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

RAFAEL RODRIGUES DA COSTA

Perfil enzimático e potencial biotecnológico de fungos isolados de jardins das formigas cortadeiras

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

Rio Claro - SP
2014

RAFAEL RODRIGUES DA COSTA

Perfil enzimático e potencial biotecnológico de fungos isolados de jardins das formigas cortadeiras

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área: Microbiologia Aplicada).

Orientador: Prof. Dr. André Rodrigues

Co-orientadora: Profa. Dra. Lara Durães Sette

**Rio Claro - SP
2014**

Dedico esse trabalho aos meus pais, Aparecido e Bila, minha irmã Ana Carolina e ao meu sobrinho Luis Otávio, pelo amor, carinho, confiança e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Levei muito tempo para entender, cheguei até a relutar, mas hoje posso concluir que a vida é formada por ciclos, os quais também podem ser chamados de capítulos, e esses, se encerram. A cada capítulo, novos cenários, novos enredos, desfechos e personagens vão surgindo, alguns somente figurantes, porém, outros acabam se tornando protagonistas, elementos chave da história, e são a esses personagens, os personagens da minha história que devo meus agradecimentos.

Segundo o dicionário da língua portuguesa agradecer significa: *mostrar, demonstrar gratidão*, desta forma gostaria de agradecer primeiramente a Deus, pelo dom da sabedoria e força nos momentos de fraqueza e solidão.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de mestrado e pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento desse projeto.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Área: Microbiologia Aplicada), a todos os docentes e profissionais envolvidos no programa.

Ao Departamento de Bioquímica e Microbiologia e todos os funcionários, em especial ao Laboratório de Microbiologia Industrial e Ambiental (LAMAI), ao Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos, ao Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), em especial o Laboratório de Microbiologia.

Agradeço ao Laboratório de Insetos Sociais-Praga da UNESP de Botucatu e ao Instituto de Química da UNESP de Araraquara, em especial ao Laboratório de Enzimas Microbianas.

Ao Prof. Dr. André Rodrigues pela oportunidade de ter trabalhado durante esses dois anos em seu laboratório e fazer parte de uma equipe brilhante. Agradeço pela ótima orientação, paciência, conselhos, conversas, discussões e puxões de orelha. Sem sombra de dúvidas, meu amadurecimento profissional é decorrente de sua dedicação como orientador.

A Profa. Dra. Lara Durães Sette pela co-orientação.

Agradeço a Profa. Dra. Daniella Alonso Bocchini e suas alunas por terem aberto as portas de seu laboratório para a realização das fermentações em estado sólido e dosagens enzimáticas.

Ao Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca, pela oportunidade de ter realizado meu primeiro estágio na UNESP de Rio Claro e ter me permitido conhecer o mundo mágico das formigas cortadeiras e seus simbiontes.

Aos meus amigos Renata, Nathy, Paula, Isabela, Danilo, Granada, Bruna, Heron, Cis, Ives, Quimi, Lucas, Mariana, Cecília, Roberta, Grazy, Fabrício, Marcela, Vinícius, Maria Jesus, César,

Virginia, Ife, Silvio, Daniela, Daiane e Maria Carolina. Agradeço pelas risadas, companhia, festas, enfim, muito obrigado a todos.

Em especial gostaria de agradecer as minhas amigas, Mariana (Tchenha), Thayse (Momô), Jaqueline (Jaqueta), Viviane (Bivis), Paola (Bratcho) e Sadala (Sô), as quais, em pouco tempo de convivência, se tornaram irmãs. De vocês, levo as melhores lembranças!

Aos meus amigos de república Ana Maria, Bárbara, Dai, Gu, Tassed e Van. Obrigado pelas risadas, comilanças, cervejas e segredos. A companhia de vocês foi fundamental. Amo vocês!

Gostaria de fazer um agradecimento especial a Weilan Paixão. Não tenho palavras para agradecer toda a ajuda durante o desenvolvimento do meu projeto. Obrigado pela amizade, suporte emocional, conselhos e desabafos. Você foi a minha mãe durante minha estadia em Rio Claro.

A minha irmã de sangue Ana Carolina, ao meu cunhado Thiago e ao meu sobrinho e afilhado Luis Otávio. Obrigado pelo apoio, amor e compreensão em relação a minha ausência e falta de tempo. As minhas irmãs de criação Letícia e Sergy. Obrigado por permanecerem ao meu lado, se fazerem tão presentes em minha rotina diária, independente da distância física. Sem vocês tudo teria sido mais difícil. Amo vocês.

Para finalizar gostaria de agradecer ao meu pai Aparecido, pelas cobranças desde os primeiros períodos escolares, pelo incentivo aos estudos, por todo o suporte emocional e financeiro durante toda minha trajetória escolar. A minha mãe Bila, meu exemplo de força, determinação e superação, meu porto seguro! A pessoa que me apoiou em todas as minhas escolhas e decisões, independente de quais fossem. Obrigado pela amizade, cumplicidade e amor. Amo vocês Pai e Mãe.
Mais uma vez, conseguimos!!!

“Metade de mim agora é assim:
de um lado a poesia, o verbo, a saudade,
do outro a luta, a força e a coragem pra chegar ao fim!
O fim é belo, incerto... depende de como você vê.”

(O Anjo mais velho – Fernando Anitelli)

RESUMO

As formigas cortadeiras abrigam em seus ninhos uma complexa comunidade microbiana. Esses insetos mantêm um mutualismo com fungos, os quais servem como alimento para a colônia. Além do parceiro fúngico, outros fungos também estão presentes nos ninhos das formigas cortadeiras, porém, pouco se conhece a respeito do papel ecológico que desempenham na associação. A partir de uma coleção de 235 isolados de fungos mantidos na Central de Recursos Microbianos da UNESP, o presente estudo teve como objetivo caracterizar o perfil enzimático desses micro-organismos, os quais foram obtidos de ninhos de *Atta sexdens rubropilosa* (cortadeira de dicotiledônea) e *Atta capiguara* (cortadeira de monocotiledônea). Uma técnica de triagem enzimática de alto desempenho foi adaptada neste trabalho para realizar a análise simultânea de isolados produtores de amilase, celulase, polimetilgalacturonase, poligalacturonase e xilanase. Do total de isolados, 94% (n= 220) foram produtores de pelo menos uma das enzimas avaliadas. As proporções de isolados produtores de celulase, polimetilgalacturonase, xilanase e poligalacturonase foram de 72, 71, 53 e 33%, respectivamente. Nenhum isolado produziu amilase. Segundo a análise de correspondência, os isolados provenientes de ninhos de *A. sexdens rubropilosa* e de *A. capiguara* apresentaram um perfil enzimático relacionado com a produção de poligalacturonases e xilanases, respectivamente. Essa diferença está intimamente relacionada ao tipo de substrato vegetal utilizado pelas formigas para cultivar o fungo mutualista. Os fungos *Penicillium citrinum* e *Fusarium solani* foram selecionados dentre os 235 isolados, para serem utilizados em ensaios de crescimento do fungo das formigas. Quando o fungo mutualista foi cultivado na presença dos produtos de hidrólise de polissacarídeos vegetais gerados por *P. citrinum* e *F. solani*, foi observado um crescimento significativo do fungo das formigas nos produtos de hidrólise de carboximetilcelulose e xilana. Tal evidência corrobora a hipótese de que os micro-organismos presentes nos ninhos das formigas podem auxiliar na degradação do material vegetal, com conseqüente liberação de nutrientes para o fungo mutualista. Além do aspecto ecológico, o presente estudo também abordou o potencial biotecnológico de *P. citrinum* e *F. solani*. Através de fermentações em estado sólido utilizando diferentes substratos, *P. citrinum* demonstrou uma expressiva atividade xilanolítica, enquanto que *F. solani* apresentou uma maior atividade de β -glicosidase. Os resultados do presente trabalho sugerem que fungos associados aos ninhos das formigas cortadeiras podem apresentar um papel ecológico no mutualismo formiga-fungo. Adicionalmente, o estudo demonstrou que os ninhos desses insetos podem ser uma importante fonte de micro-organismos com potencial biotecnológico, porém, ainda pouco explorada.

PALAVRAS-CHAVE: tribo Attini. *Atta*; Simbiose. Enzimas. Substrato vegetal. Microfungos.

ABSTRACT

Leaf-cutting ants harbor in their nests a complex microbial consortium. These insects maintain a mutualistic interaction with fungi cultured for food. In addition to the fungal partner, alien fungi are also present in leafcutter nests, but little is known about the ecological role they play in the interaction. From a pool of 235 fungal isolates kept at the UNESP-Microbial Resource Center, we characterize the enzymatic profile of these microorganisms derived from nests of *Atta sexdens rubropilosa* (dicot-cutting ant) and *Atta capiguara* (grass-cutting ant). An adapted high-throughput screening approach was used to assess the production of cellulase, pectate lyase, polygalacturonase and xylanase. Regarding the total number of isolates, 94% (n = 220) were positive for at least one of the tested enzymes. Cellulase, polymethylgalacturonase, polygalacturonase and xylanase were produced by 72, 71, 53 and 33% of the total isolates, respectively. No fungi produced amylase. According to the correspondence analysis, isolates belonging to *A. sexdens rubropilosa* and *A. capiguara* nests had an enzymatic profile related to the production of polymethylgalacturonase and xylanases, respectively. Such difference is likely related to the type of plant substrate used by the ants to nourish their fungal cultivar. The fungi *Penicillium citrinum* and *Fusarium solani* were selected among the 235 isolates and used in growth assays of the ant cultivar. When the mutualistic fungus was grown in the hydrolysis products of plant polysaccharides generated by *P. citrinum* and *F. solani*, we observed a significant growth of the ant fungus in the hydrolysis products of carboxymethylcellulose and xylan. Such results support the hypothesis that microorganisms found in nests of leaf-cutting ants may assist in the degradation of the plant material present in the nest, with consequent release of nutrients to the fungal mutualist. In addition to the ecological approach, this study also addressed the biotechnological potential of *P. citrinum* and *F. solani*. Using solid state fermentations, *P. citrinum* showed a significant xylanolytic activity, whereas *F. solani* showed a high activity of β -glucosidase. The results of the present study suggest that fungi associated with nests of leaf-cutting ants may have an ecological role in the ant-fungus association. In addition, our study showed that leafcutter nests are an important source of microorganisms with biotechnological potential; however, this source is still poorly explored.

KEYWORDS: Attini tribe. *Atta*. Symbiosis. Enzymes. Plant material. Microfungi.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Aspecto geral do jardim de fungo das formigas cortadeiras. A: Jardim de fungo de *Atta capiguara* (cortadeira de monocotiledônea). B: Jardim de fungo de *Atta sexdens rubropilosa* (cortadeira de dicotiledônea). Dependendo do substrato vegetal forrageado pelas operárias, o jardim de fungo apresenta aspectos diferenciados..... 15
- Figura 2.** Placa de Petri contendo canudos para inoculação do extrato enzimático bruto.....31
- Figura 3.** Halos de hidrólise (área claras ao redor dos canudos) demonstrando a presença de enzimas extracelulares. (A) celulase, (B) polimetilgalacturonase, (C) poligalacturonase, (D) xilanase. No caso da poligalacturonase, o resultado positivo é indicado por pontos rosas, que indica a presença do produto da hidrólise gerado por esta enzima.....42
- Figura 4.** Porcentagem de isolados de fungos obtidos de jardins das formigas cortadeiras *Atta capiguara* (n= 117 isolados) e *Atta sexdens rubropilosa* (n= 118 isolados) produtores de enzimas extracelulares. 43
- Figura 5.** Distribuição das comunidades de fungos em relação às enzimas polissacaridasas avaliadas. As comunidades de fungos estão representadas pelos ninhos das quais foram obtidas (ninhos 1 a 4, *Atta capiguara*; ninhos 5 a 8, *Atta sexdens rubropilosa*). Porcentagens nos eixos correspondem ao total da variação explicada por componente. 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Formulação dos meios sólidos contendo substratos específicos para as enzimas analisadas e o método de análise dos resultados.	30
Tabela 2. Fungos utilizados como controle positivo nas triagens enzimáticas dos fungos isolados de jardins formigas cortadeiras	30
Tabela 3. Fungos isolados de jardins de duas espécies de formigas cortadeiras (<i>Atta capiguara</i> e <i>Atta sexdens rubropilosa</i>), mantidos na Central de Recursos Microbianos da UNESP. As identificações dos fungos foram realizadas segundo PEREIRA (2014).	38
Tabela 4. Média das atividades enzimáticas (U mL ⁻¹ ± desvio padrão) de fungos provenientes de jardins de formigas cortadeiras, cultivados em meios contendo diferentes polissacarídeos como fonte de carbono.	46
Tabela 5. Crescimento micelial (peso seco em mg) do fungo mutualista de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> em diferentes meios de cultivo contendo produtos de hidrólise (açúcares residuais em mg L ⁻¹) de polissacarídeos por <i>Penicillium citrinum</i> (P.c.) e <i>Fusarium solani</i> (F.s.). Médias ± desvio padrão.	47
Tabela 6. Média das atividades enzimáticas dos fungos <i>Penicillium citrinum</i> e <i>Fusarium solani</i> selecionados cultivados em diferentes substratos sólidos (FES).	48

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 ESTADO DA ARTE	14
2.1 Associação entre o fungo mutualista e as formigas da tribo Attini	14
2.2 Metabolismo do fungo mutualista	16
2.3 Micro-organismos associados às formigas cortadeiras: diversidade e papel funcional.....	18
2.4 Degradação do substrato vegetal por micro-organismos presentes no jardim das formigas cortadeiras.....	21
2.5 Potencial biotecnológico de micro-organismos	23
2.5.1 Potencial biotecnológico de micro-organismos associados a insetos	23
2.5.2 Enzimas de origem microbiana.....	25
3 OBJETIVOS	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.2 Triagem enzimática	29
4.3 Seleção de fungos para avaliação do efeito no crescimento do fungo mutualista das formigas	31
4.3.1 Cultivo em substratos puros	32
4.3.2.1 Endoglucanase (CMCase)	32
4.3.2.2 β -glicosidase	33
4.3.2.3 FPase	33
4.3.2.4 Pectinases	34
4.3.2.5 Xilanase	34
4.4 Experimento de crescimento do fungo mutualista	34
4.4.1 Preparação do inóculo	34
4.4.2 Preparo dos meios de cultivo para o crescimento do fungo mutualista	35
4.4.3 Análise dos resultados.....	35
4.5 Avaliação do potencial biotecnológico	36
4.5.1 Substratos “in natura” coletados pelas formigas.....	36
4.5.2 Substratos agroindustriais.....	36
5 RESULTADOS	38
5.1 Reativação e composição de fungos da coleção de trabalho	38
5.2 Avaliação do método de determinação da produção enzimática	41

5.3 Perfil enzimático dos fungos dos jardins de formigas cortadeiras.....	42
5.4 Seleção de estirpes para avaliação do efeito no crescimento do fungo cultivado pelas formigas	44
5.5 Experimento de crescimento do fungo mutualista	46
5.6 Potencial biotecnológico dos fungos isolados de formigas cortadeiras.....	47
6 DISCUSSÃO	49
6.1 Método de triagem de isolados produtores de enzimas	49
6.2 Considerações sobre a composição e ecologia dos fungos da coleção de trabalho	49
6.3 Perfil enzimático dos fungos e o provável papel nos jardins de formigas cortadeiras	52
6.4 Experimento de crescimento do fungo mutualista	55
6.5 Potencial biotecnológico de fungos encontrados nos jardins de formigas cortadeiras	57
7 CONCLUSÕES	61
8 PERSPECTIVAS	62
REFERÊNCIAS	63
APÊNDICE	76

1 INTRODUÇÃO

As formigas da tribo Attini são conhecidas por apresentarem um mutualismo obrigatório com o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* (*Basidiomycota: Agaricales*). Esses insetos cortam folhas e flores frescas que utilizam como substrato para o cultivo do fungo, o qual é a principal fonte de alimento da colônia.

O fungo mutualista cultivado pelas formigas apresenta um metabolismo voltado à degradação do substrato vegetal. As enzimas do fungo atuam sobre a estrutura de biopolímeros constituintes do substrato vegetal, tendo como resultado a liberação de açúcares, os quais são utilizados como fonte de nutrição pelo fungo.

Vários estudos apontam a presença de outros fungos nos ninhos das formigas cortadeiras; entretanto, pouco se conhece sobre o papel que desempenham na simbiose. Alguns autores discutem que a ocorrência desses micro-organismos é efêmera, ou seja, esporos são transportados no corpo das formigas ou no substrato vegetal coletado e, uma vez nos ninhos, eles são rapidamente removidos pelas operárias. Por outro lado, estudos recentes sugerem que alguns desses micro-organismos podem desempenhar funções nos ninhos desses insetos.

Embora vários micro-organismos encontrados nesse ambiente apresentem ação antagonista frente ao fungo mutualista, alguns podem ser benéficos. Poucos foram os estudos que testaram a capacidade dos fungos filamentosos e leveduras em degradar o material vegetal existente nos jardins desses insetos e avançar no entendimento do possível papel ecológico desempenhado por esses micro-organismos. É sabido que leveduras isoladas de ninhos de formigas cortadeiras apresentam a capacidade de produzir várias enzimas, algumas delas, atuantes na degradação do substrato vegetal (por exemplo, amilases, celulasas, pectinases, xilanases), o que pode contribuir para disponibilizar nutrientes para o fungo mutualista. Entretanto, nenhum estudo demonstrou ação similar em relação aos fungos filamentosos.

O presente trabalho utilizou como base a seguinte pergunta: fungos presentes nos jardins das formigas cortadeiras podem contribuir na degradação do material vegetal e influenciar o crescimento do fungo mutualista? Partindo da premissa de que o metabolismo fúngico pode ser influenciado pela mudança de substrato, o estudo visou caracterizar o perfil enzimático de fungos associados aos jardins de duas espécies de formigas cortadeiras que apresentam diferentes hábitos de forrageamento (cortadeiras de monocotiledôneas e dicotiledôneas), e analisar se o potencial enzimático desses fungos poderia influenciar o crescimento do fungo mutualista.

Além do aspecto biológico e ecológico da associação entre as formigas cortadeiras e fungos, existe um grande interesse em estudar essa interação, visto que os ninhos desses insetos foram

pouco explorados do ponto de vista biotecnológico. Nesse sentido, o presente trabalho avaliou a seguinte pergunta: fungos associados ao jardim das formigas cortadeiras apresentam potencial enzimático para possíveis aplicações biotecnológicas? Para tanto, fungos que apresentaram um amplo perfil enzimático (i. e. produção de várias enzimas) foram cultivados em diferentes substratos sólidos e dosagens enzimáticas foram realizadas para avaliar o potencial biotecnológico desses fungos.

No geral, os resultados obtidos na triagem enzimática dos fungos permitiram compreender que o perfil enzimático das comunidades desses micro-organismos está relacionado, provavelmente, ao tipo de substrato vegetal coletado pelas formigas. Os dados obtidos com os ensaios de crescimento de *L. gongylophorus* demonstraram que os fungos associados podem disponibilizar açúcares assimiláveis pelo fungo da formiga. Além disso, os resultados dos ensaios de atividade enzimática sinalizam para o potencial biotecnológico dos fungos encontrados nos ninhos das formigas cortadeiras. Esse último resultado abre várias janelas de pesquisa sobre bioprospecção nesse ambiente pouco explorado.

2 ESTADO DA ARTE

2.1 Associação entre o fungo mutualista e as formigas da tribo Attini

As formigas cortadeiras (Hymenoptera, Formicidae, tribo Attini) são insetos sociais que mantêm um mutualismo obrigatório com fungos, os quais são cultivados como alimento (MUELLER et al., 1998). Esses insetos formam um grupo monofilético, compreendendo 16 gêneros e 256 espécies de formigas (SCHULTZ; BRADY, 2008; DELLA LUCIA, 2011; SOSA-CALVO et al., 2013). As formigas cortadeiras ocorrem exclusivamente no continente Americano, desde o sul dos Estados Unidos, até o sul da Argentina (WEBER, 1972; SCHULTZ; MEIER, 1995; MAYHE-NUNES; JAFFE, 1998. SCHULTZ; BRADY, 2008).

O ancestral que originou a tribo Attini desenvolveu a habilidade de cultivar fungos como alimento cerca de 50 milhões de anos atrás (SCHULTZ; BRADY, 2008). Os gêneros *Atta* e *Acromyrmex* (com aproximadamente 45 espécies descritas) surgiram, provavelmente, entre 8 a 12 milhões de anos atrás e fazem parte do grupo das Attini derivadas (NeoAttini), as quais são caracterizadas por apresentarem colônias que podem abrigar milhões de indivíduos, com elevado grau de polimorfismo (SCHULTZ; BRADY, 2008).

Os gêneros *Atta* e *Acromyrmex* são conhecidos como formigas cortadeiras, pois apresentam o hábito de cortar folhas e flores frescas que utilizam como substrato para o crescimento do fungo mutualista. O fungo é disseminado na natureza pelas formigas durante o voo nupcial, momento no qual a fêmea alada leva um fragmento do fungo na cavidade infrabucal (WEBER, 1972). Em contrapartida, o fungo mutualista é a principal fonte de alimento para as larvas desses insetos (PETERNELLI et al., 2004).

Acredita-se que a relação de simbiose observada entre as formigas cortadeiras e o fungo mutualista tenha surgido em decorrência de aspectos nutricionais. O fungo mutualista raramente produz a estrutura de reprodução sexuada (basidioma ou “cogumelo”) necessária para identificação. Nos raros casos de aparecimento dessa estrutura, o fungo foi identificado como *Leucoagaricus gongylophorus* (SINGER, 1986; PAGNOCCA et al., 2001). A principal característica desse fungo é a presença de “gongilídeos”, estruturas formadas na extremidade das hifas que contêm nutrientes, utilizados na alimentação das larvas. Os estudos até o momento indicam que todas as formigas cortadeiras cultivam apenas uma espécie de fungo mutualista e, em cada colônia, existe apenas uma única linhagem do fungo (MUELLER et al., 2010).

O “jardim de fungo” compreende o material vegetal coletado pelas operárias em conjunto com o micélio do fungo mutualista (Figura 1). Esse substrato apresenta uma aparência esbranquiçada dada pela presença do micélio do fungo que recobre o material vegetal (WEBER, 1972). A maioria das espécies de cortadeiras mantem o jardim de fungo no interior de câmaras subterrâneas (WEBER, 1972). Entretanto, algumas formigas cortadeiras também podem construir os jardins na superfície do solo ou mesmo em árvores, porém estes são geralmente recobertos por restos vegetais secos (BRANDÃO et al., 2011).

Figura 1. Aspecto geral do jardim de fungo das formigas cortadeiras. A: Jardim de fungo de *Atta capiguara* (cortadeira de monocotiledônea). B: Jardim de fungo de *Atta sexdens rubropilosa* (cortadeira de dicotiledônea). Dependendo do substrato vegetal forrageado pelas operárias, o jardim de fungo apresenta aspectos diferenciados.



As formigas cortadeiras cortam elevadas quantidades de folhas e devido a esse comportamento são conhecidas como pragas agrícolas (FOWLER et al., 1986; DELLA-LUCIA; GANDRA; GUEDES; 2013). Essas formigas apresentam diferentes hábitos de forrageamento, sendo que algumas espécies utilizam preferencialmente determinadas plantas, por exemplo, *Atta sexdens rubropilosa* tem preferência pelo corte de dicotiledôneas e *Atta capiguara* de monocotiledôneas (Figura 1). Essa preferência pode ser explicada por vários fatores, incluindo a qualidade do material para o forrageamento, valores nutricionais e o peso do substrato em relação ao corpo da operária (ROCES; HOLLOBLER, 1994).

2.2 Metabolismo do fungo mutualista

Vários estudos buscaram entender o metabolismo do fungo mutualista (*L. gongylophorus*) em relação à produção de enzimas que atuam na degradação do substrato vegetal fornecido pelas operárias (BACCI et al., 1995b; SIQUEIRA et al., 1998; ABRIL; BUCHER, 2002; 2004; RØNHEDE et al., 2004; SILVA et al., 2006b, 2006c; KOOIJ et al., 2011; MOLLER et al., 2011; SEMENOVA et al., 2011; AYLWARD et al., 2013).

Estudos demonstraram que o metabolismo do fungo mutualista está intimamente ligado à produção de enzimas que atuam na clivagem dos polímeros de origem vegetal (i.e. ligninas, celulosas e hemicelulosas (xilanas), pectinas, amido, entre outros) tendo como resultado a liberação de oligossacarídeos que permitem o seu desenvolvimento (SIQUEIRA et al., 1998; SILVA et al., 2006b; SILVA et al., 2006c; SCHIØTT et al., 2008; 2010; KOOIJ et al., 2011; AYLWARD et al., 2013). O complexo enzimático do fungo mutualista permite que os nutrientes provenientes da quebra do substrato vegetal sejam disponibilizados para as formigas, desse modo mantendo a simbiose obrigatória que ocorre há milhões de anos (SIQUEIRA et al., 1998; SILVA et al., 2006a, 2006b; KOOIJ et al., 2011; SCHIØTT et al., 2010; AYLWARD et al., 2013).

O primeiro estudo envolvendo o metabolismo do fungo *L. gongylophorus* foi realizado por Martin e Weber (1969) o qual demonstrou que aproximadamente 45% da celulose proveniente do substrato vegetal trazido pelas operárias era consumida pelo fungo. Esses resultados levaram à conclusão de que a principal fonte de nutrição do fungo mutualista era proveniente da quebra da celulose, com consequente liberação de açúcares redutores absorvíveis pelo fungo.

Bacci e colaboradores (1995b) cultivaram o fungo *L. gongylophorus* em um meio contendo como única fonte de carbono celulose microcristalina. No início do experimento o meio de cultivo não continha presença de açúcares solúveis, porém, após 30 dias incubação, foi observada a presença de glicose no meio de cultivo, indicando que o fungo mutualista cultivado pelas formigas cortadeiras era capaz de produzir enzimas extracelulares atuantes na degradação de substratos celulósicos.

Siqueira e colaboradores (1998) cultivaram o fungo mutualista de *A. sexdens rubropilosa* em diferentes fontes de carbono. Os autores detectaram a presença de açúcares redutores após o cultivo de *L. gongylophorus* em meios contendo como única fonte de carbono polissacarídeos como xilana, amido e pectina. A presença de açúcares redutores indicou que o fungo mutualista pode atuar na quebra de diferentes polímeros vegetais, além da celulose. O estudo desses autores foi de encontro à

teoria proposta previamente por Martin e Weber (1969). Ainda, o estudo demonstrou que outros polissacarídeos constituintes do substrato vegetal induziam uma maior liberação de açúcares redutores e maior taxa de crescimento, quando comparados com a celulose. Silva e colaboradores (2006c), assim como Siqueira et al. (1998), cultivaram o fungo mutualista em diferentes fontes de carbono e foi observado que o substrato que induziu a maior liberação de açúcares redutores foi a pectina, sendo este um dos polissacarídeos mais abundantes em alguns substratos de origem vegetal.

