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

**TAXONOMIA E CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS DE
LEVEDURAS ISOLADAS DE BITUS DE *Atta sexdens rubropilosa***

SILVIO LOVATO ARCURI

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).

Rio Claro

2013



SILVIO LOVATO ARCURI

**TAXONOMIA E CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS DE
LEVEDURAS ISOLADAS DE BITUS DE *Atta sexdens rubropilosa***

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

Coorientador: Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca

Rio Claro

2013

595.796 Arcuri, Silvio Lovato
A675t Taxonomia e características metabólicas de leveduras
isoladas de bitus de *Atta sexdens rubropilosa* / Silvio Lovato
Arcuri. - Rio Claro : [s.n.], 2013
85 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: André Rodrigues

Coorientador: Fernando Carlos Pagnocca

1. Formiga. 2. Alados. 3. Jardim de fungo. 4. Attini. 5.
Revoada. I. Título.

Dedico este trabalho à minha mãe, Maria de Lourdes Lovato Arcuri, pelo amor e atenção.

AGRADECIMENTOS

Ao longo do período de dedicação frente às pesquisas de meu mestrado, muitas pessoas surgiram em minha vida e marcaram de alguma maneira meu caminho. Algumas de suma importância que, infelizmente, não convivo mais diretamente e outras que permanecem me ajudando a subir degraus.

Agradeço primeiramente a Deus por me manter forte e confiante.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa Científica (CNPq) pela bolsa de mestrado concedida, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Área: Microbiologia Aplicada) pelo auxílio financeiro concedido para participação em eventos e aos funcionários técnicos-administrativos da pós-graduação.

No caminho que trilhei, duas pessoas especiais foram meus orientadores: Prof. Dr. André Rodrigues e Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca. Além de amigos, me instruíram de forma admirável. Deixo meus agradecimentos ao Prof. André, principalmente, por ter me ensinado muito do que sei, auxiliado e mostrado que pesquisa se faz com carinho e dedicação. Um agradecimento muito especial ao Prof. Fernando pela oportunidade oferecida para trabalhar no laboratório e ter-me incentivado na pesquisa, ser um facilitador e sempre estar disposto a ajudar nos momentos difíceis.

Sou muito grato ao Dr. Vanderlei Martins pelo auxílio no sequenciamento de DNA das amostras. Ao Dr. Nilson Satoru Nagamoto pela colaboração na coleta em Botucatu e ao Prof. Dr. Luis Carlos Forti por ter concedido a estrutura necessária. Ao Sr. José Luís Novelli, proprietário da Fazenda Santana, pela permissão de coleta em sua propriedade.

Agradeço a todos meus amigos do C.E.I.S. pela companhia, risadas e colaboração, principalmente a Necis, Luciana, Sebastião, Olívia, Ita e Marcela. Muito obrigado aos meus amigos da pós-graduação pela ótima convivência.

Sou muito grato por ter convivido com pessoas tão especiais dentro do laboratório de Microbiologia e agradeço aos meus amigos Weilan, Virgínia, Ife, Dirce, Sadala, Samuel, Francisco, Noemi, Ana Paula, Lucas, Lídia, Tássia, Danilo, Rafael, Fábio, Aline, Paula, Tatiana, Thais, Mara, Sandra, Dra. Derlene Attili de Angelis, Melina e Marcela pela companhia, ajuda e amizade.

Agradeço ao Prof. Dr. Odair Correa Bueno e à Profa. Dra. Lara Durães Sette pelas contribuições no exame de qualificação. A todos os alunos e responsáveis pelo Laboratório de Formigas Cortadeiras, Laboratório de Evolução Molecular, Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos, Laboratório de Ecotoxicologia e Comportamento de Abelhas,

Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica, pelo companheirismo e disponibilidade de materiais e equipamentos.

Um muito, mas muito obrigado à minha mãe, Maria de Lourdes, aos meus irmãos Daniel e Joyce por todo o apoio, amor e estrutura que têm me dado e, também ao Fábio, Lorraine e Divina por me fazer lembrar a todo instante de que a família é o bem mais precioso que temos e que não devemos abrir mão por nada.

A Tina, Isadora e Nina, por me fazer lembrar o quanto é gostoso voltar pra casa e ser recebido sempre com muita felicidade.

Para encerrar, gostaria de agradecer a Clara Tavares Lourenço, não somente pela ajuda em todas as etapas de meu trabalho, não somente por permanecer e me apoiar nos momentos difíceis, mas também por preencher minha vida com amor e energias positivas.

[...] e tudo na vida são copos d'água...

(Richard Carlson, 1998)

RESUMO

As formigas cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae: tribo Attini) mantêm um mutualismo com o fungo *Leucoagaricus gongylophorus*, utilizado como alimento por esses insetos. Nos jardins de fungo, as formigas abrigam o fungo mutualista, pupas, larvas, além de uma microbiota composta por bactérias, leveduras e outros fungos. Uma grande quantidade de machos (bitus) e fêmeas aladas (içás) é produzida anualmente em ninhos adultos de formigas do gênero *Atta*. Esses indivíduos deixam os ninhos para acasalarem durante o voo nupcial (revoada), onde provavelmente ocorre a transferência de micro-organismos entre os indivíduos. Neste trabalho, foi avaliado a diversidade de leveduras no integumento de 200 bitus provenientes de dois ninhos de *Atta sexdens rubropilosa*, nas revoadas de 2010 e 2011. Foram isoladas também leveduras do solo dos túneis e do solo adjacente aos ninhos na tentativa de descobrir a origem das leveduras no integumento dos bitus. Buscando entender o papel das leveduras nos ninhos, foi estudada a capacidade de degradação de polímeros vegetais presentes no jardim de fungo e no consumo de açúcares gerados da quebra desses substratos. Um total de 242 estirpes distribuídas em 29 espécies foi recuperado do integumento dos insetos. Bitus do ninho #1 (Rio Claro, SP) apresentaram maior riqueza e diversidade de espécies de leveduras do que bitus do ninho #2 (Botucatu, SP). Embora a riqueza e diversidade tenham variado entre as diferentes amostragens, a estrutura da comunidade foi semelhante, a qual não foi correlacionada com o local de coleta ou o ano em que ocorreram as revoadas. O isolamento de leveduras do solo dos túneis e do solo próximo aos ninhos revelou poucas espécies em comum com aquelas encontradas no integumento dos bitus; o que sugere que a maioria das leveduras presentes nos bitus foi proveniente do jardim de fungo. *Cryptococcus haglerorum* e *Trichosporon chiarellii* foram isoladas dos bitus do ninho #1, indicando uma possível maneira de transmissão dessas leveduras para outros ninhos, visto que tais espécies somente foram encontradas em ninhos de formigas da tribo Attini. A triagem enzimática revelou que das 242 estirpes presentes nos bitus, 50,8% produziram lipase; 43,4% e 42,1% produziram pectinase e poligalacturonase, respectivamente; 37,6% e 36,4% produziram CMCase e xilanases, respectivamente. Embora o gênero *Cryptococcus* foi prevalente nos isolamentos (92 estirpes, compreendendo 10 espécies), *Aureobasidium* sp. (68 isolados distribuídos em duas espécies) foi o que apresentou o maior número de estirpes degradadoras dos polissacarídeos vegetais. Além de auxiliarem na degradação do material vegetal, as leveduras assimilaram glicose (todas as estirpes), celobiose (80,5%), maltose (95,8%) e xilose (93,8%), o que indica que esses micro-organismos podem consumir esses nutrientes presentes no jardim de fungo. Por outro lado, a assimilação de ácido galacturônico (70,6%), composto considerado tóxico às formigas, indica um papel benéfico desses micro-organismos para a simbiose formiga-fungo. Os resultados do presente estudo sugerem que bitus transportam leveduras dos jardins de fungo e que estas podem participar da geração e consumo de nutrientes nos ninhos. Os estudos desse interessante grupo de insetos tem dedicado pouca atenção aos bitus. No entanto, eles podem transmitir micro-organismos para as içás no momento do acasalamento contribuindo com a composição da microbiota inicial do novo ninho.

