinase, allowing nutrition on various carbohydrate sources necessary for neoattines to obtain energy for maintaining large colonies. As the shift may have resulted in an evolutionary advantage, as a single enzyme can phosphorylate various compounds, it also means a possibility of biotechnological use of fungi metabolism to convert various carbohydrate sources to polyols with economic purposes.

Palavras-chave: Fungus-growing ants; Polyols; Mutualism; ;

Support / Acknowledgment

We thank to FAPESP for financial support for this project (Process numbers: #2021/10639-5; #2020/12423-7; #2019/03746-0)



69^o CBG
Genética 2024
International Congress of the Brazilian Genetics Society

20a23|08|2024 ★ Campos do Jordão Convention Center|SP

HONORED: Maria Paula Cruz Schneider

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado **Testing of preservation methods for microbial Community Dynamic Studies** de autoria de **Lara Cavalari Santello; Diego Santana Assis; Milene Ferro; Juliana Silveira dos Santos ; Milton Ribeiro; Mauricio Bacci Jr**, foi apresentado na sessão de **Pôsteres** durante o **69^o Congresso Brasileiro de Genética**, evento realizado de 20 à 23 de Agosto 2024, na cidade de Campos do Jordão - SP.

Célia Maria de Almeida Soares
Presidente da SBG

SOCIIDADE
BRASILEIRA
DE GENÉTICA

Ana Maria Benko Iseppon
Primeira Secretária da SBG



69^o CBG
Genética 2024
International Congress of the Brazilian Genetics Society

GENÉTICA DE
MICRORGANISMOS

TESTING OF PRESERVATION METHODS FOR MICROBIAL COMMUNITY DYNAMIC STUDIES

Lara Cavalari Santello ¹; **Diego Santana Assis** ¹; Milene Ferro ¹; Juliana Silveira dos Santos ^{1,2}; Milton Ribeiro ²; Mauricio Bacci Jr ¹

¹. Avenida 24A, 1515, 13506-900, Rio Claro, SP, Brazil.. Molecular Evolution Laboratory, Institute of Biological Sciences, São Paulo State University - Rio Claro Campus; ². Avenida 24A, 1515, 13506-900, Rio Claro, SP, Brazil.. Spatial Ecology and Conservation Lab (LEEC), Department of Biodiversity

Abstract:

The microbial diversity can affect the development and health of ants. On the other hand, ant colonies may influence the surrounding soil's microbial community. To understand this community dynamics, standardization of data collection is crucial, and it is a pressing need to ensure consistency and reliability during scientific research. In our research project, we intend to select a sample preservation method to test the effect of geographic location on the microbial diversity of several soil and ant samples. The samples were collected from two locations: Belém, city Pará state and the Museu da Amazônia (MUSA) in Manaus, AM. At each location, five ants of the genus *Atta* and 0.3 g of soil were collected in Eppendorf tubes containing 0.9 µL of preservative, either RNA-Later (Thermo Fisher Scientific) or DNA/RNA Shield™ (Zymo Research). Then, we employed a metabarcoding approach, sequencing the 16S rRNA genes for bacterial community analysis, as carried out by ZymoBIOMICS Targeted Sequencing Service facilities (CA, USA). Finally, we used the statistical software R to calculate ecological indicators. We found a higher Shannon diversity in samples preserved with DNA/RNA Shield™ (3.69 ± 0.53) compared to RNA-Later (2.35 ± 1.31), with a statistically significant difference ($p\text{-value} < 0.001$). Ants collected from the Museu da Amazônia forest showed higher diversity (8.78 ± 1.76) than those from the urban area of Belém (3.69 ± 0.53), with a $p\text{-value} < 0.001$. Finally, Shannon's diversity in soldiers (4.04 ± 0.46) was significantly ($p\text{-value} < 0.001$) lower than in winged males (9.12 ± 1.86), workers (8.78 ± 1.76) and soil (7.46 ± 1.33). Our data indicate that preservation methods change diversity results and that microbial community diversity was higher in forests than in urban areas or workers than in other ant castes. After method standardization, we will address important questions regarding changes and dynamics of microbial communities in soil and ants in preserved versus urban areas to understand these complex ecosystems.

Palavras-chave: microbial communities; standardization of collection; metabarcoding; ;

Support / Acknowledgment

Funding: Center for Research on Biodiversity Dynamics and Climate Change (FAPESP 2021/10639-5; 2020/12423-7) and CAPES (Finance Code 001).

Cursos realizados

Declaração de Participação

Declaramos que **Diego Santana Assis**

Participou do **Treinamento operacional e em aplicações da plataforma 3500**, oferecido pela Thermo Fisher Scientific, no(s) dia(as) 18/09/2024- 20/09/2024 com carga horária de 20 hs


Eloisa Dognani Castro

Field Application Scientist
Thermo Fisher Scientific
Life Sciences Solutions

2024-7201-GSD

Customer Experience Center

ThermoFisher
SCIENTIFIC