Abril e Bucher (2002) avaliaram o crescimento do fungo mutualista em meios contendo diferentes tipos de celulose. Os autores observaram um baixo crescimento do fungo mutualista e argumentaram que o crescimento deste, observado por Martin e Weber (1969) e Bacci e colaboradores (1995b), seria devido à presença de baixas quantidades de fontes alternativas de carbono no meio de cultivo. Dessa forma, os autores sugeriram que o fungo mutualista cultivado pelas formigas, assim como fungos micorrízicos e fungos fitopatogênicos, atua na degradação da lamela média das células vegetais, através de ação enzimática para obter acesso a compostos solúveis do citoplasma, os quais seriam a principal fonte de nutrição.

Abril e Bucher (2004) visando avaliar as características nutricionais de *L. gongylophorus*, cultivaram o fungo em diferentes meios contendo fontes solúveis e insolúveis de carbono (peptona, pectina, quitina e amido) e de nitrogênio (ureia, amônio, asparagina e peptona). Os autores observaram que o fungo mutualista foi capaz de crescer apenas em pectina, sendo esta uma característica geralmente não observada em fungos basidiomicetos saprófitos, mas em fungos biotróficos. Os autores concluíram que os padrões nutricionais e a natureza biotrófica observada no fungo *L. gongylophorus* teriam grande relevância ecológica e evolutiva, desta forma, sendo um aspecto importante a ser estudado.

Com o emprego de análises proteômicas, Schiøtt e colaboradores (2010) identificaram no fluido fecal de operárias de *Acromyrmex echinator*, genes relacionados à degradação do substrato vegetal. No total foram identificados 33 genes, dos quais 21% estão relacionados ao complexo pectinolítico. Esses autores discutem que as enzimas encontradas no fluido fecal, na realidade, são de origem fúngica, provenientes do gongilídeo, o qual é definido como estruturas formadas nas extremidades das hifas, as quais armazenam nutrientes, utilizados como principal fonte de alimento por algumas castas das formigas cortadeiras (WEBER, 1972). Esse resultado é uma evidência do importante papel das operárias na mobilização de enzimas fúngicas em diferentes partes do jardim de fungo (DE-FINE LITCH et al., 2013).

O jardim de fungo apresenta diferentes regiões, nas quais o metabolismo enzimático também se difere (SCHIØTT et al., 2010; DE-FINE LITCH et al., 2013). O topo do jardim é o local onde novos substratos vegetais são adicionados. Essa região é menos passível da degradação enzimática pelo fungo mutualista, visto que seu crescimento é mais lento, quando comparado com outras regiões do jardim. Assim, a capacidade das formigas transportarem enzimas ativas, mesmo após passar pelo aparelho gastro intestinal, demonstra uma adaptação evolutiva desses insetos para o cultivo do fungo.

Em resposta à herbívoros realizada por diversos animais, durante a cadeia evolutiva, plantas desenvolveram mecanismos de proteção, incluindo a produção de metabólitos, por exemplo, compostos fenólicos, os quais são tóxicos para a mucosa gastrointestinal de diversos seres vivos. (COLEY; BRYANT; CHAPIN, 1985). Nesse contexto, De-Fine Litch e colaboradores (2013) observaram que o fungo mutualista produz uma grande quantidade de lacases, enzimas que atuam na quebra de compostos fenólicos proveniente do substrato vegetal coletado por esses insetos. Com análises metaproteômicas, os autores identificaram diversas lacases no material fecal das formigas. Foi demonstrado que essas enzimas provavelmente originaram dos gongilídeos do fungo mutualista, corroborando resultados observados para outras enzimas (SCHIØTT et al., 2010). Dessa forma De-Fine Litch et al. (2013) concluíram que além do transporte da lacase realizado pelas formigas, a produção dessas enzimas estaria intimamente ligada com a detoxificação do ambiente, visto que as mesmas degradam compostos tóxicos produzidos por plantas.

Buscando entender o metabolismo do fungo *L. gongylophorus*, Aylward e colaboradores (2013) sequenciaram o genoma desse fungo e, através de análises metaproteômicas, investigaram o papel das enzimas lignocelulolíticas no jardim de fungo de *Atta cephalotes* e *Acromyrmex echinator*. Os resultados mostraram que o fungo mutualista cultivado por ambas as espécies de formigas cortadeiras produzem uma gama de enzimas lignocelulolíticas, as quais podem atuar na degradação do substrato vegetal presente no ninho. Além disso, os resultados demonstraram que a produção dessas enzimas apresenta uma distribuição espacial, sendo estas produzidas em maiores quantidades na região do topo do jardim.

2.3 *Micro-organismos associados às formigas cortadeiras: diversidade e papel funcional*

Além do fungo mutualista, bactérias, leveduras e outros fungos filamentosos são encontrados nos jardins de fungo das formigas Attini (BACCI et al., 1995a; FISHER et al., 1996;

CURRIE et al., 1999a; RODRIGUES et al., 2008, 2009). Por exemplo, fungos do gênero *Escovopsis* foram encontrados em associação com os jardins das formigas Attini (CURRIE et al., 1999a). Considerados parasitas especializados do fungo mutualista (REYNOLDS; CURRIE, 2004), infecções persistentes por *Escovopsis* podem levar a uma redução no desenvolvimento do jardim de fungo e, ocasionalmente, levar a colônia à morte (CURRIE, 2001).

Actinobactérias associadas aos jardins e operárias das formigas cortadeiras também desempenham um papel fundamental na associação. Currie et al. (1999b), Zucchi et al. (2011), Meirelles et al. (2013) demonstraram que diferentes gêneros de actinobactérias associados à cutícula das operárias apresentam ação inibitória sobre *Escovopsis*. Tal ação ocorre através da produção de compostos com atividade antimicrobiana para o controle do crescimento deste parasita. Actinobactérias pertencentes ao gênero *Pseudonocardia* são reconhecidas por alguns autores como simbiossiontes, tendo estes coevoluído com as formigas, atuando como antagonistas específicos do parasita *Escovopsis* (CURRIE et al., 1999b; CAFARO et al., 2011).

Meirelles e colaboradores (2013) avaliaram a ação antagonista de 12 linhagens de *Pseudonocardia* isoladas de operárias de *Trachymyrmex*, frente a linhagens de *Escovopsis* provenientes de jardins dos gêneros *Trachymyrmex*, *Acromyrmex* e *Atta*. Os autores demonstraram que diferentes linhagens dessa bactéria (isoladas de *Trachymyrmex* spp.) foram capazes de inibir linhagens de *Escovopsis* de diferentes gêneros de formigas cortadeiras, demonstrando a ampla ação antagonista frente ao parasita.

Além de actinobactérias, Little e Currie (2007) demonstraram várias evidências sobre a simbiose entre as formigas da tribo Attini e leveduras negras. Essas últimas são encontradas na cutícula das operárias e foi demonstrado que podem agir como agentes desestabilizadores na associação formiga-actinobactérias (LITTLE; CURRIE, 2008).

Diversos estudos avaliaram a ocorrência de outros micro-organismos nos jardins de formigas cortadeiras (MÖLLER, 1893; FISHER et al., 1996; RODRIGUES et al. 2005, 2008, 2011). O primeiro estudo verificou a presença de fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus*, em ninhos de *Acromyrmex disciger* (MÖLLER, 1893). Fisher et al. (1996) isolaram de ninhos de *A. cephalotes*, mantidos em laboratório, vários gêneros de fungos filamentosos, dentre eles: *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Escovopsis*, *Fusarium*, e *Trichoderma*, os quais foram definidos como contaminantes do jardim de fungo das formigas. Esses estudos demonstraram a ocorrência de micro-organismos nos jardins, porém não avaliaram a possível função que os mesmos poderiam estar desempenhando no jardim.

Craven et al. (1970) estudaram os jardins de fungos de *A. cephalotes* e *Acromyrmex octospinosus* e demonstraram pela primeira vez a ocorrência de leveduras associadas aos ninhos de formigas Attini. Angelis et al. (1983), estudando leveduras do jardim de *A. sexdens rubropilosa* e *Atta laevigata* isolaram 13 espécies de leveduras pertencentes ao gêneros *Candida*, *Kloeckera* e *Rhodotorula*. Carreiro et al. (1997) isolaram diversas espécies de leveduras pertencentes aos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* e *Trichosporon*, de um ninho de laboratório de *A. sexdens rubropilosa*.

Rodrigues et al. (2005, 2008) registraram a ocorrência de diversas espécies de fungos filamentosos em jardins de várias espécies de formigas cortadeiras. Já, Rodrigues et al. (2011) estudaram a diversidade de fungos filamentosos associados a três espécies de formigas da tribo Attini (*Cyphomyrmex wheeleri*, *Trachymyrmex septentrionalis* e *Atta texana*). Os autores realizaram isolamentos durante o período de um ano, no qual foi possível obter uma coleção de 1437 isolados, correspondendo a 99 gêneros e 168 espécies de fungos. Alguns dos gêneros obtidos foram *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Trichoderma*, os quais são comumente encontrados no solo e no substrato vegetal. Alguns dos gêneros encontrados no estudo de Rodrigues e colaboradores (2011) corroboram com alguns previamente observados em trabalhos anteriores (MÖLLER, 1893; FISHER et al., 1996; RODRIGUES et al., 2005, 2008).

Apesar dos estudos mostrarem a presença desses micro-organismos nos jardins de fungos, foram poucos os trabalhos que investigaram o papel funcional dos mesmos na associação formiga-fungo. Poulsen e Currie (2006) sugeriram que os fungos filamentosos e leveduras são componentes transitórios nos jardins de fungos. Entretanto, Pagnocca; Masiulionis; Rodrigues, (2012) sugerem que esses micro-organismos podem apresentar funções específicas nos ninhos das formigas cortadeiras. Ao contrário de *Escovopsis*, os fungos filamentosos e leveduras encontradas nos jardins não seriam parasitas específicos, mas sim organismos oportunistas que podem se beneficiar das condições do ninho, principalmente as leveduras, quando estes se encontram em um estado de desequilíbrio. Experimentos *in vitro* demonstraram o potencial antagonista de alguns fungos filamentosos, como *Cunninghamella* sp., *Fusarium oxysporum* e *Trichoderma* sp., limitando o crescimento do fungo mutualista (SILVA et al., 2006a; PAGNOCCA et al., 2011).

Carreiro e colaboradores (2002) buscaram entender possíveis funções desempenhadas por leveduras nos jardins de formigas Attini. Os autores observaram que provavelmente as leveduras estariam atuando na manutenção da própria comunidade de leveduras através da produção de

toxinas *killer* por algumas estirpes, sinalizando dessa forma um papel importante desempenhado no ninho.

Outras funções também foram descritas para os fungos filamentosos e leveduras nos jardins de formigas cortadeiras. Por exemplo, Rodrigues et al. (2009) isolaram leveduras do jardim de fungos de *A. texana* e observaram que essas foram capazes de inibir o crescimento de *Escovopsis* e de outros fungos que ocorrem nos jardins dessa formiga. Os autores sugerem que tais leveduras podem estar envolvidas na defesa do jardim de fungos contra micro-organismos antagonistas.

2.4 Degradação do substrato vegetal por micro-organismos presentes no jardim das formigas cortadeiras

Embora o fungo mutualista apresente um aparato metabólico totalmente voltado à degradação do substrato vegetal presente no jardim de fungo, acredita-se que os outros micro-organismos presentes nesse substrato também desempenhem um papel no metabolismo enzimático do jardim (BACCI, et al., 1995a; SUEN, et al., 2010, MENDES et al., 2012; ARCURI, 2013).

Foi sugerido que o possível papel desempenhado pelos outros micro-organismos dentro do jardim das formigas cortadeiras é na degradação do substrato vegetal, visto que o fungo mutualista não apresenta grande eficiência enzimática na degradação de alguns polissacarídeos (por exemplo, celulose) (SIQUEIRA et al., 1998; ABRIL; BUCHER; 2002, 2004; SILVA et al., 2006c).

Carreiro (2000) relatou que algumas leveduras presentes nos jardins de fungos podem produzir enzimas hidrolíticas capazes de digerir o substrato coletado pelas operárias. Nesse sentido, Mendes et al. (2012) avaliaram a capacidade enzimática (celulase, amilase, pectinase, xilanase e protease) de 82 isolados de leveduras proveniente de *A. texana* e várias espécies de *Acromyrmex*. Devido à grande variabilidade de produção enzimática observada nos isolados estudados, os autores sugerem que as leveduras (e outros fungos) são capazes de degradar polissacarídeos vegetais encontrados nos jardins de fungos, contribuindo assim na disponibilização de nutrientes prontamente assimiláveis para o crescimento do fungo mutualista, das formigas e da colônia como um todo. Além disso, foi observado que esses micro-organismos apresentam a capacidade de assimilar produtos provenientes da quebra desses biopolímeros (MENDES et al., 2012).

Arcuri (2013) analisou o perfil enzimático e o potencial de assimilação de fontes de carbono de 242 estirpes isoladas da cutícula de bitus de *A. sexdens rubropilosa* e do solo adjacente aos ninhos desses insetos. O autor realizou triagens enzimáticas em meios sólidos para as enzimas

CMCase (endoglucanase), pectinases (polimetilgalacturonase e poligalacturonase), lipase, xilanase e ligninases. Os resultados obtidos no citado estudo demonstraram que 87,1% das estirpes de leveduras analisadas foram positivas para pelo menos uma das enzimas analisadas, sinalizando o alto potencial das leveduras na degradação de substratos vegetais; corroborando os resultados de Mendes et al. (2012). Além disso, foi observado que a maioria das estirpes foi capaz de assimilar glicose, ácido galacturônico, celobiose, maltose e xilose. Vale destacar a grande porcentagem de isolados que apresentaram a capacidade de assimilar o ácido galacturônico (70,6%). Siqueira e colaboradores (1998) observaram que o fungo mutualista assimila pouco esse resíduo da hidrólise de substâncias pécticas e, posteriormente, Silva e colaboradores (2003) observaram que o ácido galacturônico apresenta efeito tóxico para as formigas. Assim, foi sugerido por Mendes et al., (2012) e Arcuri (2013) que as leveduras com potencial de assimilar esse monossacarídeo poderiam atuar como agentes detoxificantes no ninho, reforçando os resultados observados por Mendes et al. (2012) onde 64% das leveduras isoladas de ninhos de *A. texana* e 79% de leveduras isoladas de ninhos de *Acromyrmex* spp. analisadas pelos autores foram capazes de assimilar esse composto.

Bacci et al. (1995a) e Ribeiro (2000) isolaram bactérias do jardim de fungos de *A. sexdens rubropilosa* e encontraram linhagens que produzem celulases, pectinases, amilases e proteases. Através dos resultados obtidos pelos autores foi sugerido que esses micro-organismos podem atuar na degradação da matéria vegetal

Suen e colaboradores (2010) revelaram através de métodos independentes de cultivo que o jardim das formigas cortadeiras apresenta uma diversa comunidade de bactérias com alto potencial de degradação de materiais lignocelulósicos. Observou que o metagenoma do jardim das formigas cortadeiras assemelha-se em termos de função, ao metagenoma encontrado no rúmen de animais, visto que existem muitos genomas voltados para a degradação de materiais de origem vegetal. Os dados obtidos pelos autores podem sugerir que as bactérias atuam na degradação de materiais celulolíticos dentro do jardim, desta forma, auxiliando o fungo mutualista no processo de degradação dos substratos incorporados ao ninho.

2.5 Potencial biotecnológico de micro-organismos

2.5.1 Potencial biotecnológico de micro-organismos associados a insetos

Bioprospecção pode ser definido como: explorar a biodiversidade e obter recursos genéticos para fins comerciais e desenvolvimento tecnológico (FIRN, 2003). A obtenção de novos recursos genéticos é um aspecto relevante a ser destacado visto que, micro-organismos apresentam a capacidade de produzir novos compostos, podendo estes, serem aplicados em diversos processos industriais (BULL et al., 2000).

Devido aos problemas ambientais decorrentes do avanço industrial, muitos desses processos têm sido substituídos por processos biocatalíticos, utilizando micro-organismos e seus produtos (BULL et al., 2000; EGOROVA; ANTRANIKIAN, 2005; ACHARYA; CHAUDHARY, 2012).

Ambientes pouco explorados podem abrigar uma grande diversidade de micro-organismos, com potencial para a produção de bioprodutos de grande interesse econômico (BULL, et al., 2000; EGOROVA; ANTRANIKIAN, 2005). Identificar novas fontes de produtos de interesse farmacêutico é outro aspecto a ser considerado, visto que diversas novas linhagens de micro-organismos patogênicos surgem ou se tornam resistentes às drogas já conhecidas (BERDY, 2005; TAUBES, 2008).

No geral, micro-organismos simbiotes também podem representar uma promissora fonte para prospecção de novos compostos, visto que os mesmos são pouco explorados do ponto de vista biotecnológico (MORAN, 2006; SCHMIDT, 2008; CLARDY; FISCHBACH; CURRIE, 2009). É sabido que relações ecológicas entre diferentes organismos geralmente envolvem a produção de pequenas moléculas, por exemplo, para a defesa do hospedeiro (PIEL et al., 2005; SCOTT et al., 2008; OH et al., 2009). Essas moléculas podem apresentar interesse de cunho biotecnológico.

Em um estudo recente realizado por Poulsen et al. (2011), os autores avaliaram o potencial de produção de novos compostos em actinobactérias associadas a duas espécies de vespas solitárias, *Sceliphron caementarium* e *Chalybion californicum*. Os autores realizaram isolamentos a partir de 33 vespas e recuperaram mais de 200 isolados de actinobactérias pertencentes ao gênero *Streptomyces*. Através de análises químicas foram identificados aproximadamente 11 metabólitos secundários, incluindo novos lactâmicos monocíclicos polinsaturados. Além da produção de metabólitos secundários, os autores observaram que as linhagens de actinobactérias isoladas apresentaram atividade antifúngica e antibacteriana frente a outros micro-organismos. A atividade

antimicrobiana e a produção de metabolitos secundários específicos sugerem o papel exercido por essas actinobactérias na simbiose com as vespas, no que tange a defesa de seu hospedeiro frente ao ataque de micro-organismos entomopatogênicos.

Poulsen (2010) sugeriu que a base das interações entre as formigas cortadeiras e seus simbiontes microbianos envolve a produção de moléculas ainda não conhecidas pela ciência. O autor enfatiza que muitas dessas moléculas desconhecidas, porém funcionais para a simbiose, podem apresentar interesse biomédico e farmacêutico. De fato, Poulsen (2010) afirma que a interação entre as formigas Attini e micro-organismos deve ser melhor explorada, com vistas à descrição de novas moléculas. Alguns exemplos de moléculas já descritas da associação incluem: dentigerumicina e dioxipirazina (WANG; MUELLER; CLARDY, 1999; OH et al., 2009).

Suen e colaboradores (2010) observaram que as bactérias encontradas no jardim das formigas cortadeiras assemelham-se a microbiota encontrada no aparato gastrointestinal de ruminantes. Foi observado que esses micro-organismos apresentam um metabolismo voltado à degradação de material celulósico encontrado no jardim de fungo das formigas cortadeiras. Apesar de toda a informação obtida pelos autores através da construção de biblioteca de clones, nenhum estudo foi realizado para observar o potencial biotecnológico dessa microbiota.

Mendes e colaboradores (2013) avaliaram o potencial antifúngico de 24 linhagens de actinobactérias isoladas do tegumento de operárias de *Trachymyrmex* spp. frente a diferentes espécies de *Candida*. Os autores observaram que sete linhagens de actinobactérias apresentaram ação inibitória em, pelo menos, uma linhagem de *Candida*. Após as triagens, uma linhagem de actinobactéria foi selecionada e foi verificada a presença de antimicinas (uralquimicinas) no meio de cultivo, as quais demonstraram atividade antifúngica. Tal estudo sinalizou o potencial de micro-organismos simbiontes na produção de moléculas de interesse farmacêutico, corroborando com a hipótese proposta por Poulsen (2010).

Alguns estudos com foco ecológico foram realizados buscando entender o perfil enzimático de micro-organismos associados ao ninho das formigas cortadeiras (CARREIRO, 2000; MENDES et al., 2012; ARCURI, 2013), entretanto, nenhum estudo sistemático visando conhecer de fato o potencial enzimático e biotecnológico desses micro-organismos foi realizado até o presente momento.

2.5.2 Enzimas de origem microbiana

Enzimas são proteínas com funções catalíticas, sendo essas responsáveis por diversas reações biológicas em todas as classes de seres vivos (ENZYME TECHNICAL ASSOCIATION, 2001).

Os micro-organismos apresentam a maior diversidade genética e capacidade metabólica dentre os seres vivos, sendo este, um aspecto a ser explorado (MEYERS, 1996; LEATHERS, 2003; DAROIT, 2007). Os micro-organismos desempenham importantes funções na manutenção de ecossistemas, como componentes fundamentais de cadeias alimentares e dos ciclos biogeoquímicos (MEYERS, 1996; LEATHERS, 2003). Visto que diversas classes de micro-organismos fazem parte do ciclo do carbono, os principais constituintes da parede celular vegetal (i.e. celulose, lignina, pectina e xilana) não se acumulam nos ecossistemas, uma vez que são degradados por sistemas enzimáticos especializados produzidos por micro-organismos (BIELY, 2003).

O uso de enzimas nos mais diversos setores da indústria é justificado por vários fatores: (i) processos de origem enzimática oferecem potencial de redução de custos em longo prazo; (ii) obtenção de rendimentos próximos aos obtidos em reações utilizando químicos, porém em condições menos críticas de temperatura e pressão; (iii) além de processos enzimáticos não acarretarem impactos ambientais (LEATHERS, 2003).

Enzimas podem ser obtidas basicamente de três fontes: animais, vegetais superiores e micro-organismos, sendo a última fonte a mais importante do ponto de vista biotecnológico (HARGER et al., 1982). As enzimas de origem microbiana apresentam características estruturais e bioquímicas que favorecem seu emprego em processos biotecnológicos e as mesmas foram produzidas primeiramente para uso industrial no final do século XIX, (HARGER et al., 1982; CARRERA, 2003; COLEN, 2006). Diversas vantagens são apresentadas pelo uso de micro-organismos para a produção de enzimas como, por exemplo, tempo de geração e produção reduzida; conteúdo de proteína elevado em micro-organismos, quando comparado com a maioria dos vegetais; pequena exigência de água e espaço físico para seus cultivos; uso de substratos diversos e produção de diversas classes enzimáticas por um mesmo micro-organismo (OLIVEIRA et al., 2005).

Alguns aspectos devem ser considerados na produção enzimática a partir de micro-organismo: (i) capacidade do micro-organismo em se desenvolver em substratos de baixo custo; (ii) produção de enzimas em ritmo elevado; (iii) recuperação das enzimas utilizando métodos simplificados e de baixo custo e (iv) estabilidade enzimática (FELLOWS, 1994).

Um dos grandes desafios na produção industrial de enzimas a partir de micro-organismos é o custo dos substratos utilizados para o crescimento dos mesmos, visto que o gasto com esse material pode variar de 30 a 40% das despesas na cadeia produtiva e devido a isso, o uso de substratos alternativos, como os resíduos agroindustriais, demonstrou grande eficiência em sua aplicação em processos de obtenção de enzimas microbianas (JOO; CHANG, 2005; SILVA, 2008).

A utilização de resíduos agroindustriais para a produção de etanol de segunda geração é uma das mais promissoras alternativas de obtenção de combustível líquido, já que é praticamente isento de emissão de gás estufa e pode proporcionar grandes benefícios sócio-econômicos (KUHAD et al., 2011). A utilização de diferentes fontes para produção de bioetanol é uma das características mais promissoras para sua ampla aplicação no futuro (BASSO et al., 2011).

Um dos principais desafios na produção de combustíveis de segunda geração a partir de resíduos agroindustriais é a conversão desses substratos a açúcares fermentescíveis; contudo, a descoberta de enzimas capazes de realizar um pré-tratamento enzimático eficiente é um aspecto a ser destacado. (ALMEIDA, 2007; CHANDRA et al., 2007). Nesse contexto, a busca e obtenção de micro-organismos que apresentem um aparato metabólico voltado à degradação de substratos de origem vegetal é um aspecto relevante a ser considerado (HEADON; WALSH, 1994).

Diversos grupos enzimáticos estão envolvidos na degradação de substratos agroindustriais, incluindo as celulasas, ligninases, pectinases e xilanases (ALMEIDA, 2007; CHANDRA et al. 2007). Diversos trabalhos foram realizados buscando micro-organismos capazes de produzir um complexo enzimático voltado à hidrólise de substratos agroindustriais para possíveis aplicações industriais. Nesse contexto, Moretti e colaboradores (2012) isolaram 27 linhagens de fungos termofílicos e termotolerantes de amostras de solo, matéria orgânica em decomposição e pilhas de compostagem. Através de taxonomia polifásica esses fungos foram identificados como pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Thermomyces*, *Myceliophthora*, *Thermomucor* e *Candida*. Os autores selecionaram as melhores linhagens produtoras de celulasas e xilanases com potencial para aplicações biotecnológicas, incluindo a sacarificação de materiais lignocelulósicos. O resultados obtidos através das atividades enzimáticas para as enzimas xilanase e FPase foram de 15 até 1292 U g⁻¹ e 0.2 até 3.2 U g⁻¹, respectivamente. Os dois isolados que apresentaram o maior potencial enzimático foram selecionados e cultivados em diferentes meios e, posteriormente, analisados em relação à produção das enzimas CMCase (endoglucanase), β -glicosidase e xilanase. Os melhores produtores foram identificados como *Aspergillus fumigatus* e *Myceliophthora thermophila*, os quais apresentaram uma produção máxima de até 7238 U g⁻¹ de xilanase, 40.4 U g⁻¹ de β -glicosidase e 40

até 47 U g⁻¹ de CMCase, respectivamente. No caso do fungo *M. thermophila* as produções variaram de 1044.6 U g⁻¹ para xilanase, 54 U g⁻¹ para CMCase, sendo a última similar a produção da enzima β-glicosidase. O estudo dos autores permitiu a obtenção de isolados com grande potencial biotecnológico, fortalecendo a hipótese de que micro-organismos isolados das mais diversas fontes podem apresentar características desejáveis a processos industriais.

O forte interesse por fungos filamentosos deve-se a sua relatada capacidade de degradar diferentes substratos, a qual pode gerar produtos ou processos, como a obtenção e isolamento de enzimas, biodegradação de resíduos e fermentação em estado sólido de resíduos utilizando o fungo propriamente dito (GRIMM et al., 2005).

Alguns gêneros de fungos se mostraram promissores como produtores de celulase e xilanase, destacando as espécies: *Trichoderma reesei*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma lignorum*, *Sporotrichum pulverulentum*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium janczewskii*, (TERRASAN, 2011), *Penicillium iriensis*, *Aspergillus* sp., *Schizophyllum* sp. e *Chaetomium* sp. (BISARIA; GHOSE, 1981).

Partindo da premissa que o jardim de fungos das formigas cortadeiras é um ambiente pouco explorado do ponto de vista biotecnológico, o presente estudo buscou responder a seguinte pergunta: fungos associados ao jardim das formigas cortadeiras apresentam potencial enzimático para possíveis aplicações biotecnológicas?