Palavras-chave: Fungo. Alados. Jardim de fungo. Revoada. Voo nupcial.

ABSTRACT

Leafcutter ants (Hymenoptera: Formicidae: tribe Attini) maintain an obligate mutualism with *Leucoagaricus gongylophorus*, a basidiomycetous fungus cultivated for food. Attine fungus gardens harbor the mutualistic fungus, pupae, larvae and several additional microorganisms such as bacteria, yeasts and filamentous fungi. Annually, several alates are produced in *Atta* nests and leave their nests for the mating flight, when the transmission of microorganisms probably occur between them. Here, we evaluated the yeast diversity found on the integument of 200 males of *Atta sexdens rubropilosa* sampled from two different nests in the mating flights of 2010 and 2011. Yeasts were also isolated from the soil of tunnels and soil adjacent to nests in order to study if yeasts found on males were originated from this environment. In an attempt to understand the role of yeasts in the fungus garden, we study the degradation of plants polymers and the assimilation of sugars generated after hydrolysis of these substrates. A total of 242 strains distributed in 29 species were recovered on the integument of these insects. Males from nest #1 (Rio Claro, SP) showed the highest yeast species richness and diversity in comparison to males from nest #2 (Botucatu, SP). Although species richness and diversity varied between samples, the community structure was similar between nests. Thus, the community structure was not correlated with collection sites or the year when the mating flights occurred. Yeast isolation from soil samples suggested that few species were shared between this type of sample and the yeasts found on the integument of males; this result shows that most yeast species on the integument of males were derived from the fungus garden. *Cryptococcus haglerorum* and *Trichosporon chiarellii* isolated from males of nest #1 (in 2011) indicate a putative transmission mode of these yeasts, since these species were only found in association with attine ants. The enzymatic screening showed that 50.8% out of 242 strains were able to produce lipase; 43.4% and 42.1% produced pectinase and polygalacturonase, respectively; 37.6% and 36.4% produced CMCase and xylanase, respectively. Although the genus *Cryptococcus* was prevalent in the study (92 strains distributed in 10 species), *Aureobasidium* sp. (68 strains distributed in two species) has the greatest number of yeast strains that produced polymerases. In addition to help in the degradation of the plant material, yeasts assimilated glucose (all strains), celobiose (80.5%), maltose (95.8%) and xylose (93.8%) showing that they can consume this nutrients in the fungus gardens. On the other hand, galacturonic acid assimilation (70.6%), a toxic compound to the ants, highlights the importance of these microorganisms in the attine ant-fungus association. The results of this study suggest that males transport yeasts from the fungus garden and such microorganisms can generate and consume nutrients in the fungus gardens. So far, ant males have received little attention in studies regarding the ecology of microbes associated with leafcutter ants. It is possible that males transfer microorganisms to winged females during the mating flight, thus contributing with the start microbiota in incipient nests.

Keywords: Fungi. Alates. Fungus garden. Mating flight.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 Formigas da tribo Attini e a associação com fungos	12
2.2 Voo nupcial e fundação de ninhos no gênero <i>Atta</i>	13
2.3 Micro-organismos associados às formigas da tribo Attini	15
2.4 Leveduras associadas às formigas Attini	17
2.5 Degradação do material vegetal nos jardins de fungo	20
3 CAPÍTULO 1 - TAXONOMY OF YEASTS ISOLATED FROM WINGED MALES OF <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	22
3.1 Introduction	24
3.2 Material and Methods	25
3.2.1 Nest location and sampling	25
3.2.2 Yeast isolation	26
3.2.3 Yeast identification	26
3.2.4 Diversity and community analysis	27
3.3 Results	28
3.3.1 Yeast diversity on alates of <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	28
3.3.2 Yeast species composition	28
3.3.3 Community structure and origin of yeasts on the integument of males	29
3.4 Discussion	29
3.5 References	34
3.6 Supplementary material	43
4 CAPÍTULO 2 - CONTRIBUIÇÃO NA DEGRADAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL NOS JARDINS DE FUNGO POR LEVEDURAS TRANSPORTADAS PELOS BITUS DE <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	51
4.1 Introdução	53
4.2 Material e métodos	54
4.2.1 Origem das estirpes	54
4.2.2 Ensaio enzimáticos	55
4.2.3 Assimilação de fontes de carbono	57
4.2.4 Análise dos dados	57
4.3 Resultados e discussão	57

4.4 Conclusões -----	65
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS -----	66
6 PERSPECTIVAS -----	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	68
APÊNDICE -----	76

1 INTRODUÇÃO

Os gêneros *Atta* e *Acromyrmex* compreendem as formigas cortadeiras, conhecidas pela habilidade de cultivarem o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* como alimento. Essa associação é considerada uma relação de mutualismo, na qual as formigas fornecem substrato vegetal para o cultivo do fungo, o qual, por sua vez, é a principal fonte de alimento para as formigas. A maioria das espécies de formigas cortadeiras cultiva o fungo mutualista no interior de câmaras subterrâneas, em uma estrutura conhecida como “jardim de fungo”. Nesse local, além dos fragmentos de folhas e do micélio do fungo mutualista, podem ser encontradas pupas, larvas e operárias.

Anualmente, ninhos maduros de *Atta sexdens rubropilosa* (com aproximadamente três anos de fundação) se preparam para o acasalamento, evento conhecido como voo nupcial. Um elevado número de indivíduos das castas reprodutivas conhecidas como bitus (machos alados) e içás (fêmeas aladas) é produzido nos ninhos. Em uma determinada época do ano, quando as condições climáticas são favoráveis, bitus e içás deixam os ninhos e se acasalam no céu. Os machos apresentam uma vida efêmera e morrem dias após a cópula; por outro lado, as fêmeas fertilizadas são as responsáveis pela fundação de um novo ninho. Antes de deixarem as colônias de origem, as içás coletam e armazenam em uma cavidade infrabucal, uma porção do jardim de fungo do ninho parental. Esse fragmento é regurgitado durante a fundação do novo ninho e constituirá o início do jardim de fungo da futura colônia.

Diversos estudos indicam que os jardins de fungo das formigas cortadeiras mantêm uma complexa microbiota, incluindo bactérias, fungos filamentosos e leveduras; além do fungo mutualista cultivado pelas formigas. Alguns desses micro-organismos apresentam funções conhecidas na associação formiga-fungo, como é o caso do fungo parasita do gênero *Escovopsis*, somente encontrado nos jardins de fungo desses insetos. No caso das leveduras, poucos estudos exploraram o papel desses micro-organismos na associação. Tais estudos revelaram que as leveduras presentes nos jardins de fungo podem auxiliar na inibição de micro-organismos indesejáveis à cultura do fungo mutualista, bem como auxiliar o fungo na degradação do material vegetal. Assim, esses estudos abriram vários campos na pesquisa para entender a participação das leveduras como simbiossiontes das formigas cortadeiras.

Devido ao curto período de vida dos machos, pouco se conhece, além do caráter reprodutivo, a respeito da possível contribuição na dispersão da microbiota associada aos jardins de fungo. Baseado no fato dos bitus serem criados nos jardins e somente deixarem os ninhos momentos antes do voo nupcial, é possível que a microbiota presente no integumento

desses insetos seja proveniente dos jardins de fungo. Devido os machos entrarem em contato com o corpo das fêmeas durante o acasalamento, é provável que essas leveduras sejam transferidas para as iças. Portanto, é de interesse saber quais leveduras podem ser transportadas pelos bitus e se os componentes dessa microbiota apresentam características que sinalizem para o papel exercido nos ninhos.

O presente trabalho está dividido em três seções. Na primeira seção, apresentamos os aspectos básicos da associação formiga cortadeira-fungo, com ênfase no ciclo reprodutivo das formigas. Também é apresentada uma revisão das pesquisas envolvendo as leveduras encontradas nos jardins de fungo e as hipóteses sobre os possíveis papéis desses micro-organismos.