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Caracterizar o perfil enzimático e o papel de fungos associados aos jardins de formigas cortadeiras

3.2 Específicos

- Avaliar e comparar o perfil enzimático dos fungos isolados de formigas com diferentes hábitos de forrageamento (cortadeiras de dicotiledôneas e monocotiledôneas).
- Avaliar a contribuição do metabolismo de alguns fungos no crescimento do fungo mutualista.
- Avaliar o potencial enzimático de fungos associados às formigas cortadeiras em diferentes substratos sólidos, com foco em potencial biotecnológico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Origem, reativação e manutenção dos isolados

O presente estudo utilizou uma coleção de fungos mantida no acervo da Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP), Campus de Rio Claro, SP (Apêndice 1). A coleção foi estruturada pela aluna de mestrado Jaqueline Silva Pereira, que identificou os fungos através do sequenciamento da região ITS (PEREIRA, 2014). As estirpes foram isoladas de jardim de fungo de quatro ninhos de *A. capiguara* (cortadeira de gramíneas) e de quatro ninhos de *A. sexdens rubropilosa* (cortadeira de folhas de dicotiledôneas) localizados em uma fazenda próxima ao município de Botucatu, SP. Do total de 235 estirpes utilizadas no presente estudo 117, foram provenientes de ninhos de *A. capiguara* e 118 de ninhos de *A. sexdens rubropilosa*.

Os isolados preservados a -80 °C, em glicerol 10%, foram reativados em ágar malte 2% (MA2%, Acumedia) e incubados a 25 °C, durante sete dias. Após o período de incubação e verificação da pureza das culturas, uma coleção de trabalho foi organizada e armazenada a 4 °C em MA2% inclinado.

4.2 Triagem enzimática

A triagem de isolados produtores de enzimas hidrolíticas (amilase, CMCase (endoglucanase), polimetilgalacturonase, poligalacturonase e xilanase) foi avaliada por um método de alto desempenho (*HTS – High-Throughput Screening*). Tal método foi utilizado previamente por Rojas (2010) para avaliação da ação de compostos antimicrobianos. O protocolo de Rojas (2010) foi adaptado no presente estudo para a realização das avaliações enzimáticas; desta maneira, foi possível realizar a triagem simultânea de até 32 linhagens por placa, para todas as enzimas avaliadas.

Para a realização do método adaptado, os isolados fúngicos foram previamente cultivados em placas de MA2% a 25 °C, durante sete dias. Após o período de incubação, esporos ou micélio fúngico foram inoculados em microtubos (1,5 mL) contendo 1,1 mL de meio líquido com substrato específico para cada enzima (Tabela 1). Os tubos foram incubados durante oito dias, a 25 °C e a 120 rpm de agitação. Linhagens produtoras das enzimas avaliadas foram selecionadas de outros estudos e utilizadas como controle positivo (Tabela 2).

Tabela 1. Formulação dos meios contendo substratos específicos para as enzimas analisadas e o método de análise dos resultados.

Enzima	Composição do meio	Método de análise	Referência
Amilase	amido solúvel 2%, sulfato de amônio 0,5%, fosfato de potássio (KH ₂ PO ₄) 1%, em 100 mL de água destilada	Iodo de Gram na proporção 3:1 com água destilada com revelação instantânea	LOODER (1970)
Celulase	NaNO ₃ 0,2%, K ₂ HPO ₄ 0,1%, MgSO ₄ 0,05% ou 0,1% de MgSO ₄ 7H ₂ O, KCl 0,05%, CMC 0,2%, peptona 0,02%, em 100 ml de água	Solução de vermelho do Congo 0,1% + solução de NaCl 1 M com tempo de revelação de 20 minutos + 20 minutos com solução de NaCl	KASANA et al., (2008)
Polimetilgalacturonase	pectina de maçã 1%, YNB (<i>Yeast nitrogen base</i>) 0,67%, glicose 0,2%, em 100 mL (pH 5,5) de tampão fosfato de potássio 50mM.	Solução de vermelho de rutênio 0,1% por 6 a 10 minutos para revelação	OLIVEIRA et al., (2006)
Poligalacturonase	50,0 mL (pH 5,5) de solução estoque de ácido poligalacturônico 2,5 %. Em seguida, o meio YNB-PG (YNB 0,67%, glicose 0,2%, em de tampão fosfato de potássio 100 mM.	Solução de vermelho de rutênio 0,1% por 60 minutos para revelação	McKAY (1987)
Xilanase	YNB 0,67%, xilana (beechwood) 1%, em 100 mL de água destilada	Iodo de Gram por 5 minutos para revelação	STRAUSS et al., (2001)

Após o período de incubação, os tubos contendo as culturas foram centrifugados a 3.500 rpm durante 10 minutos, o sobrenadante foi recuperado e utilizado para verificar a produção das enzimas. Os meios contendo as fontes de carbono específicas para cada enzima foram vertidos em placas de Petri de 120 mm x 15 mm, nas quais foram inseridos canudos de plástico previamente esterilizados (Figura 2) e, posteriormente, foram inoculados 50 µL dos extratos de enzimáticos obtidos. As placas foram incubadas a 25 °C, no escuro, durante 24 horas.

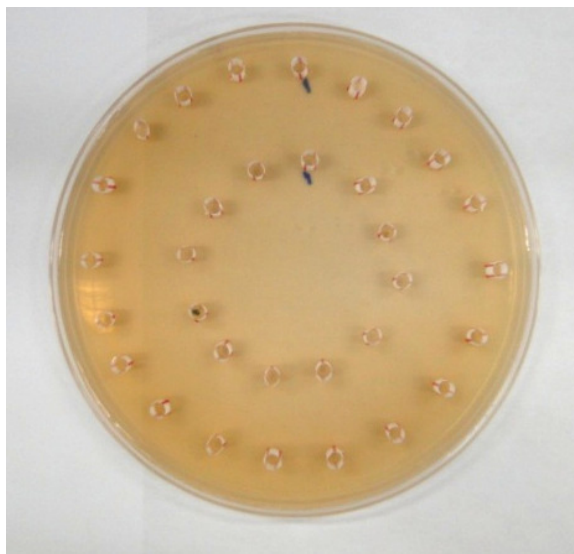
Os resultados de produção enzimática foram avaliados a partir da formação de halos, após coloração do meio com corantes específicos para cada substrato avaliado (Tabela 1).

Tabela 2. Fungos utilizados como controle positivo nas triagens enzimáticas dos fungos isolados de jardins formigas cortadeiras.

Código	Espécie	Produtor	Origem	Depósito
-	<i>Penicillium janczewskii</i>	Xilanase	EEJ- SP ¹	CEA-UNESP ³
TO012	<i>Aureobasidium pullulans</i>	CMCase/polimetilgalacturonase	ACP-TO ²	CRM-UNESP ⁴
TO057	<i>Sporisorium elionuri</i>	Poligalacturonase	ACP-TO	CRM-UNESP
TO034	<i>Cryptococcus mangaliensis</i>	Amilase	ACP-TO	CRM-UNESP

¹ Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, ² Área de Cerrado em Palmas, Tocantins CEA-UNESP: ³ Coleção de Cultura do Centro de Estudos Ambientais da UNESP, ⁴ CRM-UNESP: Central de Recursos Microbianos da UNESP.

Figura 2. Placa de Petri contendo canudos para inoculação do extrato enzimático bruto.



A porcentagem de isolados produtores de cada enzima foi utilizada nas comparações realizadas no presente estudo. Uma análise de correspondência (CA) dos dados foi realizada utilizando o software R v. 3.0.1 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2013), com o objetivo de observar as possíveis diferenças e semelhanças nos perfis enzimáticos dos fungos isolados de cada ninho em relação à produção de enzimas. Para a realização dessa análise, os ninhos pertencentes às duas espécies de formigas foram considerados como as unidades experimentais e o número de fungos produtores das enzimas avaliadas foi considerado como a variável dependente.

4.3 Seleção de fungos para avaliação do efeito no crescimento do fungo mutualista das formigas

Com intuito de selecionar os fungos para utilizar no experimento de crescimento do fungo mutualista, após a triagem enzimática em meio sólido, os fungos produtores de todas as enzimas analisadas (com exceção da amilase) foram pré-selecionados. Através de ensaios de atividade enzimática das CMCase (endoglucanase), Exo-PG (exo-poligalacturonase) e xilanase, os fungos que apresentaram uma maior produção das enzimas analisadas foram selecionados para o experimento com o fungo mutualista.

4.3.1 *Cultivo em substratos puros*

Os fungos reativados em MA2% foram posteriormente inoculados em 50 mL de meio líquido (formulação na Tabela 1, porém, sem adição de ágar) contendo como única fonte de carbono substratos indutores para a produção das enzimas analisadas. As culturas foram incubadas por sete dias em agitador orbital a 25 °C, a 120 rpm. Como nem todas as estirpes fúngicas analisadas apresentaram formação de esporos, o inóculo adotado para esse experimento foram três discos de ágar de 7 mm de diâmetro contendo micélio fúngico.

Após o período de incubação as culturas foram filtradas a vácuo, o extrato de cultivo recuperado, centrifugado a 10.000 rpm durante 10 minutos e armazenados a -20 °C até o momento da determinação da atividade enzimática.

4.3.2 *Determinação das atividades enzimáticas*

4.3.2.1 *Endoglucanase (CMCase)*

A atividade da enzima endoglucanase foi determinada a partir de uma reação contendo 0,025 mL do extrato enzimático e 0,225 mL de solução de substrato carboximetilcelulose (CMC – *Synth*) (40,0 g L⁻¹ em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹, pH 5,0) (MORETTI et al., 2012). A reação foi incubada a 45 °C em banho maria, durante 10 minutos, e interrompida com a adição de 0,250 mL do reagente DNS (ácido 3,5 dinitrisalicílico) para a quantificação dos açúcares redutores, a partir da curva analítica de glicose (MILLER, 1959). O controle da reação continha 0,225 mL de substrato carboximetilcelulose, 0,250 mL de DNS, por fim, adicionando-se 0,025 mL do extrato enzimático. As misturas (reação e controle) foram incubadas a 100 °C, durante cinco minutos e, em seguida, resfriadas em gelo. Posteriormente, foram adicionados 2,5 mL de água destilada nas amostras, as mesmas foram homogeneizadas e então foi realizada a leitura da absorbância a 540 nm. Uma mistura 2,5 mL de água destilada e 2,5 mL de DNS foi utilizada como branco da reação. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 µmol de açúcar redutor por minuto, sob as condições de ensaio citadas.

4.3.2.2 β -glicosidase

Para a determinação da atividade de β -glicosidase, 50 μ L do extrato enzimático foram adicionados à mistura de 250 μ L de solução tampão acetato de sódio (0,1 mol/L, pH 5,0) e 250 μ L de 4-nitrofenol- β -D-glicopiranosídeo (4 mmol/L, PNPG, Sigma). A reação foi mantida a 45 °C, durante 10 minutos e interrompida com a adição de 2,0 mL de solução de Na₂CO₃ (2 mol/L). O nitrofenol liberado foi quantificado em espectrofotômetro (410 nm) a partir da curva analítica de p-nitrofenol (Sigma). O tubo controle da reação correspondeu às mesmas quantidades de reagentes do tubo de reação, porém, a adição da solução de Na₂CO₃ foi realizada antes da adição do extrato enzimático, desta forma, inativando a enzima e impedindo a atividade enzimática em contato com o substrato. O branco utilizado para zerar o espectrofotômetro continha 250 μ L de solução tampão acetato (0,1 mol/L, pH 5,0), 250 μ L de PNPG (4 mmol/L), 50 μ L de água destilada e 2,0 mL de solução de Na₂CO₃ (2 mol/L). As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro (410 nm). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μ mol de nitrofenol por minuto de reação (FERNANDEZ; GOMES; SILVA, 2002).

4.3.2.3 FPase

A atividade de FPase foi determinada segundo método de Ghose (1987), com modificações. Utilizando como substrato uma tira de papel de filtro Whatman nº 1 (1,0 cm x 6,0 cm), a mistura de reação foi composta por 1,0 mL de tampão acetato 0,05 mol L⁻¹, pH 5,0 e 0,5 mL de extrato enzimático. A reação foi mantida a 45 °C, por uma hora e paralisada pela adição de 1,5 mL de DNS para a quantificação dos açúcares redutores liberados, como proposto por Miller (1959), a partir da curva analítica de glicose. O tubo da reação foi submetido a banho de ebulição a 100 °C, durante 5 minutos e, em seguida, resfriado em banho de gelo. Foram adicionados 20 mL de água destilada e a leitura da absorbância foi realizada a 540 nm. O controle da reação era composto por 1,0 mL de tampão acetato 0,05 mol L⁻¹, pH 5,0, 1,5 mL do reagente DNS e 0,5 mL de extrato enzimático, sem a adição da tira de papel, desta forma, não ocorrendo a atividade enzimática. Os tubos foram submetidos a banho de ebulição, com posterior adição de água e leitura da absorbância a 540 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μ mol de açúcar redutor por minuto.

4.3.2.4 Pectinases

A atividade das pectinases foi determinada segundo o procedimento descrito para a atividade da endoglucanase (item 4.3.2.1). Para a dosagem da enzima poligalacturonase (Exo-PG) o substrato utilizado foi: ácido poligalacturônico (Sigma, P-3889) (10,0 g L⁻¹ de substrato em 0,2 mol L⁻¹ de solução tampão acetato, pH 5,5) e para a dosagem de polimetilgalacturonase o substrato utilizado foi: pectina de maçã (Sigma, P-8471). A curva analítica utilizada para ambas enzimas foi a de ácido galacturônico. Uma unidade dessas enzimas foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μmol de ácido D-galacturônico por minuto, sob as condições previamente citadas.

4.3.2.5 Xilanase

A atividade de xilanase foi determinada por procedimento idêntico ao descrito para a atividade de endoglucanase (item 4.3.2.1), porém utilizando xilana *beechwood* (Sigma, X-4252) como substrato (10,0 g L⁻¹, em solução tampão acetato 0,1 mol L⁻¹, pH 5,0). A curva analítica utilizada foi de xilose. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μmol de açúcar xilose por minuto.

Para todas as enzimas os resultados obtidos através dos ensaios enzimáticos foram realizados em cinco réplicas das quais foi obtido uma média e o desvio padrão (DP).

4.4 Experimento de crescimento do fungo mutualista

4.4.1 Preparação do inóculo

O fungo mutualista (linhagem FF2006) mantido em laboratório foi cultivado durante 30 dias em meio A suplementado com aveia. Após o período de incubação, discos de 7 mm de diâmetro contendo micélio fúngico foram transferidos para 50 mL de caldo de cultivo (0,67 % YNB suplementado com 0,5 % de glicose, dissolvidos em tampão citrato-fosfato 75mM, pH 5,0). As culturas foram incubadas durante 30 dias a 25 °C, sob agitação (120 rpm).

Após o período de incubação, as culturas foram transferidas para tubos de 50 mL e foram adicionadas esferas de vidro estéreis. Os tubos foram agitados para que ocorresse a quebra das hifas,

dessa forma, obtendo-se um pré-inóculo homogêneo, o qual foi utilizado para o experimento de crescimento.

4.4.2 Preparo dos meios de cultivo para o crescimento do fungo mutualista

Visando observar se os fungos que apresentaram maior atividade enzimática poderiam estar influenciando o crescimento do fungo mutualista, os fungos previamente selecionados (item 4.3) foram cultivados em diferentes meios contendo como fonte de carbono CMC, ácido poligalacturônico, pectina e xilana. Os fungos selecionados foram previamente cultivados em meio sólido MA 2% durante sete dias a 25 °C. Após o período de incubação, suspensões de esporos (10^7 esporos mL⁻¹) dos fungos selecionados foram preparadas e inoculadas em 50 mL dos meios. As culturas foram incubadas durante sete dias a 25 °C, sob agitação (120 rpm).

Após o período de incubação as culturas foram filtradas a vácuo para remoção do micélio e, posteriormente, centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 minutos. Após a centrifugação os meios de cultivos foram filtrados a vácuo em membrana de 0,22 µm. Uma alíquota de cada meio foi resgatada para a realização da leitura de açúcares redutores presentes no meio, utilizando o método de DNS (MILLER, 1959). Posteriormente, 1 mL de inóculo do fungo mutualista (ver item 4.4.1) foi adicionado aos diferentes meios e as culturas foram incubadas durante 30 dias a 25 °C, sob agitação (120 rpm). O controle positivo para esse experimento foi caldo YNB (0,67%) adicionado de glicose (0,5%). O controle negativo consistiu em caldo YNB (0,67%) sem fonte de carbono. Cinco réplicas de cada meio e dos controles foram realizadas para a realização de análises estatísticas.

4.4.3 Análise dos resultados

Após o período de incubação os meios contendo o fungo mutualista foram filtrados a vácuo e o micélio fúngico foi retido em papel filtro. O micélio foi seco a 100 °C para realizar a medida do peso. O extrato de cultivo foi resgatado e a leitura dos açúcares redutores foi realizada utilizando o método do DNS (MILLER, 1959). Foram realizadas análises não paramétricas (Kruskal-Wallis, $\alpha= 5\%$) no *software* PAST v. 2.17c com os dados obtidos do peso seco e da dosagem de açúcares residuais previamente (inicial) e após (final) o cultivo do fungo mutualista nos produtos de hidrólise de *P. citrinum* e *F. solani*. Uma vez detectada a diferença, comparações múltiplas entre as médias foram realizadas par-a-par utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whitney.

4.5 Avaliação do potencial biotecnológico

4.5.1 Substratos “in natura” coletados pelas formigas

Após a seleção dos melhores produtores, os isolados foram cultivados em sólidos onde as fontes de carbono utilizadas para seu crescimento foram os substratos utilizados preferencialmente pelas formigas cortadeiras para o cultivo do seu fungo mutualista. Dessa forma fragmentos de folhas de eucalipto e capim foram utilizados como fonte de carbono para o crescimento dos fungos. Cinco gramas de cada substrato foram adicionados em sacos de polipropileno (12 x 22 cm) contendo uma espiral de arame. Uma suspensão de esporos (10^7 esporos mL^{-1}) foi inoculada em solução nutriente (em gL^{-1} : $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, 1.0; $(\text{NH})_4\text{SO}_4$, 3,5; KH_2PO_4 , 3.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5; CaCl_2 , 0.5 e 1% de Tween 80 v/v). Um volume de 5 mL da mesma solução nutriente foi adicionada ao sistema de fermentação contendo grama como substrato e 3 mL nos sacos contendo como substrato folhas de eucalipto. Posteriormente os sacos foram incubados a 25 °C, durante sete dias. Após o período de incubação, 10 mL de água para cada grama de substrato foram adicionados no saco de fermentação, o conteúdo foi homogeneizado, filtrado e centrifugado a 10000 rpm a 10 °C, durante 15 minutos. O sobrenadante obtido foi utilizado como extrato enzimático bruto para dosagem das enzimas.

4.5.2 Substratos agroindustriais

Os fungos previamente selecionados foram cultivados também em substratos agroindustriais para observar o potencial enzimático desses isolados em fontes de carbono provenientes de processos industriais. Desta forma, os isolados foram cultivados em um substrato onde a fonte de carbono foi uma mistura (5,0g) de farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar (1:1). Ambos substratos foram previamente lavados, secos em estufa a 60 °C por 24 horas e posteriormente triturados. Os substratos sólidos foram colocados em sacos de polipropileno (12 x 22 cm) contendo uma espiral de arame e esterilizados em autoclave. Como inóculo foi utilizada uma suspensão de esporos (10^7 esporos mL^{-1}) composta dos esporos fúngicos suspensos em solução nutriente (gL^{-1}) $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, 1.0; $(\text{NH})_4\text{SO}_4$, 3,5; KH_2PO_4 , 3.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5; CaCl_2 , 0.5 e Tween 80 (1.0 % v/v)). Um volume 20 mL da mesma solução nutriente foi adicionado ao sistema de fermentação que foi incubado a 25 °C por sete dias. Após o período de incubação, 10 mL de água para cada grama de substrato foi adicionado no saco de fermentação, o

conteúdo foi homogeneizado, filtrado e centrifugado a 10000 rpm por 15 minutos a 10 °C. O sobrenadante obtido foi utilizado como extrato enzimático bruto para dosagem das enzimas a qual foi realizada como citado no item 4.3.2.

5 RESULTADOS

5.1 Reativação e composição de fungos da coleção de trabalho

Todas as 235 estirpes de fungos foram reativadas com sucesso a partir da coleção mantida na CRM-UNESP. A coleção utilizada no presente trabalho compreende 51 gêneros, 91 espécies e quatro isolados não identificados (Tabela 3).

Os gêneros *Penicillium* (12,3%), *Trichoderma* (9,4%), *Cladosporium* (8,5%) e *Trichosporon* (5,5%) foram os mais abundantes. Os demais gêneros da coleção apresentaram uma menor proporção (< 5%). *Penicillium* sp. correspondeu ao gênero mais abundante nos jardins de fungo de *A. capiguara*, totalizando 24,8% (n= 29) dos isolados de fungos dessa formiga. *Penicillium citrinum* foi a espécie mais abundante. O gênero *Cladosporium* também foi um dos mais abundantes (13%) dentre os gêneros de fungos provenientes de *A. capiguara*. Já nos jardins de *A. sexdens rubropilosa* os gêneros *Trichoderma* (15,2%), *Trichosporon* (11%) e *Phomopsis* (8,5%) foram prevalentes (Tabela 3). Nesses jardins, as espécies predominantes foram *Trichoderma spirale* e *Trichosporon chiarellii*.

Tabela 3. Fungos isolados de jardins de duas espécies de formigas cortadeiras (*Atta capiguara* e *Atta sexdens rubropilosa*), mantidos na Central de Recursos Microbianos da UNESP. As identificações dos fungos foram realizadas segundo PEREIRA (2014).

Fungos	Espécie de formiga		Total ¹	% ²
	<i>A. capiguara</i>	<i>A. sexdens rubropilosa</i>		
Zygomycota				
<i>Absidia</i> sp.		1	1	0,42
<i>Cunninghamella</i> sp.		1	1	0,42
<i>Mucor</i> sp.		1	1	0,42
Ascomycota				
<i>Acremonium</i> sp.		1	1	0,42
<i>Alternaria</i> sp.		1	1	0,42
<i>Aspergillus fumigatus</i>	2		2	0,85
<i>Aspergillus</i> sp.	1		1	0,42
<i>Beltrania rhombica</i>	1		1	0,42
<i>Bionectria ochroleuca</i>		2	2	0,85
<i>Cladosporium cladosporioides</i>		3	3	1,3
<i>Cladosporium flabeliforme</i>		1	1	0,42

Tabela 3. Continuação

Fungos	Espécie de formiga		Total ¹	% ²
	<i>A. capiguara</i>	<i>A. sexdens rubropilosa</i>		
<i>Cladosporium perangustum</i>	9	1	10	4,25
<i>Cladosporium</i> sp. 2	4		4	1,7
<i>Cladosporium</i> sp. 3	2		2	0,85
<i>Colletotrichum</i> sp. 1		3	3	1,3
<i>Colletotrichum</i> sp. 2		1	1	0,42
<i>Colletotrichum</i> sp. 3	1		1	0,42
<i>Curvularia</i> sp.1	1		1	0,42
<i>Curvularia</i> sp.2	1	1	2	0,85
<i>Curvularia</i> sp. 3	1		1	0,42
<i>Curvularia</i> sp. 4	1	1	2	0,85
<i>Curvularia trifolii</i>	1	2	3	1,3
<i>Cytospora variostromatica</i>		2	2	0,85
<i>Cytospora eucalypticola</i>	1		1	0,42
<i>Cytospora</i> sp.	1		1	0,42
<i>Discosia</i> sp.		2	2	0,85
<i>Dothideomycetes</i> sp.	11		11	4,7
<i>Drechslera micropus</i>	9		9	3,83
<i>Epicoccum nigrum</i>		2	2	0,85
<i>Epicoccum sorghi</i>	1		1	0,42
<i>Eutypella</i> sp.1		1	1	0,42
<i>Fusarium equiseti</i>	1	2	3	1,3
<i>Fusarium oxysporum</i> species complex ³		1	1	0,42
<i>Fusarium solani</i> species complex	1	2	3	1,3
<i>Geomyces</i> sp.	1	2	3	1,3
<i>Guignardia</i> sp.		2	2	0,85
<i>Mycosphaerella</i> sp. 1		2	2	0,85
<i>Mycosphaerella</i> sp. 2		1	1	0,42
<i>Mycosphaerella</i> sp. 3	4	2	6	2,55
<i>Neofusicoccum eucalyptorum</i>		1	1	0,42
<i>Neofusicoccum parvum</i>		3	3	1,3
<i>Nigrospora oryzae</i>		2	2	0,85
<i>Nigrospora</i> sp.	2		2	0,85
<i>Oidiodendron</i> sp.		1	1	0,42
<i>Paecilomyces</i> sp.		3	3	1,3
<i>Paraphaeosphaeria michotii</i>	1		1	0,42
<i>Penicillium citrinum</i>	20		20	8,52
<i>Penicillium</i> sp. 1	2		2	0,85
<i>Penicillium</i> sp. 2	3		3	1,3
<i>Penicillium</i> sp. 3	2		2	0,85

Tabela 3. Continuação

Fungos	Espécie de formiga		Total ¹	% ²
	<i>A. capiguara</i>	<i>A. sexdens rubropilosa</i>		
<i>Penicillium</i> sp. 4	1		1	0,42
<i>Penicillium</i> sp. 5	1		1	0,42
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	1	1	2	0,85
<i>Phaeomoniella</i> sp.		1	1	0,42
<i>Phaeosphaeria herpotrichoides</i>	2		2	0,85
<i>Phaeosphaeria</i> sp. 1		1	1	0,42
<i>Phaeosphaeria</i> sp. 2	1		1	0,42
<i>Phaeosphaeriopsis</i> sp.	1		1	0,42
<i>Phanerochaete</i> sp.	1	3	4	1,7
<i>Phoma</i> sp.		2	2	0,85
<i>Phomopsis</i> sp. 1		3	3	1,3
<i>Phomopsis</i> sp. 2		2	2	0,85
<i>Phomopsis</i> sp. 3		1	1	0,42
<i>Phomopsis</i> sp. 4	1	2	3	1,3
<i>Phomopsis</i> sp. 5		1	1	0,42
<i>Phomopsis</i> sp. 6		1	1	0,42
<i>Preussia</i> sp. 1		6	6	2,55
<i>Preussia</i> sp. 2		1	1	0,42
<i>Preussia</i> sp. 3		1	1	0,42
<i>Pseudoplagiostoma</i> sp.		1	1	0,42
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	3	1	4	1,7
<i>Robillarda</i> sp.		2	2	0,85
<i>Setophoma chromolaena</i>		2	2	0,85
<i>Sordariomycetes</i> sp. 1	1		1	0,42
<i>Spiegazzinia</i> sp.	1		1	0,42
<i>Tetraplophaeria</i> sp.		1	1	0,42
<i>Trichoderma deliquescens</i>		2	2	0,85
<i>Trichoderma hamatum</i>		2	2	0,85
<i>Trichoderma spirale</i>	5	12	17	7,24
<i>Trichoderma</i> sp. 1		1	1	0,42
<i>Xylaria</i> sp. 1	1		1	0,42
<i>Xylaria</i> sp. 2		1	1	0,42
Basidiomycota				
<i>Agaricus fiardii</i>	1		1	0,42
<i>Ceriporiopsis</i> sp.	1		1	0,42
<i>Grammothele</i> sp.	1		1	0,42
<i>Oudemansiella canarii</i>	1		1	0,42
<i>Peniophora crassitunicata</i>	1		1	0,42
<i>Phlebia</i> sp.	3		3	1,3

Tabela 3. Continuação

Fungos	Espécie de formiga		Total ¹	% ²
	<i>A. capiguara</i>	<i>A. sexdens rubropilosa</i>		
<i>Phlebia subserialis</i>	1		1	0,42
<i>Trametes hirsuta</i>	2		2	0,85
<i>Trichosporon chiarellii</i>		13	13	5,53
Fungos não identificados				
<i>Ascomycota</i> não identificado 1		1	1	0,42
<i>Ascomycota</i> não identificado 2		1	1	0,42
<i>Ascomycota</i> não identificado 3		1	1	0,42
<i>Basidiomycota</i> não identificado 1	1		1	0,42
Total	117	118	235	100

¹ Número total de fungos provenientes de jardim de fungo das duas espécies de formigas cortadeiras.