Na segunda parte (Capítulo 1), o objetivo foi avaliar a composição de leveduras encontradas no integumento dos bitus de *A. sexdens rubropilosa*, uma formiga cortadeira amplamente distribuída no Brasil. Os bitus foram amostrados momentos após deixarem os ninhos de origem. Utilizando método dependente de cultivo e diferentes métodos para avaliar a diversidade de leveduras foi estudada comunidade desses micro-organismos associadas a bitus de dois ninhos, amostrados em duas revoadas consecutivas. A estrutura das comunidades de leveduras entre as amostragens foi analisada, juntamente com a possível origem das leveduras presentes nos corpos dos bitus.

Na última seção do trabalho (Capítulo 2), o enfoque foi no entendimento dos aspectos fisiológicos das leveduras encontradas no integumento dos bitus. Os aspectos estudados foram a capacidade dessas degradarem polímeros vegetais (i.e. produção de enzimas hidrolíticas) comumente encontrados nos jardins de fungo e a capacidade de assimilação dos oligossacarídeos resultantes da hidrólise desses polímeros. Assim, foi discutido se as leveduras, quando presentes nos jardins de fungo, podem atuar como benéficas (consumindo compostos tóxicos às formigas) ou como competidoras do fungo mutualista, consumindo os mesmos açúcares utilizados pelo fungo como fonte nutricional.

No geral, os resultados do presente trabalho são inéditos, pois demonstraram que os bitus transportam uma elevada diversidade de leveduras, muitas delas com potencial para desenvolver um papel ecológico nos ninhos. Além disso, sugerimos que as leveduras presentes nos bitus podem ser transmitidas para as fêmeas aladas e eventualmente fazerem parte da microbiota inicial dos jardins de fungo, quando o novo ninho estiver sendo estabelecido. Nesse sentido, o presente trabalho contribuiu para o avanço na compreensão do envolvimento desses micro-organismos na associação formiga-fungo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Formigas da tribo Attini e a associação com fungos

O hábito de cultivar fungos para alimentação originou-se nas formigas da tribo Attini há, aproximadamente, 50 milhões de anos (SCHULTZ; BRADY, 2008). Estudos sugerem que tal hábito surgiu somente uma vez na história evolutiva desse grupo de insetos (CHAPELA et al., 1994; SCHULTZ; BRADY, 2008). É provável que esta associação originou-se nas florestas tropicais da América do Sul (MAYHÉ-NUNES; JAFFÉ, 1998; SCHULTZ; BRADY, 2008; SOLOMON et al., 2008).

As formigas da tribo Attini ocorrem desde o sul dos Estados Unidos e em quase toda a América Latina, com exceção do Chile, provavelmente, devido à incapacidade de se dispersarem devido à barreira da Cordilheira dos Andes (MAYHÉ-NUNES; JAFFÉ, 1998; FERNÁNDEZ, 2003; DELABIE et al., 2011). A tribo Attini compreende 16 gêneros distribuídos em aproximadamente 297 espécies (BRANDÃO, MAYHÉ-NUNES, SANHUDO, 2011).

A natureza da simbiose entre as formigas da tribo Attini e seus fungos envolve, principalmente, aspectos nutricionais. As formigas cultivam e estimulam o crescimento do fungo através da preparação e incorporação de substratos; em contrapartida, o fungo é capaz de produzir enzimas que degradam parte desse material, utilizando-o como fonte de nutrientes para seu crescimento e estocam substâncias nutritivas utilizadas para a alimentação das larvas (WEBER, 1966; BACCI JÚNIOR; ANVERSA; PAGNOCCA, 1995; RONHEDE; BOOMSMA; ROSENDHAL, 2004; SILVA et al., 2006; DINIZ; BUENO, 2010).

O cultivo de fungos provavelmente originou-se com uma “agricultura” primitiva de fungos, semelhante aquela praticada por formigas de gêneros filogeneticamente basais da tribo Attini (denominadas de PaleoAttini) adquiriram do ambiente, fungos das famílias Lepiotaceae e Pterulaceae (Basidiomycota: Agaricales, SCHULTZ; BRADY, 2008; VO; MUELLER; MIKHEYEV, 2009). A fungicultura mais especializada surgiu com os gêneros de formigas derivadas filogeneticamente (denominadas de NeoAttini): *Sericomyrmex*, *Trachymyrmex*, *Acromyrmex* e *Atta*. Esses insetos cultivam somente fungos da família Lepiotaceae que, possivelmente, não são encontrados em vida livre na natureza. Além disso, as extremidades das hifas desses fungos apresentam vesículas, conhecidas como gongilídeos, ricas em nutrientes e utilizadas pelas larvas como única fonte de alimento (WEBER, 1956; 1972; QUINLAN; CHERRETT, 1979; WETTERER; SCHULTZ; MEIER, 1998; SCHULTZ; BRADY, 2008).

Os gêneros *Atta* e *Acromyrmex* são considerados os mais derivados da tribo Attini e apresentam o hábito de cortar folhas e flores frescas utilizadas como substrato para o fungo mutualista, cultivado dentro dos ninhos nos jardins de fungo (DELLA-LUCIA; SOUZA, 2011). Ambos os gêneros cultivam a mesma espécie de fungo (*L. gongylophorus*) há no mínimo 2 a 4 milhões de anos (SILVA-PINHATI et al., 2004; MIKHEYEV, MUELLER, ABBOT, 2006, 2010; SCHULTZ; BRADY, 2008).

As formigas do gênero *Atta* são conhecidas popularmente como saúvas e podem causar grandes prejuízos econômicos devido ao corte de material vegetal em diversas culturas agrícolas, especialmente a espécie *Atta sexdens rubropilosa*. Ninhos adultos dessa espécie podem produzir milhões de indivíduos, formando colônias de grande porte e estão presentes em várias regiões do território brasileiro (HERNÁNDEZ; JAFFÉ, 1995; DELLA LUCIA; SOUZA, 2011). Estudos em diversas áreas do conhecimento científico estão em desenvolvimento para um melhor entendimento da biologia dessas formigas e com isso buscando encontrar uma maneira mais eficiente para controlá-las (DELLA LUCIA; SOUZA, 2011).

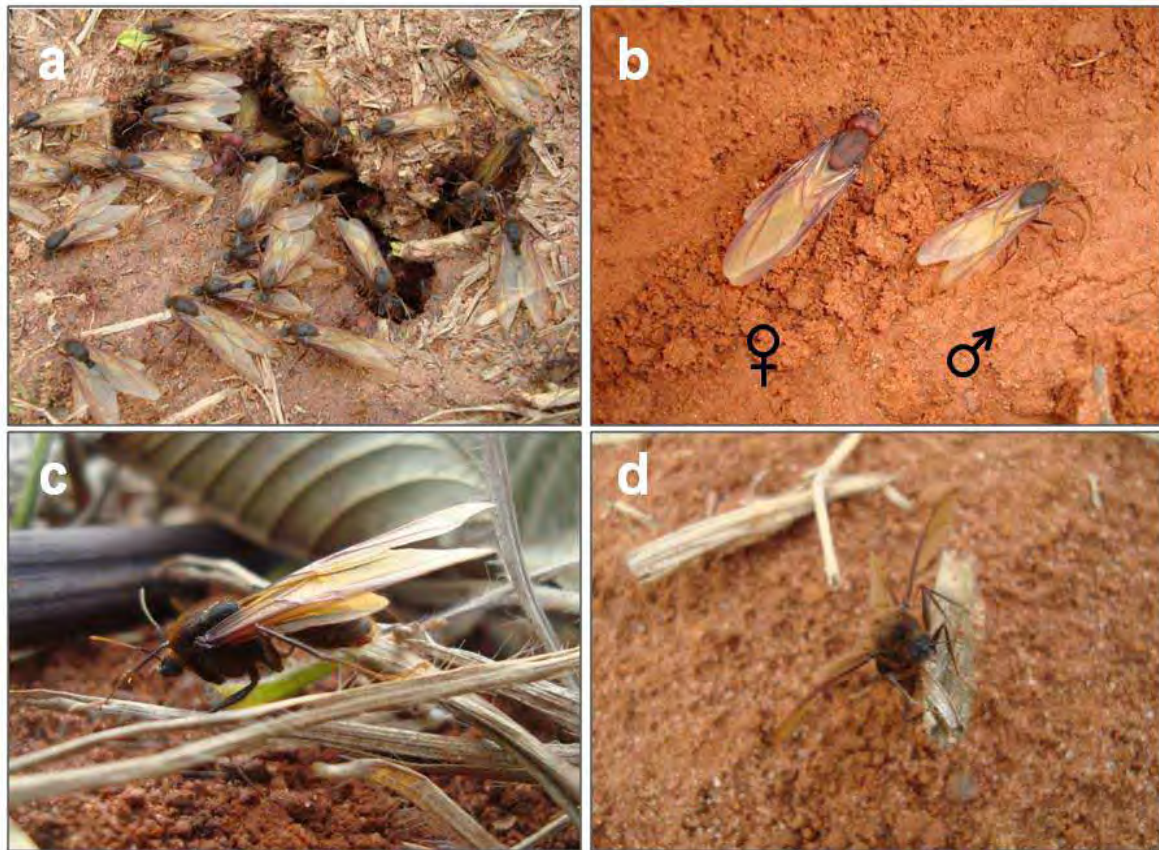
2.2 Voo nupcial e fundação de ninhos no gênero *Atta*