² Frequência (em %) de cada isolado de fungos relativo ao total de isolados do estudo (n= 235).

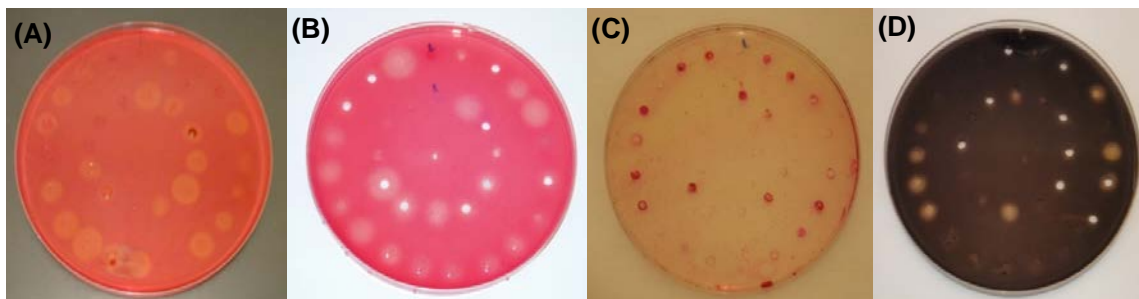
³ *Species complex*: fungos para os quais a taxonomia demonstrou existirem espécies muito relacionadas geneticamente (espécies crípticas), as quais foram classificadas no passado como sendo da mesma espécie.

5.2 Avaliação do método de determinação da produção enzimática

Devido ao elevado número de isolados de fungos e por apresentarem diferentes taxas de crescimento e esporulação, o emprego de métodos convencionais para a triagem de produção de enzimas hidrolíticas seria inviável. Nesse sentido, a adaptação de um método HTS permitiu a triagem enzimática de 32 isolados simultaneamente.

O protocolo adotado permitiu visualizar a formação de halos de hidrólise nítidos para as enzimas celulase, polimetilgalacturonase e xilanase produzidas tanto pelos isolados testes, quanto pelos isolados controles (Figura 3). Entretanto, os halos de hidrólise para a enzima poligalacturonase não foram nítidos, quando comparados com os halos formados pela ação das outras enzimas. Por esse motivo, uma triagem convencional foi realizada para validar os resultados obtidos com essa enzima. Do total de fungos positivos no método em HTS, 93% deles foram, de fato, produtores na triagem convencional, o que demonstra a reprodutibilidade do método HTS para essa enzima.

Figura 3. Halos de hidrólise (área claras ao redor dos canudos) demonstrando a presença de enzimas extracelulares. (A) celulase, (B) polimetilgalacturonase, (C) poligalacturonase, (D) xilanase. No caso da poligalacturonase, o resultado positivo é indicado por pontos rosas, que indica a presença do produto da hidrólise gerado por esta enzima.



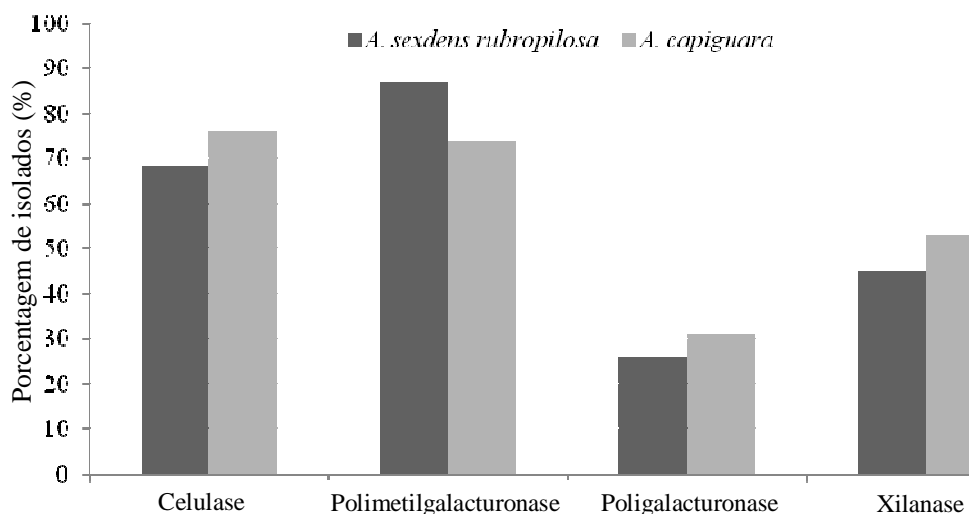
5.3 Perfil enzimático dos fungos dos jardins de formigas cortadeiras

Do total de 235 isolados de fungos, 221 (94%) produziu, pelo menos, uma das enzimas avaliadas (Apêndice 2). Para a enzima celulase, 72% dos isolados foram positivos; para polimetilgalacturonase, 71%; para xilanase 53% e para poligalacturonase 37%. Não foi detectada a produção de amilase para nenhum isolado.

Foram observadas pequenas diferenças na frequência dos fungos produtores de enzimas para cada espécie de formiga, sendo a porcentagem de isolados produtores de enzimas obtidos de *A. capiguara* maior, quando comparada com os isolados obtidos de *A. sexdens rubropilosa*, com exceção da enzima polimetilgalacturonase (Figura 4).

Das estirpes provenientes de jardins de fungo de *A. capiguara*, apenas dois isolados não foram produtores de nenhuma enzima avaliada, sendo esses *Agaricus fiardii* e um isolado não identificado (Apêndice 2). Apenas 6% dos isolados de *A. capiguara* foram positivos somente para uma das enzimas analisadas, dentre eles: *Dothideomyces* sp, *Fusarium esquiseti*, *Mycosphaerella* sp. 3, *Nigrospora* sp., *Penicillium citrinum*, *Phaeosphaeria herpotrichoides* e *Phlebia subserialis*. Foi possível observar que os táxons *Beltrania rhombica*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium solani*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium* sp. e *Pestalotiopsis* sp., obtidos de jardins de *A. capiguara* foram positivos para todas as enzimas.

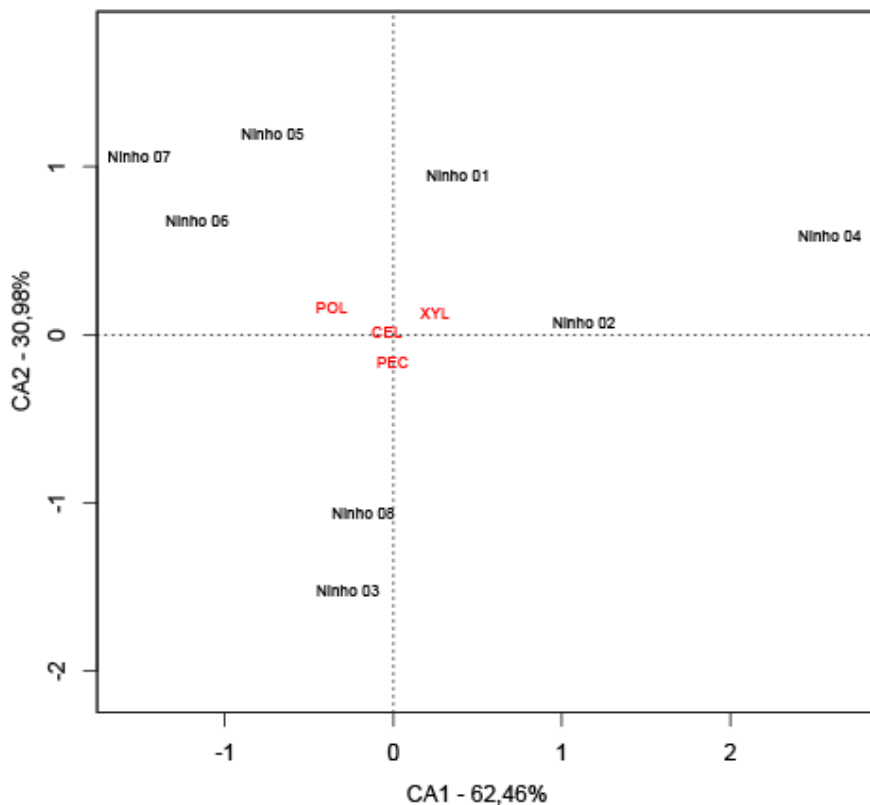
Figura 4. Porcentagem de isolados de fungos obtidos de jardins das formigas cortadeiras *Atta capiguara* (n= 117 isolados) e *Atta sexdens rubropilosa* (n= 118 isolados) produtores de enzimas extracelulares.



Considerando as estirpes de fungos obtidas de jardins de *A. sexdens rubropilosa*, 14 não produziram nenhuma das enzimas avaliadas. Dentre os 14 isolados, 11 pertencem à levedura *T. chiarellii* e os demais isolados compreendem aos táxons *Phoma* sp., *Preussia* sp. 1, *Paecilomyces* sp. Foi observado que 17% dos isolados obtidos de *A. sexdens rubropilosa* foram positivos apenas para uma das enzimas avaliadas. Foi observado que 14,4% dos isolados foram positivos para todas as enzimas, a saber: *Aspergillus* sp., *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp. 1, *Eutypella* sp. 1, *F. solani*, *Nigrospora oryzae*, *Oidiodendron* sp., *Phomopsis* sp.3, *Pseudoplagiostoma* sp., *Robillarda* sp., *Trichoderma hamatum* e *Trichoderma spirale*.

Para avaliar se existem relações entre a origem dos fungos (i.e. ninho de cortadeira de dico ou monocotiledôneas) e o perfil de produção enzimática, foi realizada uma análise de correspondência (CA) para discriminar possíveis padrões na variação dos dados, os quais não são evidentes somente analisando as porcentagens de isolados produtores. A CA indicou que dois componentes explicam 93,44% da variação observada dos dados (Figura 5). Basicamente, as comunidades de fungos (representadas pelos ninhos de origem na Figura 6) apresentaram diferenças marcantes e se agruparam em dois *clusters* correspondendo às duas espécies de formigas cortadeiras, com exceção dos ninhos 3 (*A. capiguara*) e 8 (*A. sexdens rubropilosa*), que apresentaram um padrão diferenciado (Figura 6).

Figura 5. Distribuição das comunidades de fungos em relação às enzimas polissacaridasas avaliadas. As comunidades de fungos estão representadas pelos ninhos das quais foram obtidas (ninhos 1 a 4, *Atta capiguara*; ninhos 5 a 8, *Atta sexdens ruproilosa*). Porcentagens nos eixos correspondem ao total da variação explicada por componente.



CEL: celulase; PEC: polimetilgalacturonase; POL: poligalacturonase; XYL: xilânase

Segundo a análise de discriminância, pode-se observar que as enzimas celulasas e polimetilgalacturonase foram amplamente distribuídas entre os fungos de todos os ninhos (posição na centróide da CA, Figura 5). Por outro lado, as enzimas xilânase e poligalacturonase estão mais relacionadas às comunidades de fungos do jardim de *A. capiguara* (ninhos 1, 2 e 4) e *A. sexdens rubropilosa* (ninhos 5 a 7), respectivamente. Aparentemente, os ninhos 3 e 8 apresentaram comunidades de fungos mais relacionadas à produção da enzima polimetilgalacturonase (Figura 5).

5.4 Seleção de estirpes para avaliação do efeito no crescimento do fungo cultivado pelas formigas

Após a realização da triagem em meio sólido foi observado que 24 isolados foram produtores de todas as enzimas analisadas. Desse total, 19 foram selecionados para a realização de ensaios de atividades enzimáticas (Tabela 4). Os isolados excluídos desta etapa foram os pertencentes ao gênero *Trichoderma*, visto que tal gênero foi relatado em estudos prévios como antagonista do fungo mutualista das formigas cortadeiras (ORTIZ; ORDUZ, 2001).

Para a seleção dos isolados foram analisadas as atividades de três enzimas, a saber: CMCase, poligalacturonase (Exo-PG) e xilanase. Os fungos foram cultivados em caldos contendo substratos puros como fonte de carbono, conforme descrito na Tabela 1, entretanto, sem adição de ágar. No caso da EXO-PG foram utilizados dois substratos (pectina de maçã e ácido poligalacturônico). Vale ressaltar que a temperatura de incubação das reações nos ensaios de atividade enzimática para a seleção dos isolados foi a 25 °C. Tal temperatura foi adotada, pois é próxima aquela geralmente encontrada no ambiente de origem desses fungos (i.e. jardim de fungo).

Os 19 isolados foram submetidos a dosagens enzimáticas e apresentaram atividades que variaram de 0,04 a 58,38 U mL⁻¹ para a enzima CMCase, 0,25 a 3,75 U mL⁻¹ para polimetilgalacturonase, 0,50 a 3,71 U mL⁻¹ Exo-PG e 2,50 a 129,04 U mL⁻¹ para xilanase (Tabela 4). Os isolados que apresentaram as maiores atividades foram selecionados para a realização do experimento de crescimento com o fungo mutualista. Nesse sentido, o isolado *Penicillium citrinum* JSP01.A.1.1 foi selecionado para representar fungos obtidos de *A. capiguara*, visto que o mesmo apresentou maior atividade para algumas das enzimas analisadas. O isolado *Fusarium solani* JSP05.C.5.5, apesar de não ter apresentado maior atividade para todas as enzimas, este foi selecionado para realização do experimento com o fungo mutualista (Tabela 4).

Tabela 4. Média das atividades enzimáticas ($U\ mL^{-1} \pm$ desvio padrão) de fungos provenientes de jardins de formigas cortadeiras, cultivados em meios contendo diferentes polissacarídeos como fonte de carbono.

Código do isolado ¹	Identificação		Enzima			
	Origem	Espécie ²	CMCase ³	PLMG	Exo-PG ⁵	Xil ⁶
JSP01A1.1	<i>A. capiguara</i>	<i>Penicillium citrinum</i>	58,38 ± 7,41	3,34 ± 0,43	2,76 ± 0,13	129,04 ± 12,45
JSP01A1.2	<i>A. capiguara</i>	<i>Beltrania rhombica</i>	0,52 ± 0,05	0,62 ± 0,46	0,78 ± 0,18	2,63 ± 0,09
JSP01B2.2	<i>A. capiguara</i>	<i>Penicillium</i> sp. 2	6,27 ± 0,67	0,70 ± 0,08	0,58 ± 0,21	39,72 ± 6,68
JSP02C5.3	<i>A. capiguara</i>	<i>Cladosporium</i> sp.2	6,09 ± 0,08	3,47 ± 0,16	3,71 ± 0,18	32,30 ± 2,19
JSP03A4.4	<i>A. capiguara</i>	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	10,57 ± 0,67	1,48 ± 0,31	1,53 ± 0,20	5,06 ± 0,11
JSP03A5.4	<i>A. capiguara</i>	<i>Fusarium solani</i>	7,88 ± 1,26	3,11 ± 0,13	3,21 ± 0,42	24,72 ± 0,92
JSP05A2.5'	<i>A. sexdens rubropilosa</i>	<i>Aspergillus</i> sp.	9,55 ± 0,59	0,43 ± 0,06	0,50 ± 0,13	28,88 ± 5,07
JSP05B1.2	<i>A. sexdens rubropilosa</i>	<i>Trichoderma spirale</i>	1,05 ± 0,09	0,25 ± 0,09	0,57 ± 0,03	2,61 ± 0,28
JSP05C5.5	<i>A. sexdens rubropilosa</i>	<i>Fusarium solani</i>	41,51 ± 2,27	1,78 ± 0,06	1,48 ± 0,04	54,33 ± 3,22
JSP06A2.2	<i>A. sexdens rubropilosa</i>	<i>Eutypella</i> sp.1	0,24 ± 0,008	0,73 ± 0,06	0,57 ± 0,15	5,57 ± 0,20
JSP06A4.4	<i>A. sexdens rubropilosa</i>	<i>Colletotrichum</i> sp. 1	0,22 ± 0,008	1,28 ± 0,24	1,46 ± 0,11	5,55 ± 0,96
JSP06B3.2	<i>A. sexdens rubropilosa</i>	<i>Pseudoplagiostoma</i> sp.	0,52 ± 0,12	1,40 ± 0,17	1,44 ± 0,08	5,25 ± 0,51
JSP06B4.5	<i>A. sexdens rubropilosa</i>	<i>Robillarda</i> sp.	1,76 ± 0,36	1,13 ± 0,15	1,05 ± 0,09	3,36 ± 0,57
JSP06C1.3	<i>A. sexdens rubropilosa</i>	<i>Curvularia</i> sp. 4	0,32 ± 0,10	1,10 ± 0,20	1,42 ± 0,01	40,86 ± 0,69
JSP06C2.1	<i>A. sexdens rubropilosa</i>	<i>Colletotrichum</i> sp. 1	0,41 ± 0,02	0,96 ± 0,03	0,89 ± 0,02	5,41 ± 0,33
JSP07A2.1	<i>A. sexdens rubropilosa</i>	<i>Trichoderma spirale</i>	0,81 ± 0,20	1,51 ± 0,34	1,75 ± 0,17	2,50 ± 0,04
JSP07C4.1	<i>A. sexdens rubropilosa</i>	<i>Trichoderma hamatum</i>	1,71 ± 0,03	3,75 ± 0,09	3,23 ± 0,29	2,79 ± 1,01
JSP01-11A2.1	<i>A. sexdens rubropilosa</i>	<i>Nigrospora oryzae</i>	0,04 ± 0,008	2,41 ± 0,04	2,62 ± 0,69	20,31 ± 1,61
JSP01-11B5.1	<i>A. sexdens rubropilosa</i>	<i>Phomopsis</i> sp.3	3,08 ± 0,35	0,30 ± 0,08	0,64 ± 0,31	5,60 ± 0,18

¹ Código do isolado mantido na Central de Recursos Microbianos da UNESP, ² Identificação dos isolados obtidos através de taxonomia polifásica, ³ CMCase: endoglucanase, ⁴ PLMG: atividade de polimetilgalacturonase, ⁵ Exo-PG2: atividade de exopoligalacturonase, ⁶ Xil: Xilanase,

5.5 Experimento de crescimento do fungo mutualista

O fungo mutualista foi cultivado nos produtos de hidrólise gerados pelos fungos selecionados na etapa anterior (item 5.4). Após o cultivo nesses produtos, o peso seco do fungo mutualista foi mensurado (Tabela 5). Foram observadas diferenças significativas entre as médias do peso seco do micélio de *L. gongylophorus* quando cultivado nos diferentes produtos de hidrólise gerados por *P. citrinum* (Kruskal-Wallis, $H= 26,36$, $P < 0,05$) e *F. solani* (Kruskal-Wallis, $H= 19,68$, $P < 0,05$). O controle positivo (YNB suplementado com glicose) foi o meio de cultivo que proporcionou o maior crescimento do fungo mutualista ($P < 0,05$). Os produtos de hidrólise de CMC e xilana resultantes do cultivo de *P. citrinum* e *F. solani* na presença desses polissacarídeos

proporcionaram um crescimento significativo de *L. gongylophorus*, em relação aos produtos de hidrólise da pectina e ácido poligalacturônico ($P < 0,05$); entretanto, a biomassa foi significativamente menor quando comparado à do controle positivo ($P > 0,05$). Além disso, a biomassa do fungo na presença dos produtos de hidrólise da pectina e ácido poligalacturônico gerados por *F. solani* não foi significativamente diferente da biomassa do controle negativo.

Foram observadas diferenças significativas entre a concentração de açúcares redutores antes (inicial) e após (final) o crescimento do fungo mutualista para todos os produtos de hidrólise gerados por *P. citrinum* e *F. solani* (Kruskal-Wallis, $P < 0,05$), com exceção do produto de hidrólise do ácido poligalacturônico gerado por *F. solani* (Tabela 5). Considerando os produtos de hidrólise de *P. citrinum*, foi observado um consumo estatisticamente significativo de todos os açúcares após o cultivo do fungo mutualista, com exceção dos produtos de hidrólise de ácido poligalacturônico (Tabela 5). O oposto ocorreu para os produtos de hidrólise gerados pelo fungo *F. solani*, nos quais foram observados um aumento significativo de açúcares após o cultivo do fungo das formigas, com exceção do ácido poligalacturônico.

Tabela 5. Crescimento micelial (peso seco em mg) do fungo mutualista de *Atta sexdens rubropilosa* em diferentes meios de cultivo contendo produtos de hidrólise (açúcares redutíveis em mg L^{-1}) de polissacarídeos por *Penicillium citrinum* (*P.c.*) e *Fusarium solani* (*F.s.*). Médias \pm desvio padrão.

Fungos	Fatores ¹	Meios de cultivo ²					
		Gli	YNB	CMC	Pec	Ac Pol	Xil
<i>P.c.</i>	ARi	-	-	185,89 \pm 14,51A	160,71 \pm 7,17A	178,43 \pm 10,25A	171,28 \pm 12,32A
	ARf	-	-	100,38 \pm 16,06B	96,03 \pm 4,91B	283,54 \pm 238,22B	81,52 \pm 7,97B
	PS	10,138 \pm 0,57a ³	0,24 \pm 0,05b	0,48 \pm 0,15c	0,21 \pm 0,06b	0,23 \pm 0,08b	0,88 \pm 0,15c
<i>F.s.</i>	ARi	-	-	25,25 \pm 3,43A	57,68 \pm 3,66A	70,63 \pm 2,37A	63,93 \pm 5,01A
	ARf	-	-	251,51 \pm 10,60B	82,08 \pm 2,03B	83,72 \pm 1,52A	183,76 \pm 10,24B
	PS	10,27 \pm 0,60a	0,25 \pm 0,05b	0,63 \pm 0,14c	0,41 \pm 0,05d	0,46 \pm 0,05d	0,67 \pm 0,09c

¹ ARi: açúcar redutor inicial em mg L^{-1} (antes do cultivo do fungo mutualista); ARf: açúcar redutor final em mg L^{-1} (após o cultivo do fungo mutualista), PS: peso seco em mg.

² Gli: glicose (controle positivo), YNB: yeast nitrogen base (controle negativo), CMC: carboximetilcelulose, Pec: pectina de maçã, Ac Pol: ácido poligalacturônico, Xil: xilana *beechwood*.

³ Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas nas linhas (minúsculas para peso seco) e nas colunas (maiúsculas para açúcares redutores).

5.6 Potencial biotecnológico dos fungos isolados de formigas cortadeiras

Foram realizados ensaios de fermentação em estado sólido para verificar a influência de diferentes substratos na produção enzimática de *P. citrinum* e *F. solani*. Três substratos foram utilizados para avaliar o potencial enzimático desses fungos (folhas de eucalipto, grama e farelo de

trigo/bagaço de cana-de-açúcar). Dentre as enzimas avaliadas, a maior atividade enzimática detectada por *P. citrinum*, foi para a enzima xilanase, quando cultivado em grama (Tabela 6). A maior atividade de *F. solani* foi para a enzima β -glicosidase, quando cultivado em eucalipto (Tabela 6).

Em relação às atividades enzimáticas para cada substrato, tanto grama, quanto o bagaço suplementado com farelo de trigo proporcionaram maiores atividades de xilanase e β -glicosidase para *P. citrinum* e *F. solani*, respectivamente (Tabela 6). Já eucalipto, proporcionou maior produção de β -glicosidase para ambos os fungos (Tabela 6).

Tabela 6. Média das atividades enzimáticas dos fungos *Penicillium citrinum* e *Fusarium solani* selecionados cultivados em diferentes substratos sólidos

	Enzima	Substrato ¹					
		GRAMA		EUCALIPTO		BAGAÇO/FARELO	
		<i>P. citrinum</i>	<i>F. solani</i>	<i>P. citrinum</i>	<i>F. solani</i>	<i>P. citrinum</i>	<i>F. solani</i>
U mL ⁻¹ (\pm DP) ²	CMCase ⁴	0,16 \pm 0,04	0,04 \pm 0,02	0,08 \pm 0,06	0,14 \pm 0,09	0,14 \pm 0,04	0,07 \pm 0,04
	β -glic	2,97 \pm 0,63	3,89 \pm 0,10	4,32 \pm 0,87	4,85 \pm 0,10	4,02 \pm 0,24	3,42 \pm 0,16
	Fpase	0,08 \pm 0,02	0,04 \pm 0,025	0,06 \pm 0,01	0,12 \pm 0,03	0,07 \pm 0,03	0,06 \pm 0,01
	Exo PG	1,47 \pm 0,23	1,04 \pm 0,04	0,54 \pm 0,18	1,02 \pm 0,57	1,04 \pm 0,04	1,34 \pm 0,12
	Xil	75,22 \pm 11,52	2,77 \pm 0,04	0,43 \pm 0,07	1,10 \pm 0,66	43,17 \pm 3,69	2,81 \pm 0,10
U g ⁻¹ (\pm DP) ³	CMCase	1,60 \pm 0,48	0,43 \pm 0,24	0,80 \pm 0,64	0,71 \pm 0,46	1,47 \pm 0,46	0,36 \pm 0,22
	β -glic	29,73 \pm 6,30	38,97 \pm 0,99	43,21 \pm 8,78	48,50 \pm 4,82	40,27 \pm 2,41	34,25 \pm 1,61
	Fpase	0,87 \pm 0,21	0,44 \pm 0,25	0,63 \pm 0,10	1,25 \pm 0,34	0,72 \pm 0,33	0,61 \pm 0,12
	Exo PG	14,67 \pm 2,39	10,45 \pm 0,46	5,47 \pm 1,81	10,25 \pm 5,74	10,45 \pm 0,46	13,45 \pm 1,21
	Xil	752,24 \pm 115,28	27,79 \pm 0,42	4,34 \pm 0,75	11,00 \pm 6,67	431,73 \pm 36,97	28,09 \pm 1,03

¹ Substratos utilizados no cultivo dos fungos; ² U mL⁻¹ (\pm DP): Média das atividades enzimáticas (unidade de enzima por mL \pm desvio padrão); ³ U g⁻¹ (\pm DP): Média das atividades enzimáticas (unidade de enzima por grama de substrato \pm desvio padrão); ⁴ CMCase: endoglucanase, β -glic: β -glicosidase, FPase: celulases totais, Exo-PG: exo-poligalacturonase, Xil: xilanase.

6 DISCUSSÃO

6.1 Método de triagem de isolados produtores de enzimas

O método de triagem enzimática adaptado no presente estudo possibilitou uma clara visualização dos halos de hidrólise (Figura 3). Adicionalmente, o método permitiu avaliar 32 isolados de fungos simultaneamente. Cabe ressaltar que estudos nos quais os isolamentos de microorganismos são realizados a partir de amostras ambientais, geralmente tem como consequência a obtenção de um grande número de isolados; o que leva a um trabalho laborioso e demorado, quando seja utilizado o método convencional de triagem. Portanto, a adaptação da técnica é um aspecto de extrema importância.