Os machos alados do gênero *Atta* são conhecidos como bitus. Juntamente com as fêmeas aladas (içás) formam as castas reprodutivas dessas formigas e desempenham papel fundamental no ciclo de vida da colônia (Figura 2.1).

As castas aladas em *A. sexdens rubropilosa* geralmente são formadas após três anos da fundação da colônia, tempo considerado suficiente para o amadurecimento dos formigueiros (AUTUORI, 1941). O evento conhecido como voo nupcial, ou revoada, é o momento no qual as castas aladas deixam os ninhos e voam até certa altitude, culminando no acasalamento e fecundação das fêmeas (AUTUORI, 1941; HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

Em média a produção de bitus por ninho supera seis vezes a produção de içás (AUTUORI, 1941). Por exemplo, um formigueiro de *A. sexdens rubropilosa* produz em média de 14.233 bitus, enquanto 2.092 içás são encontradas em um ninho por revoada. Alguns saúveiros podem ainda, produzir mais de 35.000 bitus em uma única revoada (AUTUORI, 1950). Essa proporção entre os bitus e as içás pode ser explicada devido ao comportamento de poliandria, onde nessa espécie, uma única içá pode acasalar com três a oito bitus durante o voo nupcial (KERR, 1961; MARINHO et al. 2011). Ainda, o mesmo bitu pode acasalar-se com mais de uma içá durante o voo de acasalamento (BAER; BOOMSMA, 2004).

Figura 2.1 - Castas aladas de *Atta sexdens rubropilosa* momentos antes do voo nupcial



Em **a**: castas reprodutivas aladas no momento em que deixavam os ninhos para o voo nupcial; **b**: fêmeas aladas (içás) e machos alados (bitus); **c**: macho alado; **d**: macho alado preparando-se para o voo nupcial. Fotos: Silvio Lovato Arcuri

Em *A. sexdens rubropilosa* a preparação para a revoada pode ser detectada por alguns comportamentos, como um maior alvoroço e agressividade das formigas (AUTUORI, 1941; BUENO et al., 2002) e alargamento dos olheiros (entrada dos túneis) pelas operárias (AUTUORI, 1941). A época do ano e o clima também são fundamentais para que ocorra a revoada. Na região sudeste do Brasil, por exemplo, essas formigas iniciam o voo nupcial em dias quentes, entre setembro a dezembro, após fortes chuvas (AUTUORI, 1941; HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

Antes de deixarem os ninhos de origem, as iças coletam uma porção de fungo e armazenam-no na cavidade infrabucal (WEBER, 1956; HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Após a cópula, retornam ao chão, livram-se das asas, escolhem um local apropriado e começam a escavar. A iça fecundada, neste momento já conhecida como rainha, escava um canal que varia entre 8,5 cm e 18,0 cm de profundidade, iniciando então a formação da primeira câmara do formigueiro (RIBEIRO, 1995; ARAÚJO et al., 2011).

Após a escavação, as fêmeas fecundadas fecham os túneis, regurgitam o fungo no solo da câmara, iniciam a oviposição e cultivam o fungo. Esta fase é conhecida como fase claustral, na qual as rainhas utilizam reservas corporais e ovos tróficos para manter-se, bem como manter as primeiras larvas, não havendo necessidade de forragear (AUTUORI, 1941; WEBER, 1956; FERNÁNDEZ-MARÍN; ZIMMERMAN; WCISLO, 2004). Três meses após a fundação do formigueiro, ocorre a abertura do primeiro olheiro pelas operárias, as quais passarão a forragear substrato vegetal fresco para manter o jardim de fungo (AUTUORI, 1941; WEBER, 1966). A fundação dos ninhos no gênero *Atta* é caracterizada por ser haplometrótica, onde apenas uma íçá funda e estabelece o novo formigueiro (FERNÁNDEZ-MARÍN; ZIMMERMAN; WCISLO, 2004; ARAÚJO et al., 2011), existindo uma única exceção, *Atta texana* (MINTZER, 1987).

O sucesso de fundação de um novo ninho depende de vários fatores e estima-se que cerca de 99,95% das íças que deixam os ninhos de origem para o voo nupcial não irão dar origem a um formigueiro maduro (AUTUORI, 1950). Este elevado percentual de mortalidade se deve a diversos fatores, tais como: (i) predação das íças por pássaros e outros insetos durante o voo nupcial e durante o período de escavação; (ii) a inundação dos formigueiros iniciais durante fortes chuvas; (iii) morte do fungo mutualista (AUTUORI, 1950) e (iv) morte das íças devido à fungos entomopatogênicos (RODRIGUES et al., 2010).

2.3 Micro-organismos associados às formigas da tribo Attini

Estudos sobre a microbiota encontrada nos jardins de fungo e na cutícula das formigas Attini, tornaram-se de extrema importância a partir dos trabalhos que mostraram que outros organismos participam da associação formiga-fungo. No curso desses estudos, dois novos simbiontes foram descobertos: (i) fungos do gênero *Escovopsis* foram relatados como parasitas especializados dos jardins de fungo de formigas da tribo Attini e; (ii) actinobactérias foram descobertas recobrando o corpo dessas formigas conferindo proteção aos jardins de fungo contra micro-organismos invasores (CURRIE; MUELLER; MALLOCH, 1999; CURRIE et al., 1999).

Fungos do gênero *Escovopsis* foram encontrados em ninhos de diversas espécies de formigas Attini e são prejudiciais para o jardim de fungos, pois colonizam rapidamente esse substrato, podendo ocasionar a morte dos ninhos (CURRIE; MUELLER; MALLOCH, 1999; CURRIE; BOT; BOOMSMA, 2003). Currie (2001) relata que em ninhos infectados com o parasita, existe uma menor produção de ovos, o desenvolvimento das larvas é afetado e há uma redução na biomassa dos jardins de fungo. O parasitismo de *Escovopsis* no jardim de

fungo é em parte explicado pela quimiotaxia frente a compostos produzidos pelo fungo mutualista (GERARDO et al., 2006). Tais sinais químicos são provavelmente os responsáveis pela especificidade na relação entre as linhagens de *Escovopsis* e do fungo mutualista cultivado pelas formigas cortadeiras (CURRIE; BOT; BOOMSMA et al., 2003; GERARDO et al., 2006).

A ocorrência de *Escovopsis* em ninhos das formigas cortadeiras pode variar entre as espécies de formigas, entre diferentes ninhos e também conforme o local amostrado. No geral, ocorrências de 27% a 64% das colônias *Escovopsis* foram relatadas para o parasita no Brasil e na América Central, respectivamente (RODRIGUES et al., 2005; CURRIE; MUELLER; MALLOCH, 1999; CURRIE, 2001).

Na tentativa de evitar que *Escovopsis* ou outros micro-organismos indesejáveis à cultura do fungo se estabeleçam nos ninhos, as formigas possuem diversos comportamentos de higienização, tanto do jardim de fungo, quanto do próprio corpo (CURRIE; STUART, 2001; FERNÁNDEZ-MARIN; ZIMMERMAN; WCISLO, 2004; RODRIGUES et al., 2008a; PAGNOCCA; RODRIGUES; BACCI JÚNIOR, 2011). As estratégias comportamentais podem minimizar a presença e o efeito desses micro-organismos para as formigas (CURRIE; STUART, 2001; RODRIGUES et al., 2008a), mas diversos trabalhos demonstraram que uma variedade de outros microfungos são encontrados associados aos jardins ou às formigas (FISHER et al., 1996; RODRIGUES et al., 2005; 2008b; 2010; PAGNOCCA; RODRIGUES; BACCI JÚNIOR, 2011); algumas vezes esses microfungos são encontrados em proporções mais elevadas que o próprio parasita especializado *Escovopsis* (RODRIGUES et al., 2008b). Nesta microbiota tão diversificada, existe ainda muita dificuldade em saber com exatidão quem é parceiro e quem é parasita.

Os diversos microfungos presentes nos jardins frequentemente ganham acesso ao interior dos ninhos como resultado do forrageamento e do contato das operárias com o solo (FISHER et al., 1996; RODRIGUES et al., 2008b). É provável que alguns micro-organismos que são passivamente incorporados no interior dos ninhos encontrem um microambiente que lhes seja favorável, no qual passam a crescer e multiplicar (PAGNOCCA, RODRIGUES, BACCI JÚNIOR, 2011).

Outra estratégia utilizada por formigas no combate aos micro-organismos presentes nos jardins é o comportamento de, ao longo da evolução, recrutarem novos simbiontes do ambiente. Tal comportamento permite selecionar e adquirir parceiros microbianos úteis para os ninhos (MUELLER, 2012). Este é o caso das actinobactérias, as quais estão aderidas a partes específicas ou até mesmo recobrando todo o corpo das formigas e produzem

antibióticos capazes de inibir o desenvolvimento de diversos microfungos presentes nos jardins e no corpo das formigas, inclusive *Escovopsis* (MUELLER, 2012). No gênero *Atta*, essas actinobactérias não são encontradas com frequência (CURRIE et al. 1999; OH et al., 2009; SEN et al., 2009; MUELLER, 2012), existindo poucos relatos de sua existência nesse gênero de formiga cortadeira (MANGONE; CURRIE, 2007).

Além das actinobactérias, as quais também podem ser encontradas nos jardins (SEN et al., 2009; ISHAK et al., 2011), outras bactérias estão associadas às colônias de formigas cortadeiras (CRAVEN; DIX; MICHAELS, 1970; BACCI JÚNIOR et al., 1995; SCOTT et al., 2010; SUEN et al., 2010) Essas bactérias podem ainda realizar funções específicas, como a contribuição na degradação dos polissacarídeos vegetais através de produção de enzimas disponibilizando açúcares mais simples no jardim (BACCI JÚNIOR et al. 1995) e na fixação de nitrogênio, o qual é convertido em biomassa dentro do jardim de fungo (PINTO-TOMÁS et al., 2009).

2.4 Leveduras associadas às formigas Attini

O primeiro estudo que relata a ocorrência de leveduras em formigas Attini foi realizado por Craven, Dix e Michaels (1970). Os autores revelaram a existência de uma grande quantidade de células leveduriformes em jardins de fungo das formigas cortadeiras *Atta cephalotes* e *Acromyrmex octospinosus*. Estas leveduras, aparentemente estavam se reproduzindo neste local e, portanto, fazendo parte da microbiota desse ambiente e eventualmente desempenhando algum papel ecológico.

O estudo realizado por Craven, Dix e Michaels (1970) somente indicou a existência de leveduras nos jardins de fungo dessas formigas, mas a identificação de leveduras presentes nesse nicho foi realizada anos depois por De Angelis, Serzedello e De Angelis (1983), os quais relataram diferentes espécies de leveduras em ninhos de *A. sexdens rubropilosa* e *Atta laevigata*. Fisher et al. (1996) estudando microfungos nos jardins de *Atta cephalotes* isolaram leveduras de quatro ninhos de laboratório e sugeriram que essas leveduras são incorporadas nos jardins de fungo com o material foliar carregado pelas formigas.

Pagnocca et al. (1996) estudaram leveduras presentes em jardins e lixos de formigas *A. sexdens rubropilosa* e compararam a abundância desses micro-organismos quando foram oferecidas folhas de *Eucalyptus alba* ou *Sesamum indicum* (gergelim). Os resultados indicaram que o consumo de folhas de *Sesamum indicum*, o qual impacta de forma negativa as colônias, resultou em um expressivo aumento populacional de leveduras e bactérias (em termos de NMP/mL) nos jardins de fungo, indicando que a comunidade microbiana existente

nos ninhos saudáveis deve se auto-regular. A introdução de certas plantas, que possuem compostos secundários tóxicos (como é o caso do gergelim), pode ser o fator desencadeante da quebra desse equilíbrio, com consequências drásticas para o formigueiro.

Carreiro et al. (1997) estudaram a comunidade de leveduras em ninhos de laboratório de *A. sexdens rubropilosa*. Os autores isolaram leveduras de diferentes locais (várias regiões do jardim de fungo, do depósito de lixo, do corpo das formigas, das folhas que as operárias coletavam para o forrageamento e do assoalho das câmaras onde ficam estocados os jardins de fungo). Um total de 15 espécies foi identificado no material do jardim de fungo. Os autores propuseram que as leveduras podem ser introduzidas nos ninhos pelas próprias operárias, as quais podem adquiri-las no contato com os diversos tipos de materiais que entram em contato no ato de forragear.

Algumas estirpes isoladas de fragmentos de jardim de fungo, depósitos de lixo, corpo das operárias e assoalho das câmaras foram identificadas no trabalho de Carreiro et al. (1997) como *Trichosporon beigelii*. Middelhoven et al. (2003) revisaram a identificação dessa estirpe e descreveram os isolados como uma espécie nova de levedura, nomeada então como *Cryptococcus haglerorum*.

Além de *C. haglerorum*, outras espécies novas de leveduras foram descritas a partir de ninhos de formigas Attini, destacando-se *Sympodiomyces attinorum* (= *Blastobotrys attinorum*), isolada de ninhos de *A. sexdens rubropilosa* (CARREIRO et al., 2004) e *Trichosporon chiarellii*, descrita de um ninho da formiga *Myrmicocrypta camargoi* (PAGNOCCA et al., 2010).

Alguns estudos foram realizados para procurar prováveis funções das leveduras presentes nos jardins de formigas Attini. Uma dessas funções pode ser na manutenção da própria comunidade de leveduras através da produção de proteínas ‘killer’ (i.e. micocinas) por algumas estirpes leveduriformes (CARREIRO et al., 2002).

Rodrigues et al. (2009) estudaram a comunidade de leveduras encontradas em jardins de formigas *A. texana* e realizaram ensaios de antagonismo dessas leveduras frente a microfungos isolados de diferentes espécies de formigas, incluindo os fungos *Beauveria bassiana*, *Syncephalastrum racemosum* e *Escovopsis* sp. Os autores discutem que algumas leveduras podem agir sinergicamente com as actinobactérias suprimindo esses microfungos prejudiciais aos formigueiros, sendo esse mais um dos possíveis papéis das leveduras nos jardins de fungo dessas formigas.

Mendes et al. (2012) investigaram o potencial de leveduras associadas a formigas cortadeiras em produzir enzimas capazes de hidrolisar os polissacarídeos presentes no

material vegetal das plantas. Um elevado percentual de leveduras foi capaz de produzir celulases (n= 82 leveduras, 67% positivas), pectinases (n= 82 leveduras, 44% positivas), proteases (n= 82 leveduras, 27%) e amilases (n= 82 leveduras, 17% positivas), mostrando que essas leveduras atuam na quebra do material vegetal e conseqüentemente disponibilizam carboidratos mais facilmente assimiláveis nos jardins de fungo. Os autores ainda relataram que essas leveduras atuam na destoxificação dos ninhos pelo consumo de ácido galacturônico, composto danoso para as formigas (SILVA et al., 2003) e pouco assimilado pelo fungo mutualista (SIQUEIRA et al., 1998).