Atualmente, um grande número de isolados fúngicos obtidos nos mais diferenciados estudos é armazenado em coleções de culturas ou centrais de recursos genéticos. Nesse sentido, o uso do referido método facilitará a avaliação do potencial biotecnológico e bioprospecção de microorganismos em ambientes pouco explorados, como é o caso do jardim de fungo das formigas cortadeiras.

Outro aspecto interessante do método é o fato de que fungos com diferentes taxas de crescimento podem ser utilizados no teste. Geralmente, triagens convencionais em meio sólido utilizam apenas um isolado de fungo, cultivado diretamente no meio no qual a enzima é detectada. Esse procedimento muitas vezes não pode ser aplicado para fungos de crescimento rápido, que recobrem a superfície do meio, não permitindo a ação dos corantes e a visualização dos halos (BILLS et al., 2008). Tal problemática foi contornada no método adaptado no presente estudo, pois este somente utiliza os extratos enzimáticos.

Apesar do método não garantir reprodutibilidade para uma das enzimas avaliadas (i.e. poligalacturonase), este constitui em uma alternativa rápida para acessar o potencial biotecnológico de fungos filamentosos de origem ambiental. Nesse sentido, o método proposto pode ser útil em estudos de bioprospecção.

6.2 Considerações sobre a composição e ecologia dos fungos da coleção de trabalho

O gênero *Penicillium* foi o mais abundante dentre os isolados pertencentes aos jardins de fungo de *A. capiguara*. A espécie *P. citrinum* foi a mais abundante nos jardins de *A. capiguara*. Esta espécie pode ser encontrada em diversos substratos, como os solos da região tropical, porém, apresenta uma maior ocorrência em cereais e outras gramíneas (PITT, 2000; SAMSON et al., 2004; HOUBRAKEN et al., 2010), sendo também considerada fitopatogênica (NORBERG; SERRA-FREIRE, 1993). Essa espécie também foi isolada de jardins de fungo de várias formigas cortadeiras (RODRIGUES et al., 2005; 2008). Considerando a abundância de isolados de *P. citrinum* nos jardins de *A. capiguara*, esta pode estar relacionada às gramíneas forrageadas por essa formiga no cultivo de seu fungo mutualista (ROCES; HÖLLDOBLER, 1994).

O fungo não identificado pertencente à classe *Dothideomycetes* foi o segundo fungo mais frequente nos jardins de *A. capiguara*. Segundo Kirk e colaboradores (2008) essa classe de fungos é considerada a maior e mais ecologicamente diversa, com representantes cosmopolitas e capazes de infectar a maioria das espécies vegetais utilizadas na agricultura. É sabido que fungos pertencentes a essa classe apresentam um aparato metabólico muito diverso e os mesmos tem grande importância em diversos ecossistemas, atuando como saprófitos e decompositores de substratos vegetais. Talvez o elevado número de isolados pertencentes ao citado táxon tenha se dado pelo metabolismo apresentado por esses fungos, o qual é voltado para a degradação de substratos de origem vegetal. Ohn e colaboradores (2012) através de análises no genoma de fungos pertencentes a esse gênero observaram que os mesmos apresentavam estratégias e características genômicas de fungos fitopatogênicos, sendo este outro fator que explicaria a prevalência desse fungo na coleção.

Cladosporium perangustum foi a terceira espécie mais abundante dentre os fungos dos jardins de *A. capiguara*. Tal fungo foi encontrado em ambas as espécies de formigas, porém, em diferentes proporções (Tabela 3). Espécies pertencentes ao gênero *Cladosporium* foram reportadas em diversos tipos de solos, no ar e em várias espécies de plantas, inclusive como endófito (EL-MORSY, 2000; KUMARESAN; SURYANARAYANAN, 2002; BENSCH et al., 2010).

Recentemente, Oliveira e colaboradores (2014) registraram a presença do fungo *C. perangustum* na palmeira *Syagrus oleracea*. No presente estudo uma doença atacou plantações dessa palmeira, ocasionando necrose foliar. Após isolamento, o agente etiológico foi identificado como *C. perangustum*. Pode-se sugerir que a prevalência desse fungo nos jardins das formigas esteja relacionada à sua característica fitopatogênica, pois tal fungo encontra no jardim substrato ideal para que as enzimas polissacaridásicas atuem.

Com relação aos fungos encontrados nos jardins de *A. sexdens rubropilosa*, *Trichoderma* e *Trichosporon* foram os gêneros mais abundantes. *Trichoderma spirale* foi a espécie encontrada em maior proporção nos jardins de *A. sexdens rubropilosa*, sendo também comumente encontrada no solo próximo aos ninhos de formigas (RODRIGUES et al., 2013). É sabido que fungos do gênero *Trichoderma* são antagonistas de diversas espécies de fungos que ocasionam doenças em plantas (SAVOIE; MATA, 1999; CASTILLO et al., 2011). Igualmente, *Trichoderma* é considerado um antagonista do fungo cultivado pelas formigas (SILVA et al., 2006c); fato que levou alguns pesquisadores a vislumbrarem seu uso no controle biológico das formigas cortadeiras (ORTIZ; ORDUZ, 2001). Contudo, maiores estudos sobre a ocorrência e o real papel desse fungo nos jardins das formigas são necessários.

Trichosporon chiarellii foi a segunda espécie mais abundante dentre os isolados de jardins de *A. sexdens rubropilosa*. Tal fungo é uma levedura basidiomicética encontrada em estudos prévios no jardim de fungo da formiga *Myrmicocrypta camargoi* (PAGNOCCA et al., 2010). Recentemente, avaliando a presença de leveduras no corpo de machos alados (bitus) de *A. sexdens rubropilosa*, Arcuri (2013) encontrou *T. chiarellii* na cutícula desses insetos e também no solo próximo ao ninho dessa formiga. É possível que tal levedura desempenhe um papel nos jardins de fungo, porém, os dados até o momento não permitem afirmações concretas. As triagens enzimáticas realizadas no presente estudo revelaram que, apenas um isolado dessa levedura, foi capaz de produzir enzimas, desse modo, não corroborando com os resultados observados em estudos prévios (MENDES et al., 2012; ARCURI, 2013). Estudos futuros visando avaliar a incidência de *T. chiarellii* em ninhos de formigas Attini, poderá sinalizar seu papel como simbiote.

A composição de fungos isolados das duas espécies de formigas cortadeiras foi diferente, entretanto, alguns táxons foram compartilhados, tais como: *Cladosporium perangustum*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium solani* species complex, *Geomyces* sp., *Mycosphaerella* sp. 3, *Pestalotiopsis* sp., *Phanerochaete* sp., *Phomopsis* sp. 4, *Purpureocillium lilacinum*, *Trichoderma spirale*. A maioria dos táxons de fungos presentes no jardim das formigas cortadeiras apresenta como origem o solo e plantas (DOMSCH et al., 1980; BARRON, 1968; WATANABE, 2002). Além disso, muitos dos fungos reativados da coleção são de ocorrência comum nesse substrato (MÖLLER, 1893; FISHER et al., 1996; PAGNOCCA et al., 2010; RODRIGUES et al. 2005, 2008, 2011).

Devido ao caráter cosmopolita, alguns autores consideram que a presença desses fungos nos jardins das formigas cortadeiras é efêmera e transitória (POULSEN; CURRIE, 2006). Contudo, o jardim de fungo é um ambiente rico em nutrientes (SILVA et al., 2003), o qual é apropriado para

uma diversa gama de fungos indesejáveis à cultura do fungo mutualista. Em determinadas situações, por exemplo, quando o ninho da formiga entra em algum estado de desequilíbrio, muitos dos fungos encontrados nesse ambiente podem se tornar oportunistas e explorar os nutrientes dos jardins, conforme proposto por Pagnocca; Masiulionis; Rodrigues (2012).

6.3 Perfil enzimático dos fungos e o provável papel nos jardins de formigas cortadeiras

Através das triagens enzimáticas foi possível obter o perfil enzimático dos fungos associados ao jardim de duas espécies de formigas cortadeiras em relação à produção de polissacaridases. Foi observada uma elevada proporção de fungos produtores das enzimas celulases, pectinases e xilanases. No entanto, nenhum fungo produziu a enzima amilase nas condições avaliadas; tais resultados corroboram parcialmente com Mendes et al. (2012) e Arcuri (2013), os quais observaram uma baixa proporção de leveduras amilolíticas em seus isolados avaliados.

Arcuri (2013) realizou triagens enzimáticas de leveduras isoladas de bitus e do solo adjacente aos ninhos de *A. sexdens rubropilosa*. No estudo, os autores observaram que apenas 3,7% dos isolados foram positivos para a enzima amilase. Mendes e colaboradores (2012) também observaram uma pequena proporção de leveduras amilolíticas isoladas de jardins de várias espécies de *Acromyrmex* (8%) e *A. texana* (21%). A ausência de fungos produtores de amilase no presente estudo e a baixa proporção de leveduras amilolíticas observadas nos estudos de Mendes et al. (2012) e Arcuri (2013) sugerem que o papel dos fungos provenientes do jardim de formigas cortadeiras não esteja relacionado com a degradação do amido, visto que o metabolismo desse polissacarídeo está mais relacionado com o fungo mutualista (SILVA et al., 2006c).

No geral, celulase foi a enzima que apresentou a maior porcentagem de isolados produtores (72%) em relação às outras enzimas estudadas. A celulose é o polissacarídeo mais abundante encontrado em substratos vegetais, sendo um componente fundamental na estrutura da célula vegetal e este é o polímero encontrado mais abundantemente em ambientes terrestres (LIMA et al., 2005; ZHANG et al., 2006). Estudos prévios consideravam a celulose o principal polissacarídeo utilizado como fonte de carbono pelo fungo mutualista (MARTIN; WEBER, 1969), porém, estudos recentes demonstraram que a degradação da celulose por esse fungo é baixa, quando comparada com outros polissacarídeos como pectina, xilana e amido (SIQUEIRA et al., 1998; ABRIL; BUCHER, 2002; 2004; SILVA et al., 2006c). Suen e colaboradores (2010) demonstraram através de métodos independentes de cultivo que bactérias estão envolvidas na degradação da celulose no

jardim de fungo. Com base no número de fungos produtores de celulase observados no presente estudo é possível sugerir que estes também atuem na degradação desse polissacarídeo, assim como as bactérias e leveduras (SUEN et al., 2010, MENDES et al., 2012).

Arcuri (2013) observou que 37,6% das leveduras analisadas em seu estudo eram produtoras de CMCase, já Mendes e colaboradores (2012) observaram que 43% dos isolados eram produtores dessa mesma enzima. Comparado com esses trabalhos, o presente estudo recuperou uma maior proporção de fungos produtores de CMCase (76%). É possível que os fungos colaborem, juntamente com bactérias e leveduras, na degradação da celulose presente nos jardins das formigas (SUEN et al., 2010; MENDES et al., 2012).

A enzima polimetilgalacturonase apresentou a segunda maior porcentagem de isolados produtores (71%). Substâncias pécticas são encontradas em abundância na natureza, pois fazem parte da lamela média e atua como uma camada adesiva entre as paredes das células vegetais (ROMBOUTS, PILNIK, 1980; ALKORTA et al., 1998). É sabido que um grande número de fungos filamentosos e bactérias provenientes de ambientes com grande quantidade de pectina (i. e. folhas, flores, frutos, entre outros) são capazes de produzir enzimas do complexo pectinolítico (GEETHA et al., 2012). Talvez o grande número de fungos produtores de polimetilgalacturonase encontrado nesse estudo, ocorreu pelo fato de que os mesmos tenham sido isolados de um ambiente rico em substratos de origem vegetal (jardim de fungo). Pectinases são produzidas em grandes quantidades por *L. gongylophorus* (SIQUEIRA et al., 1998; SILVA et al., 2006c), pois atuam na quebra das células vegetais, permitindo o acesso do fungo aos outros nutrientes contidos nas células.

Segundo a análise de correspondência (Figura 5), todos os ninhos apresentaram um padrão semelhante em relação aos isolados produtores de polimetilgalacturonase, com exceção do ninho 3 (*A. capiguara*) e o ninho 8 (*A. sexdens rubropilosa*), que apresentaram as maiores proporções de isolados produtores. Em relação à composição de fungos, os dois ninhos compartilham apenas cinco gêneros (*Colletotrichum*, *Cytospora*, *Fusarium*, *Mycosphaerella*, *Pestalotiopsis*); contudo, a composição não influenciou na proporção de isolados produtores de polimetilgalacturonase, pois a maioria dos isolados desses ninhos foram produtores dessa enzima. Esses resultados corroboram com os resultados obtidos para a enzima celulase, a qual a composição de espécies não foi o fator que influenciou no perfil de isolados produtores dessa enzima (Apêndice 2).

Uma baixa proporção de fungos produtores de poligalacturonase foi observada neste estudo (37%), quando comparada às demais enzimas avaliadas. Pode-se observar que três dos quatro ninhos de *A. sexdens rubropilosa* apresentaram um perfil semelhante em relação à produção desta

enzima (Figura 4). Esses três ninhos foram os que apresentaram as maiores proporções de isolados produtores de poligalacturonase do estudo. Carreiro (2000) relatou que 53% de leveduras isoladas de ninhos de *A. sexdens rubropilosa* apresentaram a capacidade de produzir enzimas pectinolíticas (poligalacturonase e polimetilgalacturonase). A mesma autora relatou que 30% das leveduras isoladas do ninho de *A. sexdens rubropilosa* foram capazes de assimilar o produto final da hidrólise da pectina (i.e. ácido galacturônico). Ainda em relação às leveduras, Mendes e colaboradores (2012) demonstraram que uma elevada proporção de isolados obtidos de jardim (64% em *A. texana* e 79% em *Acromyrmex* spp.) foi capaz de assimilar ácido galacturônico. Arcuri (2013) observou que 42,1% dos isolados analisados eram produtores da enzima poligalacturonase e que 70,6% dos isolados eram capazes de assimilar o principal produto da hidrólise dessas substâncias (ácido galacturônico). Os dados obtidos em ambos os estudos sugerem que o papel desempenhado pelas leveduras no jardim das formigas cortadeiras, além da degradação do substrato vegetal, seria a detoxificação do ninho através do consumo de ácido galacturônico, prevenindo o acúmulo desse composto no jardim, visto que este é considerado tóxico para as operárias (SILVA et al., 2003). Se os fungos filamentosos produtores de poligalacturonase encontrados no presente estudo também assimilarem ácido galacturônico, os mesmos também podem contribuir, junto com as leveduras, na homeostase dos ninhos.

A enzima xilanase foi produzida por 53% do total de isolados. Pode-se notar que três dos quatro ninhos de *A. capiguara* analisados no presente estudo apresentaram um perfil semelhante em relação à produção dessa enzima (Figura 4). A proporção de fungos produtores de xilanase nos ninhos 1, 2 e 4 foi de 66, 75 e 100%, respectivamente. Em relação à composição de espécies nesses três ninhos pode-se observar a predominância do gênero *Penicillium* (23% do total dos isolados dessa espécie de formiga), seguido do gênero *Cladosporium* correspondendo a 16 isolados (13%).

Em relação às gramíneas, é sabido que as folhas desses vegetais apresentam uma maior quantidade de xilana e arabinoxilana em sua estrutura, quando comparada com dicotiledôneas que possuem grande quantidade de xiloglicanas e pouca quantidade de xilana (BRAUN; RODRIGUES, 1993). Assim, o fato de encontrar um perfil enzimático dos fungos associados às cortadeiras de monocotiledôneas voltado para as xilanases pode estar intimamente ligado à composição estrutural desse substrato.

O presente estudo demonstrou a grande quantidade de isolados produtores de enzimas presentes nos jardins das formigas. Entretanto, recentemente, Aylward e colaboradores (2013) realizaram análises metaproteômicas e demonstraram que apenas um espectro de massa estava

relacionado às enzimas lignocelulolíticas derivadas de bactérias e os outros 81.000 espectros de massa obtidos, estavam relacionados com enzimas produzidas pelo fungo mutualista. Assim, esses autores sugerem que o fungo mutualista é o micro-organismo mais ativo metabolicamente no jardim de fungo, contrastando com o trabalho de Suen et al. (2010) e as hipóteses levantadas por Mendes et al. (2012). Entretanto, Aylward et al. (2013) estudaram ninhos de formigas mantidas no laboratório. Em áreas naturais, ninhos dessas formigas podem passar por situações de desequilíbrio (ataque por parasitas, como *Escovopsis* sp.), nas quais as formigas ou o fungo mutualista não desempenham as funções vitais para a colônia (PAGNOCCA et al., 2012). Portanto, nessas fases do ninho, bactérias, leveduras e fungos filamentosos podem influenciar o metabolismo do jardim, através da produção de enzimas que degradam o material vegetal. Assim, estudos futuros utilizando metaproteômica deverão considerar diferentes fases do ciclo do jardim de fungo.

6.4 Experimento de crescimento do fungo mutualista

Nesse ensaio o fungo mutualista foi cultivado nos produtos de hidrólise gerados da quebra enzimática de polímeros vegetais, promovida por *P. citrinum* e *F. solani*. Como esperado, o maior crescimento do fungo das formigas foi observado no controle positivo (meio YNB suplementado com glicose), em contrapartida, o menor crescimento foi observado no controle negativo (meio YNB, Tabela 5). O fato de ser observado crescimento no controle negativo provavelmente esteja relacionado o uso de nutrientes de reserva do fungo (ABRIL; BUCHER, 2002).

Quando o fungo mutualista foi cultivado nos produtos da quebra da CMC, realizada por *P. citrinum* e *F. solani*, notou-se que o crescimento de *L. gongylophrous* foi significativamente maior que o controle negativo, porém, menor do que no controle positivo. Martin e Weber (1969) sugeriram que a principal fonte de nutrição do fungo mutualista seriam os produtos da hidrólise da celulose. Contudo, estudos posteriores demonstraram que o crescimento do fungo em meio contendo celulose como única fonte carbono é baixo, quando comparado com o crescimento em outras fontes de carbono (SIQUEIRA et al., 1998; SILVA et al., 2006c). Esses autores alegam que a glicose utilizada para o desenvolvimento do fungo seria proveniente da quebra do amido e não da celulose. Desta forma, podemos sugerir que o metabolismo dos fungos *P. citrinum* e *F. solani* influenciou o crescimento do fungo mutualista através da hidrólise da CMC com consequente liberação de glicose, permitindo o crescimento do fungo mutualista em uma condição de cultivo previamente relatada como não sendo ideal para seu desenvolvimento (SIQUEIRA et al., 1998;

SILVA et al., 2006c). Esse resultado indica que fungos presentes nos ninhos das formigas podem influenciar de maneira positiva o desenvolvimento do fungo mutualista.

O fungo mutualista apresentou a menor biomassa quando cultivado no produto de hidrólise das substâncias pécticas utilizadas no experimento (i.e. pectina de maçã e ácido poligalacturônico). Siqueira e colaboradores (1998) cultivaram o fungo mutualista em diferentes fontes de carbono e foi observado que, depois da celulose, a fonte que menos induziu o crescimento do fungo mutualista foi o ácido galacturônico, produto da hidrólise de substâncias pécticas. Mesmo com a ação enzimática dos fungos *P. citrinum* e *F. solani* no meio utilizado, não foi observado um crescimento significativo de *L. gongylophorus*. Assim, os resultados obtidos corroboram com resultados previamente observados (SIQUEIRA et al., 1998; SILVA et al., 2006c).

Semelhantemente aos produtos de hidrólise de CMC, os produtos de hidrólise de xilana proporcionaram uma maior biomassa de *L. gongylophorus* em relação ao controle negativo (Tabela 5). Estudos prévios demonstraram que a fonte de polímero vegetal que mais induz o crescimento do fungo mutualista é a xilana (SIQUEIRA et al., 1998; SILVA et al., 2006c). Esse polissacarídeo de cadeia curta e altamente ramificada é encontrado na célula vegetal entre as camadas de lignina e celulose, a qual é formada principalmente por unidades monoméricas de xilose (BOM; FERRARA, 2007). Além da glicose, Siqueira e colaboradores (1998) observaram que a xilose também proporciona um crescimento do fungo mutualista. A ação enzimática de *P. citrinum* e *F. solani* teve como consequência a liberação de xilose no meio, a qual provavelmente permitiu o crescimento do fungo.

Um fato relevante a ser destacado é o aumento da concentração de açúcares residuais após o cultivo do fungo mutualista, quando este foi cultivado em todos os produtos de hidrólise gerados por *F. solani*; com exceção dos produtos do ácido poligalacturônico (Tabela 5). Os resultados observados podem indicar que houve uma indução do metabolismo do fungo mutualista para hidrolisar os polissacarídeos remanescentes do cultivo de *F. solani*, com consequente liberação de açúcares redutores. É provável que a concentração de açúcares prévia ao cultivo do fungo mutualista não foi o suficiente para o seu desenvolvimento, portanto, o fungo das formigas necessitou degradar os polímeros remanescentes no meio. Alternativamente, a indução observada pode ser devida a modificações do substrato ou a produção de algum composto por *F. solani*.

Em relação ao fungo *P. citrinum*, foi observado um decréscimo na concentração de açúcares redutores nos meios, após o cultivo do fungo *L. gongylophorus*; com exceção do ácido poligalacturônico. O decréscimo dos açúcares provavelmente ocorreu pelo consumo desses pelo

fungo mutualista. Ao contrário do observado para os produtos de hidrólise gerados por *F. solani*, a concentração dos produtos gerados por *P. citrinum* talvez foi o suficiente para sustentar o crescimento significativo de *L. gongylophorus*, em relação ao controle negativo.

Com relação aos produtos de hidrólise do ácido poligalacturônico gerados por *P. citrinum* e *F. solani*, observou-se um aumento na concentração desses produtos, mesmo após o cultivo do fungo mutualista. Essa variação é provavelmente devida ao fato de *L. gongylophorus* não ser um bom assimilador de ácido galacturônico e formar biomassa nessa fonte de carbono (SILVA et al., 2006c). Portanto, era esperado um baixo crescimento do fungo mutualista nos ensaios do presente estudo (Tabela 5).

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que fungos presentes nos jardins das formigas cortadeiras podem, de certa forma, influenciar o crescimento do fungo mutualista, corroborando a hipótese levantada por Mendes et al. (2012). Assim, a ação enzimática sinérgica de vários micro-organismos associados ao jardim de fungos das formigas cortadeiras é um aspecto relevante a ser considerado na interação formiga-fungo.

6.5 Potencial biotecnológico de fungos encontrados nos jardins de formigas cortadeiras

No geral, a maior atividade enzimática foi para a xilanase produzida pelo fungo *P. citrinum*, quando cultivado em grama. É sabido que substratos que apresentam grande quantidade de xilana em sua estrutura, geralmente induzem a produção de enzimas do complexo xilanolítico e, por sua vez, são utilizados em estudos que visam à seleção de micro-organismos com esse potencial enzimático (MILAGRES et al., 1993). Nesse sentido, pode-se sugerir que a atividade enzimática de xilanase apresentada por *P. citrinum* esteja possivelmente relacionada à origem de isolamento desse fungo, pois é sabido que gramíneas apresentam uma maior quantidade de xilana na parede celular, quando comparada com plantas dicotiledôneas (BRAUN; RODRIGUES, 1993). Nesse sentido, a produção de xilanases de *P. citrinum* pode estar relacionada ao tipo de substrato presente no jardim de fungo de *A. capiguara*, o qual é basicamente composto por fragmentos de gramíneas.

Adicionalmente, diversos autores demonstraram que os fungos que se destacam na produção de xilanases são os representantes dos gêneros *Aspergillus* (FERREIRA et al., 1999; GHANEM et al., 2000; De SOUZA et al., 2001; LU; LII; WU, 2003; MORETTI et al., 2012) e *Penicillium* (ASSAMOI et al., 2008; 2010; TERRASAN, 2011). Portanto, o fato de encontrar *P. citrinum* no

jardim de fungo das formigas cortadeiras corrobora os dados da literatura em relação ao potencial de *Penicillium* sp. na produção de xilanases.

Segundo Anderson e Akin (2008) o uso de outras gramíneas como alternativa a cana-de-açúcar, é uma abordagem promissora na produção do etanol, visto que as gramíneas podem apresentar uma menor quantidade de lignina em sua estrutura, facilitando o acesso a polissacarídeos que gerem açúcares fermentescíveis. Nesse sentido, a expressiva atividade xilanolítica de *P. citrinum* em grama é um aspecto a ser destacado como uma potencial linhagem para estudos futuros.

Pode-se sugerir que a baixa atividade enzimática para xilanase de *F. solani*, comparada com *P. citrinum*, tenha se dado por características metabólicas desse micro-organismo. Apesar de todos os substratos oferecidos para o fungo apresentarem xilana em sua estrutura, pode ser que o aparato metabólico do fungo não esteja voltado à degradação desse polissacarídeo, mas sim de outros componentes do substrato vegetal. Evidência que reforça tal resultado é o fato de *F. solani* ser isolado de jardins de cortadeira de dicotiledônea; e que tal substrato apresenta menor quantidade de xilana em relação às gramíneas (BRAUN; RODRIGUES, 1993).

Em relação à enzima β -glicosidase produzida por ambos os fungos, foi observado uma maior atividade enzimática quando estes foram cultivados em eucalipto (Tabela 6). Moretti e colaboradores (2012) demonstraram que o farelo de trigo proporcionou uma maior atividade enzimática de β -glicosidase de duas linhagens de fungos termofílicos, quando comparado aos demais substratos. Apesar do farelo de trigo ser amplamente utilizado em estudos de produção enzimática, pode-se notar que outros substratos naturais também induzem a produção de uma maior quantidade de enzimas.

A produção de CMCase de ambos os fungos foi considerada baixa quando comparada com as outras enzimas. Wood (1971) analisou a atividade de CMCase do fungo *F. solani* cultivado em meio sintético. O autor observou uma atividade enzimática expressiva para esta enzima, as quais variaram de 388 a 430 U mL⁻¹ em diferentes condições de cultivo. Embora a produção de CMCase obtida no presente estudo não seja semelhante à encontrada por Wood (1971), é provável que as condições de cultivo utilizadas no presente estudo não foram favoráveis para a produção dessa enzima.

No caso da FPase as atividades observadas também foram baixas para ambos os fungos e estão de acordo com resultados de outros estudos. Por exemplo, Moretti et al. (2012) observaram uma atividade que variou de 0,2 a 3,2 U g⁻¹ para 27 fungos termofílicos e termotolerantes. Vale

ressaltar que a dosagem das FPases nem sempre demonstra a verdadeira atividade enzimática das celulasas na reação (PERCIVAL ZHANG; HIMMEL; MIELENS, 2006). Isso pode ser confirmado pela atividade enzimática de β -glicosidase obtida para ambos os fungos (Tabela 6).

A produção de Exo-PG de *P. citrinum* foi semelhante em grama e em farelo de trigo/bagaço, sendo maior em relação à atividade observada quando o fungo foi cultivado em eucalipto. Silva e colaboradores (2002) avaliaram o potencial de produção de enzimas pectinolíticas pelo fungo *Penicillium viridicatum* em diferentes substratos agroindustriais. Os autores observaram uma produção máxima de $27,0 \text{ U g}^{-1}$ da enzima poligalacturonase por esse fungo, após oito dias de incubação. Foi observado que o fungo apresentou uma maior atividade desta enzima quando cultivado em diferentes substratos, chegando a uma produção máxima de $55,2 \text{ U g}^{-1}$, quando cultivado em bagaço de laranja/farelo de trigo. Os autores observaram que a presença do bagaço de laranja aumentou significativamente a produção desta enzima pectinolítica. Sabe-se que frutas cítricas em geral, apresentam grande quantidade de pectina. No caso da laranja, a quantidade de pectina em peso seco da fruta pode chegar até a 28% da composição total (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005). É possível sugerir que o uso de substratos alternativos na avaliação do potencial enzimático desse fungo, por exemplo, substâncias com maior concentração de pectina em sua estrutura, poderia aumentar a atividade desta enzima consideravelmente, assim como foi relatado por Silva et al. (2002)

No geral, o fungo *P. citrinum* apresentou atividades enzimáticas próximas quando cultivado em grama e substrato agroindustrial para todas as enzimas e superou a maioria das atividades enzimáticas do fungo *F. solani*. Com os resultados obtidos, sugere-se que *P. citrinum* apresenta um aparato enzimático voltado à degradação da xilana. Utilizando procedimentos de otimização e planejamento experimental, é possível que a produção de xilanase seja aumentada consideravelmente, bem como a produção das demais enzimas analisadas.

Os jardins de fungo das formigas cortadeiras é um ambiente pouco explorado do ponto de vista biotecnológico (POULSEN, 2010). Diversos trabalhos relatam a presença de micro-organismos associados aos ninhos, porém, até o presente momento, nenhum estudo buscou avaliar o potencial desses micro-organismos. O presente estudo demonstra o potencial enzimático de fungos associados ao jardim das formigas cortadeiras e abrem janelas para estudos futuros. Por exemplo, as xilanases de *P. citrinum* podem ter diversas aplicações como, por exemplo, no branqueamento de polpas celulósicas na indústria papeleira, clareamento de sucos e produção de alimentos na indústria alimentícia, tratamento de efluentes com geração de produtos de interesse, entre outras (BEG et al.,

2001). Considerando a elevada diversidade de micro-organismos presentes nos jardins de fungo das formigas cortadeiras, esse “ambiente” pode ser considerado um reservatório de micro-organismos com potencial pouco explorado.

7 CONCLUSÕES

- O método de triagem utilizado foi aplicado com sucesso, facilitando o estudo das 235 linhagens utilizadas no presente trabalho. Apesar do método não garantir reprodutibilidade para uma das enzimas avaliadas, este constitui em uma alternativa rápida para acessar o potencial biotecnológico de fungos de origem ambiental. Nesse sentido, o método proposto pode ser útil em estudos de bioprospecção.
- As diferenças nos perfis enzimáticos dos fungos encontrados nos jardins de *A. sexdens rubropilosa* e de *A. capiguara* estão relacionadas ao tipo de substrato vegetal que esses insetos forrageiam para o cultivo do fungo mutualista. Esse resultado sugere que cada espécie de formiga pode abrigar uma comunidade de fungos com perfil metabólico voltado para a degradação do substrato vegetal encontrado no ninho.
- *L. gongylophorus* é capaz de crescer nos produtos de hidrólise de polissacarídeos gerados pelo metabolismo de outros fungos. Embora o crescimento seja estatisticamente menor que o do controle positivo, os resultados obtidos reforçam a hipótese de que micro-organismos presentes nos jardins de fungos podem atuar na degradação do substrato vegetal e fornecer nutrientes para o crescimento do fungo mutualista no jardim de fungo.
- O presente estudo demonstrou o potencial enzimático de fungos isolados de um ambiente até o momento pouco explorado do ponto de vista biotecnológico. *Penicillium citrinum* destacou-se, dentre os outros fungos isolados dos jardins das formigas cortadeiras, pela expressiva produção de xilanases com potencial para aplicações em diversas áreas. Tendo em vista os resultados obtidos, ninhos de formigas cortadeiras podem ser considerados como uma fonte de recursos genéticos microbianos a ser explorada.

8 PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos nos ensaios de crescimento do fungo mutualista sinalizam um possível papel dos micro-organismos associados ao jardim de fungo. Para suportar a hipótese de que o metabolismo de polissacarídeos do jardim também tenha a influência de outros micro-organismos, são necessários estudos *in vivo* para determinar o real papel desses fungos em condições sistêmicas (na presença de todos os parceiros da associação).

A abundância de isolados produtores de enzimas sinaliza o potencial biotecnológico do jardim de fungo. A coleção de fungos avaliada no presente estudo é apenas uma parte da coleção de fungos provenientes de formigas cortadeiras mantida no acervo da CRM-UNESP. O presente estudo caracterizou e demonstrou o potencial biotecnológico de parte desse recurso genético microbiano mantido na coleção, de tal modo, que esse aspecto motiva estudos futuros que procurem caracterizar os micro-organismos depositados no acervo da CRM-UNESP.

REFERÊNCIAS

- ABRIL, A. B.; BUCHER, E. H. Evidence that the fungus cultured by leaf-cutting ants does not metabolize cellulose. **Ecology Letters**, Oxford, v. 5, n.3, p. 325–328, 2002.
- ABRIL, A. B.; BUCHER, E. H. Nutritional sources of the fungus cultured by leaf-cutting ants. **Applied Soil Ecology**, Amsterdã, v. 26, n.3, p. 243–247, 2004
- ACHARYA, S.; CHAUDHARY, N. Bioprospecting thermophiles for cellulase production: a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.43, n.3, p. 844-856, 2012
- ALKORTA, I.; GABIRSU, C.; LHAMA, M. J.; SERRA, J. L. Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process in Biochemistry**, Londres, v. 33, n.1, p. 21-28, 1998.
- ANDERSON, W. F.; AKIN, D. E. Structural and chemical properties of grass lignocelluloses related to conversion for biofuels. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 35, n. 5, p.355-366, 2008. DOI 10.1007/s10295-007-0291-8
- ANGELIS, C.; SERZEDELLO, A.; DE ANGELIS, D. F. Yeasts found in gardens of *Atta sexdens rubropilosa* and *Atta laevigata*. **Naturalia**, São Paulo, v. 8, p. 149-151, 1983.
- ALMEIDA, R. M. J.; MODIG, T.; PETERSSON, A.; HÄHN-HÄGERDAL, B.; LIDÉN, G.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v. 82, n. 4, p. 340–349, 2007.
- ARCURI, S. L. **Taxonomia e características metabólicas de leveduras isoladas de bitus de *Atta sexdens rubropilosa***. 2013. 31f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2013.
- ASSAMOI, A.A.; DELVIGNE, F; ALDRIC, J.M.; DESTAIN, J.; THONART, P. Improvement of xylanase production by *Penicillium canescens* 10-10c in solid-state fermentation. **Biotechnology and Agronomy Society and Environment**, Gembloux v. 17, n.4 p.111-118, 2008.
- ASSAMOI, A.A.; DESTAIN, J.; THONART, P. Xylanase production by *Penicillium canescens* on soya oil cake in solid-state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 160, n.1, p.50-62, 2010.
- AYLWARD, F. O.; BURNUM-JOHNSON K. E.; TRINGE, S. G.; TEILING, C.; TREMMEL, D. M.; MOELLER, A. J.; SCOTT, J. J.; BARRY, K. W.; PIEHOWSKI, P. D.; NICORA, C. D.; MALFATTI, S. A.; MONROE, M. E.; PURVINE, S. O.; GOODWIN, L. A.; SMITH, R. D.; WEINSTOCK, G. M.; GERARDO, N. M.; SUEN, G.; LIPTON, M. S.; CURRIE, C. R. *Leucoagaricus gongylophorus* produces a diversity of enzymes for recalcitrant plant polymer degradation in leaf-cutter ant fungus gardens. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, 2013. doi:10.1128/AEM.03833-12

BACCI, M.; RIBEIRO, S. B.; CASAROTO, M. E. ; PAGNOCCA F. C. Biopolymer-degrading bacteria from nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Brasil, v. 28, p. 79-82, 1995a.

BACCI, M.; AVERSA M. M.; PAGNOCCA F. C. Cellulose degradation by *Leucocoprinus gongylophorus*, the fungus cultured by the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdã, v. 4, n. 67, p. 385-386, 1995b.

BARRON, G. L. **The Genera of Hyphomycetes from soil**. Robert E. Krieger Publishing Company, Nova Iorque, 1968. 364p.

BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; NITSCH ROCHA, S. N. Ethanol Production in Brazil: The Industrial Process and Its Impact on Yeast Fermentation. **Biofuel Production-Recent Developments and Prospects**, ISBN: 978-953-307-478-8, InTech, p. 86-102, 2011. doi: 10.5772/17047.

BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 56, n. 3 – 4, p. 326 – 338, 2001.

BENSCH, K.; GROENEWALD, J. Z.; DIJKSTERHUIS, J.; STARINK-WILLEMSE, M.; ANDERSEN, B.; SUMMERELL B. A.; SHIN, H. D., DUGAN F. M.; SCHROERS, H. J.; BRAUN, U.; CROUS, P. W. Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* Complex (Davidiellaceae, Capnodiales). **Studies in Mycology**, Utrecht, n. 67, p. 1-94, 2010. doi:10.3114/sim.2010.67.01

BERDY, J. Bioactive microbial metabolites. **Journal of Antibiotics**, Tóquio, v. 58, n.4, p. 1–26, 2005.

BIELY, P. **Xylanolytic enzymes**. In: WHITAKER, J.R.; VORAGEN, A.G.J.; WONG, D.W.S. (Eds). Handbook of food enzymology. Nova Iorque: Marcel Dekker, 2003, p. 879-916.

BILLS, G. F.; PLATAS, G.; FILLOLA, A.; JIMENEZ, M.R.; COLLADO, J.; VICENTE, F.; MARTIN, J.; GONZALEZ, A.; BUR-ZIMMERMANN, J.; TORMO J. R.; PELAEZ, F. Enhancement of antibiotic and secondary metabolite detection from filamentous fungi by growth on nutritional arrays. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 104, n. 6, p. 1644–1658, 2008.

BISARIA, V. S.; GHOSE, T. K. Biodegradation of cellulose materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. **Enzyme Microbiology and Technology**, Nova Iorque, v. 3, n.2, p. 90-104, 1981.

BRANDÃO, C.R.F.; MAYHÉ-NUNES, A.J.; SANHUDO, C.E.D. Taxonomia e flogênia das formigas-cortadeiras In: Della Lucia, T.M.C. **Formigas cortadeiras da Bioecologia ao Manejo**, editora UFV, p.421, 2011.

BRAUN, E.J.; RODRIGUES, C.A.; Purification and properties of an endoxylanase from a corn stalk rot strain of *Erwinia chrysanthemi*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.83, n.3, p.332-338, 1993.

- BULL, A. T.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M. Search and Discovery Strategies for Biotechnology: the Paradigm Shift. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Nova Iorque, v. 46, n. 3, p. 573-606, 2000.
- CAFARO, M. J.; POULSEN, M.; LITTLE, A. E. F.; PRICE, S. L.; GERARDO, N. M.; WONG, B. STUART, A. E.; LARGET, B.; ABBOT, P.; CURRIE, C. R. Specificity in the symbiotic association between fungus-growing ants and protective *Pseudonocardia* bacteria. **Proceedings of The Royal Society B-Biological Sciences**, Londres, v. 278, n. 1713, p. 1814-1822, 2011.
- CARRERA, J. E. Producción y aplicación de enzimas industriales. **Biotecnología em el Sector Agropecuario y Agroindustrial**, Popayán, v. 1, n. 1, p. 9-15, 2003.
- CARREIRO, S. C.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; BACCI, M. Jr.; HEBLING, M. J. A.; da SILVA, O. A. Yeasts associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdã, v. 71, n. 3, p. 243-248, 1997.
- CARREIRO, S. C. **Pesquisa de fator Killer e análise da degradação de polissacarídeos vegetais por leveduras associadas aos ninhos de *Atta sexdens***. 2000. 89 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2000.
- CARREIRO, S. C.; PAGNOCCA, F. C.; BACCI JÚNIOR, M.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; MIDDELHOVEN, W. J. Occurrence of killer yeasts in leaf-cutting ant nests. **Folia Microbiologica**, Praga, v. 47, n. 3, p. 259-262, 2002.
- CASTILLO, F. D H.; PADILLA, A. M B.; MORALES, G. G.; SILLER, M. C.; HERRERA, R. R.; GONZALES, G. N. A. *In Vitro* Antagonist Action of *Trichoderma* Strains Against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium cepivorum*. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v. 3, n. 6, p. 410-417, 2011.
- CHANDRA, R. P.; BURA, R.; MABEE, W. E.; BERLIN, A.; PAN, X SADDLER, J. N. Substrate pretreatment: the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? **Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology**, Berlim, v. 108: 67-93, 2007.
- CLARDY, J.; FISCHBACH, M. F.; CURRIE, C. R. The natural history of antibiotics. **Current Biology**, Londres, v. 19, n. 13, p. 437-441, 2009.
- COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. Belo Horizonte, 2006. 206 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.
- COLEY, P. D.; BRYANT, J. P.; CHAPIN, F. S. Resource availability and plant anti-herbivore defense. **Science**, Washington, v. 230, n. 4728, p. 895-899, 1985.
- CRAVEN, S. E.; DIX, M. W.; MICHAELS, G. E. Attine fungus gardens contain yeasts. **Science**, Washington, v. 169, n. 3941, p. 184-186, 1970.

CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G.; MALLOCH, D. The agricultural pathology of ant fungus gardens. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 96, n. 7, p. 7998-8002, 1999a.

CURRIE, C. R.; SCOTT, J. A.; SUMMERBELL, R. C.; MALLOCH, D. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. **Nature**, Londres, v. 398, n. 6729, p. 701-704, 1999b

CURRIE, C. R. Prevalence and impact of a virulent parasite on a tripartite mutualism. **Oecologia**, Berlin, v. 128, n.1, p. 99-106, 2001.

DAROIT, D. J. **Caracterização de uma β -glicosidade de *Monoascus purpureus***. 2007. 125f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, 2007.

DELLA-LUCIA, T. M. C.; SOUZA, D. J. Importância e história de vida das formigas cortadeiras. In: DELLA-LUCIA, T. M. C. **Formigas cortadeiras, da bioecologia ao manejo**. Viçosa: Editora da Universidade Federal de Viçosa, 2011. p. 13-26

DELLA LUCIA, T. M. C.; GANDRA, L. C.; GUEDES, R. N. C. Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges. **Society of Chemical Industry**, v. Londres, 70, n.1, p. 14-23, 2013

De FINE-LICHT, H. H.; SCHIØTT, M.; ROGOWSKA-WRZESINSKAB, A.; NYGAARD, S.; ROEPSTORFF, P.; BOOMSMA, J. J. Laccase detoxification mediates the nutritional alliance between leaf -cutting ants and fungus-garden symbionts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Whashington, v. 110, n. 2, p. 583-587, 2013

DE SOUZA, D. F.; DE SOUZA, C .G. M.; PERALTA, R. M. Effect of easily metabolizable sugars in the production of xylanase by *Aspergillus tamarisii* in solid-stat fermentation. **Process in Biochemistry**, Londres, v. 36, n. 8 – 9, p.835 - 838, 2001.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. **Compendium of soil fungi**. London: Academic Press, 1980. 2v.

DOUGLAS, A. E.. **The symbiotic habit**. Princeton, Princeton University Press, 2010

EL-MORSY, E. M. Fungi isolated from the endorhizosphere of halophytic plants from the Red Sea Coast of Egypt. **Fungal Diversity**, Ching Mai, v. 5, p. 43–54, 2000.

EGOROVA, K.; ANTRANIKIAN, G. Industrial relevance of thermophilic Archaea. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 8, n. 6, p. 649-655, 2005.

ENZYME TECHNICAL ASSOCIATION. Enzymes: A primer on use and benefits today and tomorrow. Washington, DC, jun. 2001. 32 p. Disponível em:<http://www.enzymeassociation.org/wp-content/uploads/2013/09/benefits_paper.pdf>. Acesso em: 14 jan.. 2014.

- FELLOWS, P. **Tecnología del processado de los alimentos: Principios y prácticas**. Zaragoza: Acribia, S.A., 1994.
- FERREIRA, G.; BOER, C. G.; PERALTA, R. M. Production of xylanolytic enzymes by *Aspergillus tamarii* in solid state fermentation. **FEMS Microbiology Letter**, Amsterdã v.173, p.335- 339, 1999.
- FERNANDEZ, E. R. D. P.; GOMES, E.; SILVA, R. D. Purification and characterization of two beta-glucosidases from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Folia Microbioly**, Praga. v. 47, n. 6, p. 685-90, 2002.
- FISHER, P. J.; STRADLING, D. J.; SUTTON, B. C.; PETRINI, L. E. Microfungi in the fungus gardens of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*: a preliminary study. **Mycological Research**, Oxford, v. 100, n. 5, p. 541-546, 1996.
- FIRN, R.D. Bioprospecting-Why is it so unrewarding? **Biodiversity and Conservation**, Londres, v. 12, n. 2, p. 207-216, 2003.
- FOWLER, H. G.; SILVA, V. P.; SAES, N. B. Population dynamics of leaf-cutting ants: a brief review. In: LOFGREN, C. S.; VANDER MEER, R. K. (Eds.) **Fire ants and leaf-cutting ants: biology and management**. West-View Press, Boulder, Colorado, 1986. pp. 123–145
- GEETHA, M.; SARANRAJ, P.; MAHALAKSHMI, S.; REETHA, D. Screening of pectinase producing bacteria and fungi for its pectinolytic activity using fruit wastes. **International Journal of Biochemistry and Biotech Science**, v.1, p. 30-42, 2012.
- GHANEM, N. B.; YUSEF, H. H.; MAHROUSE, H. K. Production of *Aspergillus terreus* xylanase in solid-state cultures: application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional. **BioresourceTechnology**. v. 73, n. 2, p.113-121, 2000.
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987
- GRIMM, L. H.; KELLY, S.; KRULL, R.; HEMPEL, D. C. Morphology and productivity of filamentous fungi. **Applied Microbiology Biotechnology**, Oxford, v. 69, n. 4, p. 375-384, 2005.
- HARGER, C.; SPRADA, D.; HIRATSUKA, E. **Amilase fúngica**. In: Bioquímica das Fermentações, 1982. 56 p.
- HEADON, D.R.; WALSH, G. The industrial production of enzymes. **Biotechnology Advances**, Nova Iorque, v. 12, n.4, p. 635-646, 1994.
- HOUBRAKEN, J. A. M. P.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Taxonomy of *Penicillium citrinum* and related species. **Fungal Diversity**, Ching Mai , v. 44, p. 117– 133, 2010. doi 10.1007/s13225-010-0047-z
- JAYANI, R. S.; SAXENA,S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, Londres, v. 40, n. 9, p. 2931 – 2944, 2005.

JOO, H.S.; CHANG, C.S. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grow on soybean meal: optimization and some properties. **Process Biochemistry**, Londres, v. 40, n. 3-4, p. 1263-1270, 2005.

KASANA, R. C.; SALWAN, R.; DHAR, H.; DUTT, S.; GULATI, A. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. **Current Microbiology**, Springer Verlag, v. 57, n. 5, p. 503-507, 2008.

KIRK, P.; CANNON, P.; MINTER, D.; STALPERS, J. **Ainsworth and Bisby's dictionary of the Fungi**, 10th ed. Wallingford, U K: CAB International. 2008.

KOOIJ P. W.; SCHIØTT, M.; BOOMSMA, J. J., DE FINE LICHT, H. H. Rapid shifts in *Atta cephalotes* fungus-garden enzyme activity after a change in fungal substrate (Attini, Formicidae). **Insectes Sociaux**, Paris, v. 2, n. 58, p. 145-151, 2011.

KUHAD, R. C.; SINGH, A.; ERICSSON, K. E. L. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, Berlin, v. 57, p. 45-125, 1999.

KUMARESAN, V.; SURYANARAYANAN, T.S. Endophyte assemblage in young, mature and senescent leaves of *Rhizophora apiculata*: evidence for the role of endophytes in mangrove litter degeneration. **Fungal Diversity**, Ching Mai, v. 9, p. 81-91, 2002.

LEATHERS, T.D. Bioconversions of maize residues to value-added coproducts using yeast-like fungi. **FEMS Yeast Research**, Amsterdã, v. 3, n. 3, p. 133-140, 2003.

LIMA, A. L G., NASCIMENTO, R. P.; BOM, E. P. S.; COELHO, R. R. R. *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use in detergent and textile industry. **Enzyme and Microbial Technology**, Nova Iorque, v. 37, n. 2, p. 272-277, 2005.

LITTLE, A. E. F.; CURRIE, C. R. Symbiotic complexity: discovery of a fifth symbiont in the attine microbe symbiosis. **Biology Letters**, Londres, v. 3, n. 5, p. 501-504, 2007

LITTLE, A. E. F.; CURRIE, C. R. Black yeasts symbionts compromise the efficiency of antibiotic defenses in fungus-growing ants. **Ecology**, Tempe, v. 85, n. 5. p. 1216-1222, 2008.

LOODER, J. General classification of the yeast. In: LOODER, J. (ed.) **The yeast a taxonomic study**. Amsterdam: North Holland, p. 1-33.1970

LU, W.; LI, D.; WU, Y. Influence of water activity and temperature on xylanase biosynthesis in pilot-scale fermentation by *Aspergillus sulphureus*. **Enzyme and Microbial Technology**, Nova Iorque, v. 32, n.2, p.305-311, 2003.

- NORBERG, A. N.; SERRA-FREIRE. Caracterização da dose letal mínima por irradiação gama para *Penicillium citrinum*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo**, v. 6, n. 35, p. 527-533, 1993.
- MARTIN, M.M.; WEBER, N.A. The cellulose-utilizing capability of the fungus cultured by the attine ant *Atta colombica tonsipes*. *Madison*, v. 62, n. 6, p. 1386–1387, 1969.
- MAYHÉ-NUNES, A. J.; JAFFÉ K. On the biogeography of attini (Hymenoptera: Formicidae). *Sociedad Venezolana de Ecología. Ectropicos*, Caracas, v. 11, n. 1, p. 45-54, 1998.
- McKAY, A. M. A plate assay method for the detection of fungal poligalacturonase secretion. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 56, n. 3, p. 355-358, 1987.
- MEIRELLES, L. A.; MENDES, T. D.; SOLOMON, S. E.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; RODRIGUES, A. Broad *Escovopsis*-inhibition activity of *Pseudonocardia* associated with *Trachymyrmex* ants. **Environmental Microbiology Reports**, 2013. doi:10.1111/1758-2229.12132)
- MENDES, T. D.; BORGES, W. S.; RODRIGUES, A.; SOLOMON, S. E.; VIEIRA, P. C.; DUARTE, M. C. T.; PAGNOCCA, F. C. Anti-*Candida* properties of Urauchimycins from actinobacteria associated with *Trachymyrmex* ants. **BioMed Research International**, 2013, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/835081>
- MENDES, T. D.; RODRIGUES A.; DAYO OWOYEMI, I.; MARSON, F. A L.; PAGNOCCA, F. C. Generation of nutrients and detoxification: possible roles of yeasts in leaf-cutting ant nests. **Insects**. v. 3, n. 1, p. 228-245, 2012. doi:10.3390/insects3010228
- MEYERS, N. Environmental services of biodiversity. **Proceeding of the National Academy of Sciences of United States of America**, Washington, v. 93, n. 7, p. 2764-2769, 1996.
- MILAGRES, A. M. F.; LACIS, L. S.; PRADE, R. A. Characterization of xylanase production by a local isolate of *Penicillium janthinellum*. **Enzyme and Microbial Technology**. Nova, Iorque, v. 15, n.3, p. 248–253. 1993.
- MILLER, G. H. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p.426-429, 1959
- MOLLER, I. E.; DE FINE LICHT H.; HARHOLT J.; WILLATS, W. G. T.; BOOMSMA J. J. The dynamics of plant cell-wall polysaccharide decomposition in leaf –cutting ant fungus gardens. **PLoS ONE**, San Francisco/Cambridge, v. 3, n. 6, 2011. (doi: 10.1371/journal.pone.0017506)
- MÖLLER, A. Die Pilzgärten einiger südamerikanischer Ameisen. **Botanische Mitteilungen aus den Tropen**, Jena, v. 6, p. 1–127, 1893.
- MORAN, N. A. Symbiosis. **Current Biology**, Londres, v.16, n. 20, p. 866-71, 2006. doi:10.1016/j.cub.2006.09.019
- MORETTI, M. S.; BOCCHINI-MARTINS, D. A.; SILVA, R. D.; RODRIGUES, A.; SETTE, L. D.; GOMES, E. Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases

and xylanases under solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 43, n.3, p. 1062-1071, 2012.

MUELLER, U. G.; REHNER, S. A.; SCHULTZ, T. R. The evolution of agriculture in ants. **Science**, Washington, v.218, n. 5385, p. 2034-2028, 1998.

MUELLER, U. G.; SCOTT, J. J.; ISHAK, H. D.; RODRIGUES, A. Monoculture of leafcutter ant gardens. **PLoS ONE**, San Francisco/Cambridge, v. 5, n. 9, p. 12668, 2010.

OH, D. C.; SCOTT, J. J.; CURRIE, C. R.; CLARDY, J. Mycangimycin, a polyene peroxide from a mutualist *Streptomyces* sp. **Organic Letters**, Washington, v.11, n. 3, p. 633–636, 2009.

OHM, R. A. ; FEAU, N.; HENRISSAT, B.; SCHOCH, C. L.; HORWITZ, B. A.; BARRY, K. H.; CONDON, B. J.; COPELAND, A. C.; DHILLON, B.; GLASER, F.; HESSE, C. N.; KOSTI, I.; LABUTTI, K.; LINDQUIST, E. A.; LUCAS, S.; SALAM, A. A.; BRADSHAW, R. E.; CIUFFETTI, L.; HAMELIN, R. C.; KEMA, G. H. J.; LAWRENCE, C.; SCOTT, J. A.; SPATAFORA, J. W. TURGEO, B. G.; WIT, P. J. G. M.; ZHONG, S. B.; GOODWIN, S. B.; GRIGORIEV, I. V. Diverse lifestyles and strategies of plant pathogenesis encoded in the genomes of eighteen *Dothideomycetes* fungi. . **PLoS ONE**, San Francisco/Cambridge, v. 8, n. 12, 2012.

OLIVEIRA, R. R.; AGUIAR, R. L.; TESSMANN, D. J.; NUNES, W. M. C.; SANTOS, A. F.; VIDA J. B. First Report of Leaf Spot Caused by *Cladosporium perangustum* on *Syagrus oleracea* in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 98, n.2, p. 280-280, 2014

OLIVEIRA, M. M. D. et al. Isotermas de sorção do resíduo agroindustrial de casca do abacaxi (*Ananas comosus* L. Mer). **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 9, n. 4, p. 565-569, 2005.

OLIVEIRA, K. F.; MALAVOLTA, L.; SOUZA, C. S.; VICENTE, E. J.; LALUCE, C. Pectinolytic activity secreted by yeasts isolated from fermented citrus molasses. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 100, n. 4, p. 633-640, 2006.

ORTIZ, A.; ORDUZ, S. In vitro evaluation of *Trichoderma* and *Gliocladium* antagonism against the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 150, n. 2, p. 53 –60, 2001.