Os estudos das interações entre leveduras e formigas Attini se tornaram ainda mais interessantes com a presença de outro simbionte que ocasiona impacto negativo e de forma indireta na simbiose entre as formigas Attini e o fungo mutualista. Little e Currie (2007) encontraram leveduras negras relacionadas ao gênero *Phialophora* associadas às cutículas das formigas *Apterostigma*, no mesmo local onde são geralmente encontradas as actinobactérias. Ainda, os autores apontam a hipótese de que essas leveduras se associaram com as formigas uma única vez na história evolutiva e que essa associação se mantém até os dias atuais. Little e Currie (2008) afirmaram que essas leveduras adquirem nutrientes das actinobactérias e suprimem assim o seu desenvolvimento, ocasionando um impacto negativo na simbiose pela ineficiência das bactérias em suprimir os fungos patogênicos aos jardins de fungo.

Pouco se sabe em relação à possibilidade de transmissão de leveduras entre diferentes ninhos. Pagnocca et al. (2008), estudando a comunidade de microfungos e leveduras no corpo de içás de *A. laevigata* e *Atta capiguara* antes de saírem para o voo nupcial, demonstraram que as içás podem transportar leveduras em seu integumento e até mesmo na cavidade infra-bucal, mas não é possível saber se elas se estabelecem no ninho a ser fundado por essas içás. Nenhum trabalho até o momento estudou qual é a composição de leveduras que os bitus carregam em seu corpo antes do voo nupcial e quais seriam as implicações desta ocorrência.

Embasado nos diversos estudos que tentaram entender a microbiota associada às formigas Attini, sabe-se que os ninhos dessas formigas constituem um ambiente complexo, tanto em termos de diversidade microbiana, quanto nos diversos papéis ecológicos que esses micro-organismos podem desempenhar nesse habitat.

Os bitus são indivíduos gerados nos jardins de fungo e sua permanência exclusiva nesse habitat até o momento do voo nupcial os torna indicadores da microbiota presente nos ninhos. Ainda, não se sabe como a abundância de bitus produzida durante a revoada pode interferir na dispersão de micro-organismos na natureza, incluindo a transferência desses micro-organismos para outros ninhos, tendo em vista que o integumento dos machos entram

em contato com o integumento das fêmeas durante o acasalamento, podendo ocorrer a transmissão da microbiota.

Tendo em vista que não existem estudos que investigaram o papel dos bitus na dispersão de leveduras, o capítulo 1 desse trabalho teve como objetivo examinar a comunidade de leveduras presentes no integumento dos bitus de *A. sexdens rubropilosa* de diferentes ninhos e em anos consecutivos. Esse assunto é inédito, por ser o primeiro a investigar a diversidade de leveduras no integumento dos machos alados dessa formiga cortadeira amplamente distribuída no Brasil.

2.5 Degradação do material vegetal nos jardins de fungo

A degradação dos polissacarídeos da parede celular do substrato vegetal incorporado nos jardins de fungo é um dos principais pontos discutidos sobre a possível origem biotrófica ou saprofítica do fungo mutualista das formigas cortadeiras (ABRIL; BUCHER, 2002; 2004; ERTHAL JÚNIOR et al., 2009).

A teoria da origem saprofítica do fungo mutualista baseia-se, principalmente, no fato de: (i) nos jardins de fungo serem detectado diversas enzimas necessárias para o fungo mutualista ser considerado saprofítico, inclusive celulasas (ERTHAL JÚNIOR et al., 2009) e (ii) existir evidência microscópica de que o material vegetal separado para descarte nos jardins de fungo contém material celulósico já degradado (NAGAMOTO et al., 2011). De fato, existe uma elevada capacidade de degradação da maioria dos polissacarídeos vegetais dentro dos jardins de fungo, mas sabe-se também que a degradação de alguns compostos vegetais como celulose, por exemplo, pode ser proveniente de uma complexa comunidade microbiana existente nesse habitat, incluindo bactérias (BACCI JÚNIOR et al., 1995; SUEN et al., 2010) e leveduras (MENDES et al., 2012) e não somente pela atuação do fungo mutualista.

A elevada produção de pectinases pelo fungo mutualista comparada a outras enzimas extracelulares como amilases, xilanases e celulasas (SIQUEIRA et al., 1998, SILVA et al., 2006); o fato do fungo mutualista não produzir quantidades significativas de celulasas em cultura pura (ABRIL; BUCHER, 2002); e o fungo apresentar baixa taxa de crescimento em ácido galacturônico, principal produto gerado da degradação da pectina (SILVA et al., 2003), são os principais pontos antagônicos em relação a origem saprofítica do fungo e, por outro lado, fortalecem a teoria de uma origem biotrófica para esse fungo.

Ainda, são esses os principais fatores que sugerem que as pectinases podem ser as mais importantes enzimas produzidas por *L. gongylophorus* (SIQUEIRA et al., 1998; SILVA

et al., 2006; SCHIOTT et al., 2010, MOLLER et al., 2011). A atividade pectinolítica é superexpressa nos gongilídeos do fungo, onde as enzimas são armazenadas e ingeridas pelas formigas (SCHIOTT et al., 2010). Também, essas enzimas não são degradadas no aparelho digestivo das formigas, são liberadas juntamente com os fluidos fecais das formigas que são depositados sobre a superfície das folhas (RHONHEDE; BOOMSMA; ROSENDAHL, 2004; SCHIOTT et al., 2010) e iniciam a degradação da pectina do material vegetal antes mesmo desse material ser incorporado aos jardins de fungo pelas formigas (MOLLER et al., 2011).

Não somente o fato das pectinases serem as enzimas mais produzidas pelo fungo as tornam de extrema importância dentro dos jardins de fungo, mas também pela função que elas desempenham ao degradarem a pectina. A pectina é um dos principais polissacarídeos estruturais das plantas e é o principal constituinte da lamela média, atuando como um cimento que une e enrijece as paredes celulares vegetais (WILLATS et al. 2001). Portanto, o fungo não degrada a pectina com finalidade nutricional, visto que não consome o principal componente gerado de sua degradação. Assim, sugere-se que as pectinases são produzidas visando, primordialmente, desestruturar e enfraquecer a parede celular das plantas, dando acesso ao fungo a outros componentes do material vegetal, semelhante ao que ocorre com fungos fitopatogênicos (SIQUEIRA et al., 1998; ABRIL; BUCHER, 2002).

Considerando esses fatos, sabe-se que a degradação do material vegetal nos jardins de fungo das formigas cortadeiras conta com o auxílio de micro-organismos presentes nesse micro-habitat, mas pouco foram os trabalhos que abordaram esse assunto e raros são os estudos conduzidos sobre a contribuição ecológica das leveduras dentro dos jardins de fungo de formigas cortadeiras, principalmente da espécie amplamente distribuída no Brasil, *A. sexdens rubropilosa*. Dentre esses estudos, o trabalho de Mendes et al. (2012) foi o único a avaliar o papel das leveduras nos jardins desses insetos. No presente trabalho, analisamos as leveduras dispersas pelos bitus e a possível contribuição desses micro-organismos na degradação do substrato vegetal encontrado nos jardins de fungo (Capítulo 2).