PAGNOCCA, F.C.; BACCI, M. Jr.; FUNGARO, M. H.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J.; SANT'ANNA, A.; CAPELARI, M. RAPD analysis of the sexual state and sterile mycelium of the fungus cultivated by leaf-cutting ant *Acromyrmex hispidus fallax*. **Mycological Research**, Cambridge, Oxford, v.105, n.2, p. 173-176, 2001.

PAGNOCCA, F. C.; LEGASPE, M. F. C.; RODRIGUES, A.; RUIVO, C. C. C.; NAGAMOTO, N. S.; BACCI, M. JR.; FORTI, L. C. Yeasts isolated from a fungus-growing ant nest, including the description of *Trichosporon chiarellii* sp. nov., an anamorphic basidiomycetous yeast. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 60, n. 6, p. 1454-1459, 2010.

PAGNOCCA, F. C.; RODRIGUES, A.; BACCI, M. JR. Microrganismos associados às formigas cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (org) **Formigas-Cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa: Editora UFV, 2011, p. 262-283.

PAGNOCCA, F. C.; MASIULIONIS, V. E; RODRIGUES, A. Specialized fungal parasites and opportunistic fungi in gardens of attine ants. **Psyche**, Cambridge, v. 2012, Article ID 905109, 9 p., 2012.doi:10.1155/2012/905109.

PIEL, J.; BUTZKE, D.; FUSETANI, N.; HUI, D.; PLATZER, M.; WEN, G. S. Exploring the chemistry of uncultivated symbionts: antitumor polyketides of the pederin family. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 68, n. 3, p. 452–479, 2005.

PEREIRA, J. S. **Comunidades de fungos em jardins de formigas cortadeiras com diferentes hábitos de forrageamento**. 2014. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2014.

PETERNELLI, E. F. O.; DELLA LUCIA, T. M. C.; MARTINS S.V. Espécies de formigas que interagem com sementes de *Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, n. 5, p. 733-738. 2004.

PERCIVAL ZHANG, Y. H.; HIMMEL, M. E.; MIELENS, J. R. Outlook for cellulose improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, Nova Iorque v. 24, p. 452-481, 2006.

PITT, J. I. **A laboratory guide to common *Penicillium* species**. 2nd ed. North Ryde: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, 1988. 184 p.

POULSEN, M.; CURRIE, C. R. Complexity of insect-fungal associations: exploring the influence of microorganisms on Attine ant-fungus symbiosis. In: BOURTZIS, K MILLER, T. A. (Eds), **Insects Symbiosis**, v. 2, Newbury: CRC Press. p. 57-77, 2006.

POULSEN, M. Biomedical exploitation of the fungus-growing ants symbiosis. **Drugs News and Perspectives**, v. 23, n. 3, p. 203 – 210, 2010.

POULSEN, M.; OH, D. C.; CLARDY, J.; CURRIE, C. R. Chemical analysis of wasp-associated *Streptomyces* bacteria reveal a prolific potential for natural products discovery. **PLoS one**, v. 6, n. 2, 2012. doi:10.1371/journal.p one.0016763

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. 2013. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>

REYNOLDS, H. T.; CURRIE, C. R. Pathogenicity of *Escovopsis weberi*: The parasite of the attine-microbe symbiosis directly consumes the ant-cultivated fungus. **Mycologia**, Lawrence, v. 96, n. 5, p. 955-959, 2004.

RIBEIRO, S. B. **Caracterização de espécies bacterianas encontradas em ninhos de *Atta sexdens* L. e isolamento de *Streptomyces* de formigas da tribo Attini.** Tese de Doutorado (Doutorado em Microbiologia Aplicada)- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2000.

ROCES, F.; HOLLDOBLER, B. Leaf density and a trade-off between load size selection and recruitment behavior in *Atta cephalotes*. **Oecologia**, Berlim, v. 97, n.1, p. 1-8, 1994.

RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F. C.; BACCI, M. Jr.; HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; PENNING, L. H. Variability of non-mutualistic fungi associated with *Atta sexdens rubropilosa* nests. **Folia Microbiologica**, Praga, v. 50, n. 5, p. 421-425, 2005.

RODRIGUES, A.; BACCI, M. JR., MUELLER, U. G, ORTIZ, A.; PAGNOCCA, F. C. Microfungal "weeds" in the leafcutter ant symbiosis. **Microbial Ecology**, Washington, v. 56, n. 4, p. 604-614, 2008.

RODRIGUES, A.; CABLE, R. N.; MUELLER, U. G.; BACCI, M. JR.; PAGNOCCA, F. C. Antagonistic interactions between garden yeasts and microfungus garden pathogens of leaf-cutting ants. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdã, v. 96, n. 3, p. 331-342, 2009.

RODRIGUES, A.; MUELLER, U. G.; ISHAK, H. D. BACCI JR M.; PAGNOCCA, F. C. Ecology of microfungus communities in gardens of fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae): a year-long survey of three species of attine ants in Central Texas, **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdã, v. 78, n. 2, p. 244-255, 2011.

RODRIGUES, A.; PASSARINI, M. R Z.; FERRO, M.; NAGAMOTO, N. S.; FORTI, L. C.; MAURÍCIO BACCI Jr., M.; SETTE, L. D.; PAGNOCCA, F. C. Fungal communities in the garden chamber soils of leaf-cutting ants. **Journal of Basic Microbiology**, Berlim, 2013. DOI 10.1002/jobm.201200458

ROJAS, J. D. **Prospecção de genes biossintéticos de policetídeos a partir de fungos isolados de cana de açúcar.** 2010. Tese (Doutorado em Interunidades em Biotecnologia) –Instituto Butatã, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

ROMBOUTS, F. M.; PILNIK, W. Pectic enzymes. In: ROSE A. H. (ed.). **Microbial Enzymes and Bioconversions**. London: Academic Press, v. 5, 1980, p. 227-272.

RØNHEDE, S.; BOOMSMA, J. J.; ROSENDAHL, S. Fungal enzymes transferred by leaf-cutting ants in their fungus gardens. **Mycological Research**, Oxford, v. 108, n. 1, p. 101-106, 2004.

SAVOIE, J. M.; MATA, G. The antagonistic action of *Trichoderma* sp. hyphae to *Lentinula edodes* hyphae changes lignocellulolytic activities during cultivation in wheat straw. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 15, n. 3, p.369-373, 1999.

SAMSON, R. A.; FRISVAD, J. C. *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes, mycotoxins and other extrolites. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 49, p. 1-251, 2004.

SEMENOVA, T. A.; HUGHES, D. P.; BOOMSMA, J. J.; SCHIØTT, M. Evolutionary patterns of proteinase activity in *Attine* ant fungus gardens. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 15, 2011. doi:10.1186/1471-2180-11-15.

SCHIØTT, M., HENRIK; DE FINE LICHT, H., LANGE, L.; BOOMSMA, J. J. Towards a molecular understanding of symbiont function: Identification of a fungal gene for the degradation of xylan in the fungus gardens of leaf-cutting ants. **BMC Microbiology**, v. 8, n. 40, 2008. 10.1186/1471-2180-8-40.

SCHIØTT, M., ROGOWSKA-WRZESINSKA, A.; ROEPSTORFF, P.; BOOMSMA, J. J. Leaf-cutting ant fungi produce cell wall degrading pectinase complexes reminiscent of phytopathogenic fungi. **BCM Biology**, v. 8, n. 156, 2010, doi:10.1186/1741-7007-8-156

SCHMIDT, E. W. Trading molecules and tracking targets in symbiotic interactions, **Nature Chemical Biology**, Nova Iorque, v. 4, n. 8, p. 466 – 473, 2008.

SCHULTZ, T. R.; MEIER, R. A phylogenetic analysis of the fungus-growing ants (Formicidae: Attini) based on morphological characters of the larvae. **Systematic Entomology**, Oxford, v. 20, n. 4, p. 337–370, 1995.

SCHULTZ, T. R.; BRADY, S. G. Major evolutionary transitions in ant agriculture. **Proceeding of the National Academy of Sciences United States of America**, Washington, v. 105, n. 14, p. 5435-54401, 2008.

SCOTT, J. J.; OH, D. C.; YUCEER, M. C.; KLEPZIG, K. D.; CLARDY, J.; CURRIE, C. R. Bacterial protection of beetle-fungus mutualism. **Science**, Washington, v. 322, n. 5898, p. 63, 2008.

SILVA, R.; MARTINS, E. S.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by-products. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, p. 318-324, 2002.

SILVA, A.; BACCI, M. Jr.; SIQUEIRA, C. G.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A. Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 4, n. 49, p. 307-313, 2003.

SILVA, A. D. S. **Produção e caracterização de enzimas celulásicas por *Aspergillus phoenicis***. 2008. 105 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

SILVA, A.; RODRIGUES, A.; BACCI, M. Jr.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C. Susceptibility of ant-cultivated fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Agaricales: Basidiomycota) towards microfungi. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 132, n. 2, p. 115-119, 2006a.

SILVA, A.; BACCI, M. Jr.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A. Starch metabolism in *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. **Microbiological Research**, Jena v. 161, n.4, p. 299-303, 2006b.

SILVA, A.; BACCI, M. Jr.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A. Production of polysaccharidases in different carbon sources by *Leucoagaricus gongylophorus* Möller (Singer), the Symbiotic Fungus of the Leaf-Cutting Ant *Atta sexdens* Linnaeus. **Current Microbiology**, Springer Verlag, v. 1, n. 53, p. 68-71, 2006c.

SINGER, R. **The Agaricales in modern taxonomy**. 4th ed. Koeltz Scientific Books: Germany, p. 981. 1986.

SIQUEIRA, C.G.; BACCI, M., Jr.; PAGNOCCA, F.C.; BUENO, O.C.; HEBLING, M.J.A. Metabolism of plant polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 64, n. 12, p. 4820–4822, 1998.

SOSA-CALVO, J.; SCHULTZ, T. R.; BRANDÃO, C. R. F.; KLINGENBERG, C.; FEITOSA, R. M.; RABELING, C.; BACCI, M.; LOPES, C. T.; VASCONCELOS, H. L. *Cyatta abscondita*: taxonomy, evolution, and natural history of a new fungus-farming ant genus from Brazil. **PLoS ONE**, v.8, n.11, 2013.

SUEN, G.; SCOTT, J.J.; AYLWARD, F.O.; ADAMS, S.M.; TRINGE, S.G.; PINTO-TOMÁS, A.A.; FOSTER, C.E.; PAULY, M.; WEIMER, P.J.; BARRY, K.W.; GOODWIN, L. A.; LI, L.; OSTERBERGER, J.; HARKINS, T. T.; SLATER, S. C.; DONOHUE, T. J.; CURRIE, C. R. An insect herbivore microbiome with high plant biomass-degrading capacity. **PloS Genetics**, v. 7, n. 2, 2010. doi:10.1371/journal.pgen.1001129

TAUBES, G. The bacteria fight back. **Science**, Washington, v. 321: n. 5887, p. 356–361, 2008.

TERRASAN, C. R. F. Xilanases, β -xilosidases de *Penicillium janczewskii*: purificação, caracterização e aplicação no branqueamento da polpa celulósica e para ração animal. 2011. 31f. tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2011.

WANG, Y.; MUELLER, U. G.; CLARDY, J. Antifungal diketopiperazines from symbiotic fungus of fungus-growing ant *Cyphomyrmex minutes*. **Journal of Chemical Ecology**, Nova Iorque, v. 25, n. 4, p. 935-41, 1999.

WATANABE, T. **Pictorial atlas of soil and seed fungi morphologies of cultured fungi and key to species**. 2ed. Londres, UK: CRC Press, 2002.

WEBER, N. A. **Gardening ants: The Attines**. Philadelphia: American Philosophical Society, v. 92, 1972. 146 p.

WOOD, T. M. The cellulose of *Fusarium solani*: Purification and specificity, of the β -(1→4) glucanase and the β -D-glucosidase components. **The Biochemical Journal**, Londres, v. 121, p. 353 – 362, 1971.

ZHANG, P. Y.H.; HIMMEL, M. E.; JONATHAN R. MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, Nova Iorque, v. 24, n. 5, p. 452–481, 2006.

ZUCCHI, T. D.; GUIDOLIN, A. S.; CÔNSOLI, F. L. Isolation and characterization actinobacteria ecto symbionts from *Acromymex subterraneus brunneus* (Hymenoptera: Formicidae). **Microbiological Research**, Jena, v. 166, n. 1, p. 68-76, 2011.

APÊNDICE

Apêndice 1 – Identificação dos fungos agrupados por identificação polifásica (utilizando marcadores morfológicos e moleculares; PEREIRA, 2014)

Identificação final	Identificação morfológica	Identificação molecular - Região ITS							Número de isolados (n)
		NCBI-GenBank ¹				CBS ¹			
		pb ²	% ³	n. acesso ⁴	Espécie	%	n. acesso	Espécie	
Zygomycota									
<i>Absidia</i> sp.	<i>Absidia</i> sp.	-	nd ⁵	-	-	-	-	-	1
<i>Cunninghamella</i> sp.	<i>Cunninghamella</i> sp.	-	nd	-	-	-	-	-	1
<i>Mucor</i> sp.	<i>Mucor</i> sp.	-	nd	-	-	-	-	-	1
Ascomycota									
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Acremonium</i> sp.	572	100	JN207340	<i>Acremonium</i> sp.	100	CBS 233.70	<i>Acremonium alternatum</i>	1
<i>Alternaria</i> sp.	<i>Alternaria</i> sp.	551	99	HQ263343	<i>Alternaria alternata</i>	99,	CBS 118809	<i>Alternaria alstroemeriae</i>	1
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus</i> sp.	583	99	HQ026746	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	CBS 133.61	<i>Aspergillus fumigatus</i>	2
<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.	551	99	AY373868	<i>Aspergillus sydowii</i>	99,8	CBS 128131	<i>Aspergillus sydowii</i>	1
<i>Beltrania rhombica</i>	FNE ⁵	577	98	GU797390	<i>Beltrania rhombica</i>	98,6	CBS 123.58	<i>Beltrania rhombica</i>	1
<i>Bionectria ochroleuca</i>	<i>Gliocladium</i> sp.	551	99	HQ607832	<i>Bionectria ochroleuca</i>	99,6	ATT017	<i>Bionectria ochroleuca</i>	2
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Cladosporium</i> sp.	532	100	AF393702	<i>Cladosporium gossypicola</i>	100	CBS 674.82	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	3
<i>Cladosporium flabelliforme</i>	<i>Cladosporium</i> sp.	532	100	AY463364	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	100	CBS 126345	<i>Cladosporium flabelliforme</i>	1
<i>Cladosporium perangustum</i>	<i>Cladosporium</i> sp.	531	100	AY463364	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	100	CBS 126364	<i>Cladosporium perangustum</i>	10
<i>Cladosporium</i> sp.2	<i>Cladosporium</i> sp.	533	100	KC585406	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	100	DTO 109-E9	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	4
<i>Cladosporium</i> sp.3	<i>Cladosporium</i> sp.	533	100	KC585406	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	100	DTO 109-E9	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	2
<i>Colletotrichum</i> sp. 1	<i>Colletotrichum</i> sp. 1	566	99	FJ810513	<i>Glomerella acutata</i>	100	CBS 129821	<i>Colletotrichum</i> sp.	3
<i>Colletotrichum</i> sp. 2	<i>Colletotrichum</i> sp. 2	556	99	JX010186	<i>Colletotrichum queenslandicum</i>	100	CBS 112983	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	1
<i>Colletotrichum</i> sp. 3	<i>Colletotrichum</i> sp. 3	566	100	JX519219	<i>Colletotrichum paspali</i>	97,4	CBS 125086	<i>Colletotrichum navitas</i>	1
<i>Curvularia</i> sp.1	FNE	508	99	GU073102	<i>Curvularia intermedia</i>	99,6	FMR 11510	<i>Curvularia intermedia</i>	1
<i>Curvularia</i> sp.2	<i>Curvularia</i> sp.	557	99	JQ885447	<i>Cochliobolus lunatus</i>	99,3	CBS 294.61	<i>Curvularia lunata</i>	2
<i>Curvularia</i> sp. 3	<i>Curvularia</i> sp. 2	569	99	JQ936099	<i>Cochliobolus sativus</i>	98,9	CBS 127.088	<i>Bipolaris gossypina</i>	1
<i>Curvularia</i> sp. 4	<i>Curvularia</i> sp. 3	571	100	JN943416	<i>Cochliobolus geniculatus</i>	100	CBS 164.60	<i>Curvularia fallax</i>	2
<i>Curvularia trifolii</i>	<i>Curvularia</i> sp. 1	587	99	JN712458	<i>Curvularia trifolii</i>	99,4	CBS 156.35	<i>Curvularia pallescens</i>	3

Apêndice 1. (continuação)

Identificação final	Identificação morfológica	Identificação molecular - Região ITS							Número de isolados (n)
		NCBI-GenBank ¹				CBS ¹			
		pb ²	% ³	n. acesso ⁴	Espécie	%	n. acesso	Espécie	
<i>Cytospora variostromatica</i>	FNE	592	97	DQ243798	<i>Cytospora variostromatica</i>	96,8	CBS 118564	<i>Cytospora variostromatica</i>	2
<i>Cytospora eucalypticola</i>	FNE	589	99	DQ923539	<i>Valsa fabianae</i>	98,7	CBS122689	<i>Cytospora eucalypticola</i>	1
<i>Cytospora</i> sp.	FNE	575	99	DQ243804	<i>Cytospora acaciae</i>	94,1	CBS 116854	<i>Cytospora nitschkei</i>	1
<i>Discosia</i> sp.	FNE	570	99	AB594783	<i>Discosia</i> sp.	95,4	CBS 173.65	<i>Robillarda sessilis</i>	2
<i>Dothideomyces</i> sp.	FNE	539	96	JQ760325	<i>Dothideomyces</i> sp.	95,6	-	<i>Dothideomyces</i> sp.	11
<i>Drechslera micropus</i>	FNE	580	99	HM997113	<i>Dothideomyces</i>	99,6	CBS 127235	<i>Drechslera micropus</i>	9
<i>Epicoccum nigrum</i>	<i>Epicoccum nigrum</i>	527	99	FJ424241	<i>Epicoccum nigrum</i>	99,5	CBS 396.84	<i>Epicoccum nigrum</i>	2
<i>Epicoccum sorghi</i>	FNE	516	99	KC106717	<i>Epicoccum sorghi</i>	99,6	CBS 301.89	<i>Epicoccum sorghi</i>	1
<i>Eutypella</i> sp.1	FNE	572	98	EU088364	<i>Eutypella</i> sp.	98	CBMAI 860	<i>Eutypella</i> sp.	1
<i>Fusarium equiseti</i>	<i>Fusarium</i> sp.	528	100	GQ505694	<i>Fusarium equiseti</i>	100	NRRL 34034	<i>Fusarium incarnatum-equiseti</i>	3
<i>Fusarium oxysporum</i> species complex	<i>Fusarium</i> sp.	526	100	HQ651161	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	CBS 220.49	<i>Fusarium oxysporum</i>	1
<i>Fusarium solani</i> species complex	<i>Fusarium solani</i>	550	100	FJ345352	<i>Fusarium solani</i>	100	NRRL 46685	<i>Fusarium solani</i>	3
<i>Geomyces</i> sp.	FNE	542	94	GU222395	<i>Geomyces pannorum</i>	95,5	-	<i>Geomyces pannorum</i>	3
<i>Guignardia</i> sp.	FNE	619	99	JQ743587	<i>Guignardia mangiferae</i>	100	CBS 373.54	<i>Guignardia philoprina</i>	2
<i>Mycosphaerella</i> sp.1	FNE	514	99	EU167579	<i>Mycosphaerella crystallina</i>	99,8	CBS 120741	<i>Mycosphaerella heimii</i>	2
<i>Mycosphaerella</i> sp.2	FNE	514	99	EU167579	<i>Mycosphaerella crystallina</i>	99,8	CBS 120741	<i>Mycosphaerella heimii</i>	1
<i>Mycosphaerella</i> sp. 3	FNE	528	99	DQ303083	<i>Pseudocercospora</i> sp.	99,8	CBS 111373	<i>Pseudocercospora</i> sp.	6
<i>Neofusicoccum eucalyptorum</i>	FNE	559	100	EU860376	<i>Neofusicoccum eucalyptorum</i>	98,9	CBS 115679	<i>Botryosphaeria eucalyptorum</i>	1
<i>Neofusicoccum parvum</i>	FNE	561	99	EU650672	<i>Neofusicoccum parvum</i>	99,8	CBS 121486	<i>Neofusicoccum parvum</i>	3
<i>Nigrospora oryzae</i>	FNE	539	98	DQ219433	<i>Nigrospora oryzae</i>	98,5	CBS 480.73	<i>Nigrospora oryzae</i>	2
<i>Nigrospora</i> sp.	FNE	532	88	JQ026216	<i>Nigrospora</i> sp.	84,9	DTO 115-H5	<i>Nigrospora oryzae</i>	2
<i>Oidiodendron</i> sp.	FNE	441	99	AF307773	<i>Oidiodendron tenuissimum</i>	100	CBS 114896	<i>Oidiodendron setiferum</i>	1
<i>Paecilomyces</i> sp.	<i>Paecilomyces</i> sp.	575	90	JN899328	<i>Talaromyces purpureus</i>	90	CBS 475.71	<i>Talaromyces purpureus</i>	3

Apêndice 1. (continuação)

Identificação final	Identificação morfológica	Identificação molecular - Região ITS							Número de isolados (n)
		NCBI-GenBank ¹				CBS ¹			
		pb ²	% ³	n. acesso ⁴	Espécie	%	n. acesso	Espécie	
<i>Paraphaeosphaeria michotii</i>	FNE	566	99	HQ630993	<i>Paraphaeosphaeria michotii</i>	99,8	CBS 591.73	<i>Paraphaeosphaeria michotii</i>	1
<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Penicillium</i> sp.	536	99	FJ466705	<i>Penicillium citrinum</i>	100	CBS 252.55	<i>Penicillium citrinum</i>	20
<i>Penicillium</i> sp. 1	<i>Penicillium</i> sp. 1	560	99	JN686455	<i>Penicillium</i> sp.	97,4	CBS 287.36	<i>Penicillium sclerotiorum</i>	2
<i>Penicillium</i> sp. 2	<i>Penicillium</i> sp. 2	562	99	HQ607919	<i>Penicillium verruculosum</i>	99	CBS 321.48	<i>Penicillium primulinum</i>	3
<i>Penicillium</i> sp. 3	<i>Penicillium</i> sp. 3	562	99	JX965247	<i>Talaromyces amestolkiae</i>	99	CBS 101965	<i>Talaromyces purpurogenus</i>	2
<i>Penicillium</i> sp.4	<i>Penicillium</i> sp.4	468	99	HQ149324	<i>Penicillium calidicanium</i>	98,7	CBS 322.48	<i>Penicillium duclauxii</i>	1
<i>Penicillium</i> sp. 5	<i>Penicillium</i> sp. 5	569	98	AY373921	<i>Penicillium janthinellum</i>	99,2	CBS 447.74	<i>Eupenicillium javanicum</i>	1
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	588	99	AF409994	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	99	-	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	2
<i>Phaeomoniella</i> sp.	FNE	595	96	JN628143	<i>Phaeomoniella</i> sp.	-	-	-	1
<i>Phaeosphaeria herpotrichoides</i>	FNE	569	98	AJ608969	<i>Leptosphaeria</i> sp.	98,4	CBS-387.86	<i>Phaeosphaeria herpotrichoides</i>	2
<i>Phaeosphaeria</i> sp.1	FNE	483	95	JF449863	Uncultured <i>Pleosporales</i>	96,3	CBS 120248	<i>Phaeosphaeria brevispora</i>	1
<i>Phaeosphaeria</i> sp.2	FNE	568	100	AJ496628	<i>Septoria arundinacea</i>	100	CBS 578.86	<i>Phaeosphaeria phragmitis</i>	1
<i>Phaeosphaeriopsis</i> sp.	FNE	529	99	JQ936272	<i>Phaeosphaeriopsis</i> sp.	99,8	MPB17A	<i>Phaeosphaeriopsis</i> sp.	1
<i>Phanerochaete</i> sp.	FNE	621	98	AF475150	<i>Phanerochaete sordida</i>	100	CBS 109679	<i>Ganoderma tornatum</i>	4
<i>Phoma</i> sp.	FNE	523	99	EU167565	<i>Peyronellaea pinodella</i>	99,5	CBS 346.82	<i>Phoma dimorpha</i>	2
<i>Phomopsis</i> sp.1	FNE	559	99	JN153070	<i>Phomopsis</i> sp.	97,1	CBS 127270	<i>Diaporthe novem</i>	3
<i>Phomopsis</i> sp.2	FNE	558	97	JN153056	<i>Phomopsis</i> sp.	96,6	CBS 123208	<i>Diaporthe foeniculacea</i>	2
<i>Phomopsis</i> sp.3	FNE	559	99	KC343164	<i>Diaporthe oxe</i>	96,9	CBS 127270	<i>Diaporthe novem</i>	1
<i>Phomopsis</i> sp.4	FNE	562	100	JN153062	<i>Phomopsis</i> sp.	95,5	CBS 123208	<i>Diaporthe foeniculacea</i>	3
<i>Phomopsis</i> sp.5	FNE	557	99	GQ370368	<i>Phomopsis</i> sp.	97,8	CBS 127270	<i>Diaporthe novem</i>	1
<i>Phomopsis</i> sp.6	FNE	560	99	JN153053	<i>Phomopsis</i> sp.	99	CBS 117016	<i>Phomopsis longicolla</i>	1
<i>Preussia</i> sp. 1	<i>Preussia</i> sp. 1	524	99	HQ607898	<i>Preussia</i> sp.	99,6	UFMGCB 5026	<i>Preussia</i> sp.	6
<i>Preussia</i> sp. 2	<i>Preussia</i> sp. 2	541	100	HQ607926	<i>Preussia</i> sp.	97,9	CBS 117680	<i>Preussia persica</i>	1

Apêndice 1. (continuação)

Identificação final	Identificação morfológica	Identificação molecular - Região ITS							Número de isolados (n)
		NCBI-GenBank ¹				CBS ¹			
		pb ²	% ³	n. acesso ⁴	Espécie	%	n. acesso	Espécie	
<i>Preussia</i> sp. 3	<i>Preussia</i> sp. 3	568	90	GQ203765	<i>Preussia terricola</i>	91,9	CBS 117679	<i>Preussia polymorpha</i>	1
<i>Pseudoplagiostoma</i> sp.	FNE	588	99	GU973533	<i>Pseudoplagiostoma eucalypti</i>	99	CBS 115722	<i>Pseudoplagiostoma oldii</i>	1
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	577	100	HQ842837	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	99	CBS 100379	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	4
<i>Robillarda</i> sp.	FNE	570	93	FJ825373	<i>Robillarda sessilis</i>	93	-	<i>Robillarda sessilis</i>	2
<i>Setophoma chromolaena</i>	-	571	98	KF251244	<i>Setophoma chromolaena</i>	97,7	CBS 135105	<i>Setophoma chromolaena</i>	2
<i>Sordariomyces</i> sp. 1	FNE	528	99	JQ761926	<i>Sordariomyces</i> sp.	99,8	-	<i>Sordariomyces</i> sp.	1
<i>Spegazzinia</i> sp.	<i>Spegazzinia</i> sp.	558	100	JQ673429	<i>Spegazzinia tessarthra</i>	92,8	CBS 361.58	<i>Spegazzinia lobulata</i>	1
<i>Tetraplophaeria</i> sp.	FNE	536	100	HQ607877	<i>Ascomycota</i> sp.	100	-	<i>Ascomycota</i> sp.	1
<i>Trichoderma deliquescens</i>	<i>Trichoderma</i> sp.	597	-	-	-	-	-	-	2
<i>Trichoderma hamatum</i>	<i>Trichoderma</i> sp.	582	-	-	-	-	-	-	2
<i>Trichoderma spirale</i>	<i>Trichoderma</i> sp.	592	-	-	-	-	-	-	17
<i>Trichoderma</i> sp.1	<i>Trichoderma</i> sp.	587	-	-	-	-	-	-	1
<i>Xylaria</i> sp. 1	<i>Xylaria</i> sp. 1	594	97	DQ139271	<i>Xylaria</i> sp.	84,1	CBS 126417	<i>Xylaria hypoxylon</i>	1
<i>Xylaria</i> sp. 2	<i>Xylaria</i> sp. 2	569	88	JQ327861	<i>Xylaria berteri</i>	85	CBS 724.69	<i>Xylaria cornu-damae</i>	1
<i>Ascomycota</i> não identificado 1	FNE	576	91	EU167593	<i>Dothidea muelleri</i>	89,6	CBS 238.66	<i>Kabatina thujae</i>	1
<i>Ascomycota</i> não identificado 2	FNE	575	99	JQ418348	<i>Microsphaeropsis arundinis</i>	99	CBS 972.95	<i>Paraconiothyrium cyclothyrioides</i>	1
<i>Ascomycota</i> não identificado 3	FNE	529	92	AF502625	<i>Ascomycetes</i>	95,9	CBS 368.94	<i>Arthopyrenia salicis</i>	1
Basidiomycota									
<i>Agaricus fiardii</i>	FNE	557	100	JF797196	<i>Agaricus</i> sp.	97,2	CBS 284.94	<i>Agaricus fiardii</i>	1
<i>Ceriporiopsis</i> sp.	FNE	612	91	FJ545252	<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	89,3	CBS 347.63	<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	1
<i>Grammothele</i> sp.	FNE	627	95	JN411113	<i>Grammothele denticulata</i>	94,6	-	<i>Grammothele denticulata</i>	1
<i>Oudemansiella canarii</i>	FNE	626	98	HQ534101	<i>Oudemansiella canarii</i>	99,6	-	<i>Oudemansiella canarii</i>	1
<i>Peniophora crassitunicata</i>	FNE	619	99	GU388305	<i>Peniophora</i> sp.	96,2	CBS 663.91	<i>Peniophora crassitunicata</i>	1

Apêndice 1. (continuação)

Identificação final	Identificação morfológica	Identificação molecular - Região ITS							Número de isolados (n)
		NCBI-GenBank ¹				CBS ¹			
		pb ²	% ³	n. acesso ⁴	Espécie	%	n. acesso	Espécie	
<i>Phlebia</i> sp.	FNE	628	99	HQ248220	<i>Basidiomycota</i> sp.	99	-	<i>Basidiomycota</i> sp.	3
<i>Phlebia subserialis</i>	FNE	638	98	HQ377286	<i>Phlebia subserialis</i>	97,9	UFMGCB 1883	<i>Phlebia subserialis</i>	1
<i>Polyporales</i> 1	FNE	618	99	GQ999369	<i>Flavodon flavus</i>	99,6	-	<i>Flavodon flavus</i>	1
<i>Trametes hirsuta</i>	FNE	609	99	JX861099	<i>Trametes hirsuta</i>	98,5	CBS 282.73	<i>Trametes hirsuta</i>	2
<i>Trichosporon chiarellii</i>	<i>Trichosporon chiarellii</i>	512	100	HQ999971	<i>Trichosporon chiarellii</i>	99,4	CBS 111.77	<i>Trichosporon chiarellii</i>	13
<i>Basidiomycota</i> não identificado 1	FNE	620	98	JN882337	<i>Schizophyllum commune</i>	99	CBS 250.69	<i>Trametes maxima</i>	1

¹ NCBI- GenBank e CBS – bancos de sequências de DNA de acesso público.

² pares de bases das sequências obtidas.

³ Similaridade (em %) das sequências comparadas com os bancos de dados.

⁴ Número de acesso das sequências dos bancos de dados consultados.

⁵ Fungos que não apresentaram esporulação.

Apêndice 2. Perfil metabólico de fungos isolados de duas espécies de formigas cortadeiras (*Atta capiguara* e *Atta sexdens rubropilosa*) em relação a produção de polissacaridases (amilase, celulase, polimetilgalacturonase, poligalacturonase e xilanase).

Código ²	Identificação ³	Enzimas ⁴				
		Am	Cel	Pec	Pol	Xil
Ninho: JSP120410-01¹						
JSP01.A.1.1	<i>Penicillium citrinum</i>	-	+	+	+	+
JSP01.A.1.2	<i>Beltrania rhombica</i>	-	+	+	+	+
JSP01.A.1.3	<i>Cladosporium</i> sp.3	-	W	+	-	W
JSP01.A.2.1	<i>Trichoderma spirale</i>	-	+	+	+	-
JSP01.A.2.2	<i>Penicillium citrinum</i>	-	W	-	-	W
JSP01.A.2.3	<i>Penicillium</i> sp. 1	-	W	+	-	+
JSP01.A.2.4	<i>Penicillium citrinum</i>	-	+	+	+	+
JSP01.A.2.5	<i>Penicillium</i> sp. 2	-	+	+	-	W
JSP01.A.3.1	<i>Geomyces</i> sp.	-	W	-	-	+
JSP01.A.3.2	<i>Penicillium</i> sp. 1	-	-	-	+	W
JSP01.A.3.4	<i>Phaeosphaeria</i> sp.2	-	W	+	-	-
JSP01.A.4.1	<i>Drechslera micropus</i>	-	W	+	-	W
JSP01.A.4.2	<i>Dothideomycetes</i> sp.	-	+	+	+	-
JSP01.A.4.5	<i>Phaeosphaeriopsis</i> sp.	-	+	+	-	-
JSP01.A.5.1	<i>Penicillium citrinum</i>	-	-	+	+	-
JSP01.A.5.2	<i>Penicillium citrinum</i>	-	+	-	-	+
JSP01.A.5.3	<i>Dothideomycetes</i> sp.	-	+	+	-	-
JSP01.B.1.1	<i>Trichoderma spirale</i>	-	+	+	-	+
JSP01.B.1.2	<i>Trichoderma spirale</i>	-	+	-	-	W
JSP01.B.1.3	<i>Nigrospora</i> sp.	-	W	+	-	-
JSP01.B.1.4	<i>Cladosporium perangustum</i>	-	W	-	-	+
JSP01.B.2.1	<i>Curvularia</i> sp.1	-	+	-	+	+
JSP01.B.2.2	<i>Penicillium</i> sp. 2	-	w	+	+	+
JSP01.B.2.3	<i>Curvularia</i> sp. 3	-	w	-	+	+
JSP01.B.3.1	<i>Dothideomycetes</i> sp.	-	+	+	-	+
JSP01.B.3.2	<i>Phanerochaete</i> sp.	-	-	-	-	-
JSP01.B.4.1	<i>Dothideomycetes</i> sp.	-	+	-	-	+
JSP01.B.4.2	<i>Dothideomycetes</i> sp.	-	+	+	-	-
JSP01.B.4.3	<i>Dothideomycetes</i> sp.	-	+	+	-	+
JSP01.B.5.2	<i>Agaricus fiardii</i>	-	-	-	-	-
JSP01.C.1.1	<i>Drechslera micropus</i>	-	+	+	-	+
JSP01.C.1.2	<i>Phlebia</i> sp.	-	-	-	-	+
JSP01.C.2.1	<i>Penicillium citrinum</i>	-	-	+	+	-
JSP01.C.3.1	<i>Drechslera micropus</i>	-	+	-	-	+
JSP01.C.3.2	<i>Penicillium</i> sp. 3	-	+	-	-	-
JSP01.C.4.1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	+	+	-	+
JSP01.C.5.1	<i>Trichoderma spirale</i>	-	w	-	-	+
JSP01.C.5.2	<i>Trichoderma spirale</i>	-	-	+	-	+
JSP01.C.5.3	<i>Phlebia subserialis</i>	-	-	+	-	-

Apêndice 2. (continuação)

Código ²	Identificação ³	Enzimas ⁴				
		Am	Cel	Pec	Pol	Xil
Ninho: JSP1204-02						
JSP02.A.1.1	<i>Basidiomycota</i> não identificado 1	-	-	+	-	+
JSP02.A.1.2	<i>Mycosphaerella</i> sp. 3	-	-	+	-	-
JSP02.A.1.3	<i>Mycosphaerella</i> sp. 3	-	-	+	-	+
JSP02.A.2.1	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	-	+	+	-	+
JSP02.A.2.2	<i>Penicillium citrinum</i>	-	+	-	-	+
JSP02.A.2.3	<i>Penicillium citrinum</i>	-	+	+	-	+
JSP02.A.4.1	<i>Drechslera micropus</i>	-	+	-	-	+
JSP02.A.4.3	<i>Dothideomyces</i> sp.	-	-	+	-	-
JSP02.A.5.1	<i>Peniophora crassitunicata</i>	-	+	+	-	+
JSP02.B.3.1	<i>Cytospora</i> sp.	-	+	-	+	+
JSP02.B.4.1	<i>Drechslera micropus</i>	-	-	+	-	w
JSP02.B.4.2	<i>Dothideomyces</i> sp.	-	-	+	+	w
JSP02.B.5.1	<i>Curvularia</i> sp. 4	-	w	-	+	-
JSP02.B.5.2	<i>Xylaria</i> sp. 1	-	+	+	-	+
JSP02.C.1.1	<i>Cladosporium perangustum</i>	-	+	+	-	+
JSP02.C.1.2	<i>Spegazzinia</i> sp.	-	-	+	-	w
JSP02.C.1.3	<i>Phanerochaete</i> sp.	-	+	-	-	+
JSP02.C.1.4	<i>Penicillium</i> sp.4	-	+	+	-	+
JSP02.C.2.1	<i>Oudemansiella canarii</i>	-	-	+	-	+
JSP02.C.2.2	<i>Cladosporium</i> sp.2	-	+	+	-	-
JSP02.C.2.5	<i>Ceriporiopsis</i> sp.	-	-	+	-	+
JSP02.C.3.1	<i>Epicoccum sorghi</i>	-	w	+	-	-
JSP02.C.3.2	<i>Dothideomyces</i> sp.	-	+	+	+	+
JSP02.C.3.3	<i>Phomopsis</i> sp.4	-	+	+	-	+
JSP02.C.4.1	<i>Cladosporium</i> sp.2	-	+	+	-	+
JSP02.C.5.1	<i>Cladosporium perangustum</i>	-	+	+	+	-
JSP02.C.5.2	<i>Fusarium equiseti</i>	-	+	-	-	-
JSP02.C.5.3	<i>Cladosporium</i> sp.2	-	+	+	+	w
Ninho: JSP120410-03						
JSP03.A.1.1	<i>Trametes hirsuta</i>	-	-	+	-	+
JSP03.A.1.2	<i>Cladosporium perangustum</i>	-	+	+	-	-
JSP03.A.1.3	<i>Cytospora eucalypticola</i>	-	w	+	-	+
JSP03.A.1.4	<i>Trametes hirsuta</i>	-	w	+	-	+
JSP03.A.1.5	<i>Nigrospora</i> sp.	-	-	+	-	-
JSP03.A.2.1	<i>Cladosporium</i> sp.3	-	+	+	-	-
JSP03.A.2.2	<i>Paraphaeosphaeria michotii</i>	-	+	+	+	-
JSP03.A.2.3	<i>Mycosphaerella</i> sp. 3	-	-	+	-	-
JSP03.A.2.4	<i>Dothideomyces</i> sp.	-	+	+	-	-
JSP03.A.2.5	<i>Penicillium</i> sp. 3	-	+	+	-	-
JSP03.A.3.1	<i>Colletotrichum</i> sp. 3	-	+	+	+	-

Apêndice 2. (continuação)

Código ²	Identificação ³	Enzimas ⁴				
		Am	Cel	Pec	Pol	Xil
JSP03.A.3.4	<i>Drechslera micropus</i>	-	+	-	-	w
JSP03.A.3.5	<i>Grammothele</i> sp.	-	+	+	-	+
JSP03.A.4.4	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	-	+	+	+	+
JSP03.A.5.2	<i>Phlebia</i> sp.	-	-	+	-	+
JSP03.A.5.4	<i>Fusarium solani</i> species complex	-	+	w	+	+
JSP03.A.5.5	<i>Aspergillus fumigates</i>	-	+	+	-	-
JSP03.B.1.1	<i>Cladosporium perangustum</i>	-	+	+	-	-
JSP03.B.1.3	<i>Cladosporium perangustum</i>	-	+	+	-	-
JSP03.B.2.1	<i>Drechslera micropus</i>	-	+	+	-	-
JSP03.B.3.1	<i>Dothideomycetes</i> sp.	-	-	+	-	-
JSP03.B.4.1	<i>Cladosporium perangustum</i>	-	-	+	+	-
JSP03.B.4.2	<i>Penicillium citrinum</i>	-	+	+	-	+
JSP03.B.4.4	<i>Sordariomycetes</i> sp. 1	-	+	+	-	-
JSP03.B.5.1	<i>Cladosporium perangustum</i>	-	+	+	-	-
JSP03.B.5.2	<i>Phaeosphaeria herpotrichoides</i>	-	+	-	-	-
JSP03.B.5.3	<i>Phaeosphaeria herpotrichoides</i>	-	+	+	w	-
JSP03.C.1.1	<i>Drechslera micropus</i>	-	+	+	-	-
JSP03.C.1.2	<i>Phanerochaete</i> sp.	-	-	+	-	+
JSP03.C.2.2	<i>Cladosporium</i> sp.2	-	+	+	-	-
JSP03.C.3.1	<i>Drechslera micropus</i>	-	+	+	-	-
JSP03.C.3.2	<i>Mycosphaerella</i> sp. 3	-	-	-	+	-
JSP03.C.3.3	<i>Cladosporium perangustum</i>	-	+	w	-	+
JSP03.C.4.1	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	-	+	-	-	+
JSP03.C.4.2	<i>Penicillium citrinum</i>	-	+	+	-	+
JSP03.C.4.3	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	-	+	-	-	+
JSP03.C.5.1	<i>Phlebia</i> sp.	-	+	+	+	-
Ninho: JSP120410-04						
JSP04.A.1.4	<i>Penicillium citrinum</i>	-	+	+	-	+
JSP04.A.2.3	<i>Penicillium citrinum</i>	-	-	-	-	+
JSP04.A.5.1	<i>Penicillium citrinum</i>	-	-	-	-	w
JSP04.B.1.1	<i>Curvularia</i> sp.2	-	+	+	-	+
JSP04.B.1.3	<i>Penicillium citrinum</i>	-	+	+	-	+
JSP04.B.3.1	<i>Penicillium citrinum</i>	-	+	+	-	w
JSP04.B.3.5	<i>Curvularia trifolii</i>	-	+	-	-	w
JSP04.B.4.1	<i>Penicillium citrinum</i>	-	+	+	-	+
JSP04.B.4.2	<i>Penicillium</i> sp. 2	-	+	+	-	w
JSP04.C.2.1	<i>Penicillium citrinum</i>	-	+	+	-	+
JSP04.C.3.3	<i>Penicillium citrinum</i>	-	w	+	-	+
JSP04.C.4.3	<i>Penicillium citrinum</i>	-	+	-	-	w
Ninho: JSP120410-05						
JSP05.A.1.1	<i>Cunninghamella</i> sp	-	+	-	-	+

Apêndice 2. (continuação)

Código ²	Identificação ³	Enzimas ⁴				
		Am	Cel	Pec	Pol	Xil
JSP05.A.1.3	<i>Trichosporon chiarellii</i>	-	w	+	-	+
JSP05.A.1.4	<i>Preussia</i> sp. 1	-	+	-	-	-
JSP05.A.2.1	<i>Trichoderma spirale</i>	-	+	+	+	-
JSP05.A.2.2	<i>Trichosporon chiarellii</i>	-	-	-	-	w
JSP05.A.2.5'	<i>Aspergillus</i> sp.	-	+	+	+	w
JSP05.A.4.5	<i>Phomopsis</i> sp.5	-	+	+	-	-
JSP05.B.1.1	<i>Trichoderma deliquescens</i>	-	w	+	-	-
JSP05.B.1.2	<i>Trichoderma spirale</i>	-	w	+	+	w
JSP05.B.1.5	<i>Trichosporon chiarellii</i>	-	-	-	-	-
JSP05.B.2.2	<i>Trichosporon chiarellii</i>	-	-	-	-	-
JSP05.B.2.3	<i>Preussia</i> sp. 2	-	w	-	-	-
JSP05.B.3.1	<i>Trichoderma spirale</i>	-	-	+	-	+
JSP05.B.3.2	<i>Trichosporon chiarellii</i>	-	-	-	-	-
JSP05.B.3.4	<i>Phoma</i> sp.	-	-	-	-	-
JSP05.B.5.1	<i>Trichoderma spirale</i>	-	-	+	-	-
JSP05.C.1.1	<i>Trichosporon chiarellii</i>	-	-	-	-	-
JSP05.C.1.3	<i>Neofusicoccum parvum</i>	-	+	-	+	+
JSP05.C.2.3	<i>Trichoderma spirale</i>	-	+	+	+	-
JSP05.C.4.3	<i>Trichoderma spirale</i>	-	w	-	+	w
JSP05.C.5.3	<i>Trichosporon chiarellii</i>	-	-	-	-	-
JSP05.C.5.4	<i>Trichosporon chiarellii</i>	-	-	-	-	-
JSP05.C.5.5	<i>Fusarium solani</i> species complex	-	+	+	+	+
Ninho: JSP120410-06						
JSP06.A.1.1	<i>Mucor</i> sp.	-	+	-	-	w
JSP06.A.1.2	<i>Phomopsis</i> sp.2	-	+	+	+	-
JSP06.A.2.1	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	-	+	+	+	-
JSP06.A.2.2	<i>Eutypella</i> sp.1	-	+	+	+	+
JSP06.A.4.1	<i>Phomopsis</i> sp.6	-	+	+	-	-
JSP06.A.4.2	<i>Cytospora variostromatica</i>	-	+	-	-	-
JSP06.A.4.4	<i>Colletotrichum</i> sp. 1	-	+	+	+	+
JSP06.A.5.1	<i>Neofusicoccum eucalyptorum-</i>	-	+	+	-	+
JSP06.B.1.5	<i>Setophoma chromolaena</i>	-	w	+	-	-
JSP06.B.2.1	<i>Fusarium equiseti</i>	-	+	-	+	w
JSP06.B.2.2	<i>Curvularia trifolii</i>	-	+	+	-	-
JSP06.B.2.3	<i>Nigrospora oryzae</i>	-	+	-	-	+
JSP06.B.2.4	<i>Guignardia</i> sp.	-	-	+	-	+
JSP06.B.3.1	<i>Phomopsis</i> sp.2	-	+	w	-	w
JSP06.B.3.2	<i>Pseudoplagiostoma</i> sp.	-	+	+	+	w
JSP06.B.3.5	<i>Setophoma chromolaena</i>	-	-	w	-	-
JSP06.B.4.1	<i>Epicoccum nigrum</i>	-	-	+	-	+
JSP06.B.4.2	<i>Fusarium equiseti</i>	-	-	+	-	+

Apêndice 2. (continuação)

Código ²	Identificação ³	Enzimas ⁴				
		Am	Cel	Pec	Pol	Xil
JSP06.B.4.5	<i>Robillarda</i> sp.	-	w	+	+	+
JSP06.B.5.1	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	-	w	w	+	-
JSP06.B.5.2	Ascomycota não identificado 1	-	-	+	+	-
JSP06.B.5.5	<i>Mycosphaerella</i> sp. 3	-	-	w	-	-
JSP06.C.1.1	<i>Bionectria ochroleuca</i>	-	+	+	+	-
JSP06.C.1.2	<i>Preussia</i> sp. 1	-	-	-	-	-
JSP06.C.1.3	<i>Curvularia</i> sp. 4	-	w	+	+	w
JSP06.C.2.1	<i>Colletotrichum</i> sp. 1	-	w	+	+	w
JSP06.C.2.2	<i>Cladosporium perangustum</i>	-	w	+	-	-
JSP06.C.2.5	<i>Tetraplophaeria</i> sp.	-	w	-	-	-
JSP06.C.3.1	Ascomycota não identificado 2	-	+	-	-	-
JSP06.C.4.1	<i>Phomopsis</i> sp.1	-	+	+	+	-
JSP06.C.4.2	<i>Cladosporium cladosporioides</i> .	-	w	-	+	w
JSP06.C.4.3	<i>Acremonium</i> sp.	-	+	-	-	-
JSP06.C.5.1	<i>Colletotrichum</i> sp. 1	-	+	+	+	-
JSP06.C.5.4	<i>Bionectria ochroleuca</i>	-	+	-	+	w
Ninho:						
JSP120410-07						
JSP07.A.1.1	<i>Trichosporon chiarellii</i>	-	-	-	-	-
JSP07.A.1.2	<i>Trichoderma hamatum</i>	-	+	+	+	-
JSP07.A.1.3	<i>Curvularia</i> sp.2	-	w	+	-	+
JSP07.A.1.4	<i>Xylaria</i> sp. 2	-	-	-	+	-
JSP07.A.2.1	<i>Trichoderma spirale</i>	-	+	+	+	+
JSP07.A.4.1	<i>Alternaria</i> sp.	-	w	+	+	-
JSP07.B.1.1	<i>Trichosporon chiarellii</i>	-	-	-	-	-
JSP07.B.2.5	<i>Trichosporon chiarellii</i>	-	-	-	-	-
JSP07.B.3.1	<i>Fusarium solani</i> species complex	-	+	-	-	w
JSP07.C.2.1	<i>Trichosporon chiarellii</i>	-	-	-	-	-
JSP07.C.2.2	<i>Trichosporon chiarellii</i>	-	-	-	-	-
JSP07.C.2.3	<i>Absidia</i> sp.	-	+	-	-	-
JSP07.C.2.4	<i>Cladosporium flabeliforme</i>	-	+	-	-	-
JSP07.C.4.1	<i>Trichoderma hamatum</i>	-	+	+	+	+
JSP07.C.5.1	<i>Mycosphaerella</i> sp.1	-	+	+	-	-
Ninho: JSP120411-01						
JSP01-11.A.1.1	<i>Cytospora variostromatica</i>	-	-	+	+	-
JSP01-11.A.1.3	<i>Neofusicoccum parvum</i>	-	+	+	-	+
JSP01-11.A.2.1	<i>Nigrospora oryzae</i>	-	+	w	+	+
JSP01-11.A.2.2	<i>Geomyces</i> sp.	-	+	+	-	-
JSP01-11.A.2.3	<i>Paecilomyces</i> sp.	-	-	-	-	-
JSP01-11.A.2.5	<i>Mycosphaerella</i> sp. 3	-	-	+	-	-
JSP01-11.A.3.2	<i>Penicillium</i> sp. 5	-	+	+	-	-

Apêndice 2. (continuação)

Código ²	Identificação ³	Enzimas ⁴				
		Am	Cel	Pec	Pol	Xil
JSP01-11.A.3.3	<i>Preussia</i> sp. 3	-	-	+	-	-
JSP01-11.A.3.4	Ascomycota não identificado 3	-	+	+	-	-
JSP01-11.A.4.1	<i>Colletotrichum</i> sp. 2	-	+	-	-	w
JSP01-11.A.4.2	<i>Preussia</i> sp. 1	-	-	+	-	-
JSP01-11.A.4.3	<i>Preussia</i> sp. 1	-	-	+	-	-
JSP01-11.A.5.1	<i>Robillarda</i> sp.	-	-	+	-	w
JSP01-11.A.5.2	<i>Phomopsis</i> sp.4	-	+	+	-	-
JSP01-11.A.5.3	<i>Curvularia trifolii</i>	-	w	-	-	w
JSP01-11.A.5.4	<i>Mycosphaerella</i> sp.1	-	-	w	-	-
JSP01-11.B.1.1	<i>Guignardia</i> sp.	-	-	+	-	+
JSP01-11.B.1.2	<i>Preussia</i> sp. 1	-	+	+	-	-
JSP01-11.B.1.3	<i>Phaeosphaeria</i> sp.1	-	+	+	-	-
JSP01-11.B.1.5	<i>Paecilomyces</i> sp.	-	-	+	-	-
JSP01-11.B.2.1	<i>Trichoderma spirale</i>	-	+	+	+	-
JSP01-11.B.2.2	<i>Preussia</i> sp. 1	-	w	w	-	-
JSP01-11.B.2.4	<i>Phomopsis</i> sp.4	-	+	+	+	-
JSP01-11.B.3.1	<i>Neofusicoccum parvum</i>	-	+	+	-	+
JSP01-11.B.3.2	<i>Phanerochaete</i> sp.	-	w	w	-	w
JSP01-11.B.3.3	<i>Phaeoconiella</i> sp.	-	+	+	-	+
JSP01-11.B.3.4	<i>Mycosphaerella</i> sp.2	-	-	+	-	-
JSP01-11.B.3.5	<i>Oidiodendron</i> sp.	-	+	w	-	w
JSP01-11.B.4.1	<i>Trichoderma spirale</i>	-	+	w	+	w
JSP01-11.B.4.2	<i>Trichoderma spirale</i>	-	+	+	+	+
JSP01-11.B.5.1	<i>Phomopsis</i> sp.3	-	+	+	+	w
JSP01-11.B.5.2	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	-	+	+	-	w
JSP01-11.C.1.1	<i>Trichoderma spirale</i>	-	+	+	+	+
JSP01-11.C.1.2	<i>Trichoderma</i> sp.1	-	+	-	-	-
JSP01-11.C.1.4	<i>Fusarium oxysporum</i> species complex	-	+	-	-	w
JSP01-11.C.2.1	<i>Epicoccum nigrum</i>	-	w	+	+	-
JSP01-11.C.2.2	<i>Phoma</i> sp.	-	-	w	+	-
JSP01-11.C.3.1	<i>Trichoderma spirale</i>	-	+	+	+	+
JSP01-11.C.3.2	<i>Trichoderma spirale</i>	-	+	+	+	-
JSP01-11.C.3.3	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	-	+	+	-	+
JSP01-11.C.3.5	<i>Paecilomyces</i> sp.	-	-	-	-	+
JSP01-11.C.4.1	<i>Phomopsis</i> sp.	-	+	+	-	-
JSP01-11.C.4.2	<i>Discosia</i> sp.	-	-	+	-	w
JSP01-11.C.4.3	<i>Phomopsis</i> sp.1	-	w	+	-	-
JSP01-11.C.5.1	<i>Discosia</i> sp.	-	w	+	-	+
JSP01-11.C.5.3	<i>Geomyces</i> sp.	-	+	+	-	-

¹ Código adotado para identificar os ninhos de onde foram realizados os isolamentos; ² Código adotado para identificar os isolados.

³ Identificação dos isolados obtida através de taxonomia polifásica (morfológica e molecular); ⁴ Sigla utilizada para as enzimas Am: amilase, Cel: celulase, Pec: polimetilgalacturonase, Pol: poligalacturonase e Xil: xilanase. ⁵ -: negativo, +: positivo, w: fraco.