3 CAPÍTULO 1

TAXONOMY OF YEASTS ISOLATED FROM WINGED MALES OF *Atta sexdens* *rubropilosa*

Silvio Lovato Arcuri^{1,2}, Fernando Carlos Pagnocca¹, Weilan Gomes da Paixão Melo¹, Nilson Satoru Nagamoto³, André Rodrigues^{1,2*}

¹ Center for the Study of Social Insects, UNESP - São Paulo State University, 13506-900, Rio Claro, SP, Brazil

² Laboratory of Fungal Ecology and Systematics, UNESP – São Paulo State University, 13506-900, Rio Claro, SP, Brazil

³ Department of Vegetal Production, UNESP – São Paulo State University, 18603-970, Botucatu, SP, Brazil

Abstract: Leafcutter ants are social insects that produce a high number of alates that leave their nests for mating. After copulation, the males die and gynes are responsible to establish a new nest. Dispersion of microorganisms by reproductive forms during the mating flight is poorly known in leaf-cutting ants. Here, we evaluate the community of yeasts found on the integument of males before leaving the parental nest for the mating flight. A total of two hundred males of *Atta sexdens rubropilosa* were sampled from two nests during the mating flights of 2010 and 2011. Using a culture-dependent method coupled with a polyphasic approach of species determination, a total of 242 strains composed 29 species were recovered from the integument of males. The yeast species richness and diversity was higher in nest #1 (in both years) in comparison to nest #2 (sampled only in 2011), as judged by rarefaction curves and diversity metrics. Community structure analysis revealed that neither the site nor the year when the mating flights took place explained the observed variations in yeast communities. The most prevalent yeast species found was *Aureobasidium leucospermi* with 44 strains of the integument of males from all samples (18.1% of the total strains). Although, *Cryptococcus hagerorum* and *Trichosporon chiarellii* were found only in one sample (nest #1- mating flight of 2011), these species are only known from nests of attine ants and their presence in this study supports their association with these ants. In addition, our results showed that most yeast species on the integument of males could be derived from the fungus garden and a minor proportion is derived from the soil adjacent to the ant nests. The diversity of yeasts found and its ecological implication for leaf-cutting ants are discussed.

Keywords: mating flight, tribe Attini, fungi, nest founding

* Corresponding author

andr@rc.unesp.br, phone: +55 19 35264167

3.1 Introduction

Fungus-growing ants in the tribe Attini (Hymenoptera: Formicidae) maintain a mutualistic relationship with fungi cultivated for food (Hölldobler and Wilson 1990). The ants collect, prepare and provide the necessary substrate for the development of their fungus; in turn, the fungus is the main nutrient source, especially for the brood (Weber 1972; Diniz and Bueno 2010). Fungus-growing ants in the genus *Atta* cut fresh plant material to nourish their fungus (Della-Lucia and Souza, 2011), *Leucoagaricus gongylophorus* (Basidiomycota: Agaricales) (Silva-Pinhati et al. 2004) and due to the large amounts of substrate they forage, these insects cause severe losses in agricultural crops (Hernández and Jaffé 1995).

Additional microorganisms are found in the fungus gardens, including the specialized fungal parasite *Escovopsis* sp., are found in the fungus gardens of most attine ant genera (Fisher et al. 1996; Currie et al. 1999; Currie et al. 2003; Rodrigues et al. 2005; 2008; 2010; Pagnocca et al. 2011). Bacteria were also reported in the fungus gardens of several attine ants (Craven et al. 1970; Bacci Júnior et al. 1995; Pagnocca et al. 1996; Scott et al. 2010). Actinobacteria found on the ants' integument, are able to produce antibiotics against microfungi present in the fungus garden (Mueller 2012). Finally, yeasts are found in the fungus gardens and on the workers' integument (Craven et al. 1970; Pagnocca et al. 1996; Carreiro et al. 1997; Little and Currie 2007; 2008; Rodrigues et al. 2009; Mendes et al. 2012), including the black yeast genus *Phialophora* thought to be a symbiont in the attine ant-microbe association (Little and Currie 2007; 2008).

Recently, it was proposed that yeasts may play significant roles in the fungus gardens of attine ants. For instance, Rodrigues et al. (2009) argued that yeasts found in the fungus gardens of *Atta texana* inhibit the growth of garden microfungi, including the parasite *Escovopsis* sp. Also, yeasts are thought to contribute in the degradation of the plant substrate present in the fungus gardens to provide nutrients for the ants and others organisms (Mendes et al. 2012), in addition to remove toxic compounds from the fungus gardens (Mendes et al. 2012). Finally, it was hypothesized that black yeasts act as an antagonists, consuming the actinobacteria present on the integument of attine workers (Little and Currie 2007; 2008).

Once a year, nests of the leaf-cutting ant genus *Atta* produce several alates (males and gynes) known as the reproductive castes (Autuori 1941). In average, it was recorded that nests of *Atta sexdens rubropilosa* produce 2.094 gynes and 14.233 males per mating flight (Autuori 1950). In specific periods of the year alates leave the nests and mate during the flight, an event known as the mating flight (Hölldobler and Wilson 1990). The males are short-lived

and after mating they die in a few days. Whereas, females are responsible for the foundation of a new nest and may live for several years. After copulation, fertilized females (prospective queens) return to the ground, remove their wings and dig the first nest chamber. In this chamber, queens regurgitate a portion of the fungus garden collected from the parental nest and start the new fungus garden (Weber 1972; Hölldobler and Wilson 1990).

Due to the ephemeral life of males, little is known about their biology beyond to the reproductive role. The males are born and reared in the fungus garden and are restricted to this habitat. Before the nuptial flight, the consortium of microbes present on their integuments may reflect the microbial community found in the fungus garden. Pagnocca et al. (2008) studied the yeast community on the integument of gynes of *Atta laevigata* and *Atta capiguara* before leaving for the mating flight. Few yeast species are carried on the integument of gynes of leafcutter ants and suggested that females would contribute to a minor proportion of yeasts in the new incipient fungus gardens. Microbes transferred from the males' integument to the females' integument during mating, may contribute to the initial microbial community during the foundation of a new nest.

Males from two nests of *A. sexdens rubropilosa* were sampled during two consecutive mating flights and they harbored several yeasts which may have implication during the foundation of a new nest.

3.2 Material and Methods

3.2.1 Nest location and sampling

Males of leaf-cutting ants were collected from two mature nests located in the State of São Paulo, Brazil. The mating flights occurred in warm and humid days, after heavy rains. One nest (nest #1: SLA100918-01) was sampled at São Paulo State University (UNESP), Rio Claro (GPS: S22°23'705'' and W47°32'544'') in September 18th, 2010 and in October 10th, 2011. Nest #2 (SLA111012-01) was sampled at Fazenda Santana, Botucatu (GPS: S22°50'643'' and W48°26'086'') in October 10th, 2011.

Fifty alates were collected from nest #1 in 2010 and 50 alates in 2011; also 100 males were collected in 2011 from nest #2. Alates were aseptically picked using sterile forceps when they appeared at the nest openings for the mating flight. Each alate was transferred to a sterile Petri dish and transported in a cooler to the laboratory within four hours.

In order to investigate if yeasts found on the integument of males originated from the soil, we collected aseptically soil samples from the nest tunnels and from 10 meters away

from nests. Soil from the nest tunnels was collected at depth of 10 cm from three distinct tunnels where the males were collected. Soil samples were pooled to obtain a composite sample for each nest. The same scheme was applied to non-nest soils which were collected at the same depth. Soil sampling was carried out in nest#1 and #2 in October 27th, 2011 and transported to the laboratory in sterile plastic bags held in a cooler.

3.2.2 Yeast isolation

Each alate was allowed to walk for two hours on plates with Potato Dextrose Agar (PDA, Acumedia) supplemented with 150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of chloramphenicol (Sigma-AldrichTM). Plates were incubated at 20 °C \pm 1 °C for seven days. All yeast colonies were subcultured in Sabouraud Dextrose Agar (SDA, Acumedia) supplemented with 150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of chloramphenicol in order to obtain pure cultures.

Soil samples were manually homogenized, then sieved in a 0.84 mm mesh. One gram of soil was diluted ten-fold in 0.85% NaCl and 100 μl aliquots from each dilution were spread in duplicate on PDA and yeast-malt extract agar (YMA: 0.3 % yeast extract, 0.3 % malt extract, 0.5 % peptone and agar 1.5 % and pH adjusted to 4.0) supplemented with the same antibiotic. Plates were incubated at 20 °C \pm 1 °C and all yeast colonies were subcultured as described. Representative strains from all isolations were stored at -80 °C in GYMP medium supplemented with 15% glycerol (Rosa et al. 1995).

3.2.3 Yeast identification

Yeast strains were first grouped using colony and microscopic characteristics. Genomic DNA from all strains was extracted following Sampaio et al. (2001). Strains were subjected to microsatellite-primed PCR (MSP-PCR) in order to further group strains that share similar fingerprinting patterns (Meyer et al. 1993). Genomic DNA of each strain was amplified using (GTG)₅ primer. Polymerase chain reactions (PCR) contained: 4.0 μl of dNTPs (1.25 mM each), 2.5 μl of 10X buffer, 1.0 μl of MgCl₂ (50 mM), 0.2 μl of Taq polymerase (5.0 U. μl^{-1}), 2.0 μl of (GTG)₅ (10 μM), 10.3 μl of ultrapure H₂O and 5.0 μl of diluted DNA template (1:750). PCR conditions were: 95 °C for 3 min, 40 cycles at 93 °C for 45 s, 50 °C for 60 s, 72 °C for 60 s, and final extension at 72 °C for 6 min. Electrophoresis was performed in 1.4% agarose gel, in TBE (0.5%) at 90 V for 3,5 h. Band patterns were visualized by staining with GelRed (Biotium). At least one representative strain of each cluster obtained in the MSP-PCR and all strains that lacked similar band patterns were selected for DNA sequencing (see Table S3.1 for details).

Yeasts were sequenced using the primer pair NL1 and NL4 for the D1/D2 region of the small subunit ribosomal DNA (Kurtzman and Robnett 1998). For some strains we also sequenced the ITS (internal transcribed spacer) region using the primer pair ITS1 and ITS4 (White et al. 1990). PCR contained: 4.0 μ l of dNTPs (1.25 mM each), 2.5 μ l of 10X buffer, 1.0 μ l of $MgCl_2$ (50 mM), 0.2 μ l of Taq polymerase (5.0 $U\mu l^{-1}$), 2.0 μ l of each primer (10 μ M), 10.3 μ l of ultrapure H_2O and 5.0 μ l of diluted DNA template (1:750). PCR conditions followed Pagnocca et al. (2008) and amplicons were cleaned up with illustra GFX DNA and Gel Band purification Kit (GE Helthcare®). Amplicons were further quantified in Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Cycle sequencing reactions were performed using BigDye Terminator v3.1TM (Applied Biosystems) following the manufacture instructions. The same primers were used for cycle sequencing reactions. Both forward and reverse sequences were obtained on ABI3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems).

Raw sequences and the corresponding tracers were used to assemble contigs in BioEdit v7.1.3 (Hall 1999). Contigs were used to search homologous sequences in two online databases: NCBI – GenBank and the Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS). D1/D2 sequences that shared 99% or greater identity with sequences of close relatives deposited in the databases were considered conspecific (Kurtzman et al. 2011). Sequences from the databases were selected based on sequences of type strains whenever possible (Table S3.1). For isolates that were conspecific with two or more species deposited in the databases, physiological tests were performed for discrimination of such species following Kurtzman et al. (2011). In particular, for identification of *Aureobasidium* strains we inferred a phylogenetic tree with D1/D2 sequences (Fig. S3.1) using MEGA v.5.05 (Tamura et al. 2011). The phylogenetic tree was reconstructed using neighbor-joining algorithm under the Kimura 2-parameters as the substitution model and 1000 pseudo-replicates of bootstrap support.

3.2.4 Diversity and community analysis

To assess and compare differences in yeast diversity carried by alates we calculated the Shannon-Weiner and the Simpson inverse (1/D) diversity indexes. In addition, we calculated the Chao-1 species richness estimator to estimate the asymptotic species richness. Individual-based rarefaction curves were generated to compare the species richness among samples. Similarity in species composition among samples was verified by the Sørensen index (Magurran and Gill, 2011). All indexes were calculated in EstimateS v.8.2.0 (Colwell 2009) and rarefaction curves were generated in EcoSim v. 7.71 (Gotelli and Entsminger 2004).

In addition, the yeast community structure among samples was analyzed using non-metric multidimensional scaling (NMDS) implemented in PAST v. 2.16 (Hammer and Harper 2001) set to Euclidian as a similarity measure.

3.3 Results

3.3.1 *Yeast diversity on alates of *Atta sexdens rubropilosa**

Yeasts were recovered from 109 out of 200 alates (54.5%) that walked on PDA plates. The highest occurrence of yeasts was observed on males from nest #1 in the mating flight in 2011 (78%, n= 39 males), followed by males from the same nest collected in 2010 (72%, n = 36) and males from nest #2 (34%, n= 34 males).

Overall, 242 yeast strains were isolated from the integument of males, comprehending ten genera and 29 species (Table 3.1). Alates collected in 2010 and 2011 from nest #1 provided the highest observed species richness in comparison with alates from nest #2, according to rarefaction curves (Fig. 3.1). In general, our samples approached the expected asymptotic richness as revealed by the Chao 1 estimator (Fig. S3.2). This index estimates on average the minimum number of species expected to be found in a sample. Chao 1 estimator predicted 22.6 species on average on alates of nest #1 in 2010, figure close to the observed species richness for this nest (Fig. S3.2a). Considering the mating flight in 2011, Chao 1 estimates on average that 20.2 species are expected to be found, in contrast to the 15 observed species (Fig. S3.2b). Thus, additional sampling effort would be necessary to recover the non-detected species on males of this nest. For males from nest #2, our sampling recovered the expected species richness (Fig. S3.2c). When comparing the Chao-1 index among samples (Table 3.2), our data corroborates the same pattern of that observed for species richness (Fig. 3.1).

The diversity indexes corroborate that males from nest #1 showed the highest yeast diversity on their integuments than males from nest #2 (Table 3.2). However, diversity of yeasts was greater on the males' integument from nest #1 in the nuptial flight of 2010 when compared with alates collected in 2011 of the same nest (Table 3.2).

3.3.2 *Yeast species composition*

Basidiomycetous yeasts were prevalent in the integument of alates with 170 out of 242 strains (70.2%). On the other hand, ascomycetous strains comprehended 29.8% (n= 72) of the total strains. *Cryptococcus* was the most prevalent genus (92 out of 242 strains) followed by

the genera *Aureobasidium*, *Hannaella* and *Rhodotorula* with 68, 27 and 24 strains, respectively (Table 3.1).

The yeasts *Aureobasidium leucospermi*, *Cryptococcus flavescens*, *Cryptococcus* sp. 1 and *Hannaella* sp. 1 were found on alates of all samples (Fig. 3.2). *Aureobasidium pullulans*, *C. flavescens* and *Rhodotorula mucilaginosa* were the prevalent species on males of nest #1 in 2010 (Fig. 3.2). On the other hand, *Cryptococcus haglerorum* and *Trichosporon chiarellii* were the prevalent species on males from the same nest collected in 2011. In addition, *A. leucospermi* was the prevalent species on the integument of males from nest #2 (Fig. 3.2).

As indicated by the Sørensen index of similarity, males of nest #1 collected in 2010 and 2011 shared more species (Sørensen= 0.5) when compared with alates from nest #2 (Sørensen= 0.35 and 0.44, for nest #1-2010/nest#2 and nest#1-2011/nest#2, respectively). In particular for nest #1, the species found in both collections were *A. leucospermi*, *C. flavescens*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus nemorosus*, *Cryptococcus* sp. 1, *Hannaella* sp. 1, *Rhodosporidium babjevae*, *R. mucilaginosa* and *Rhodotorula nothofagi*.

3.3.3 Community structure and origin of yeasts on the integument of males

Our analysis indicates that all samples shared similar community structure (Fig. 3.3). As judged by the ordination of yeast assemblages, it appears that neither the year when the mating flight occurred nor the collection site significantly explains the observed structure. The yeast community from nest #1 in 2010 appeared to be distinct from the community of nest #2, both located in different sites; however, communities of nest #1 in 2011 overlapped with the yeast assemblage from nest #2 (Fig. 3.3).

We recovered a total of 33 yeast strains (in nine species) from soil samples (Table 3.3). Despite the observed differences in yeast species among the different types of soil samples (nest and non-nest soil, Table 3.3), only five species were shared between soils and the integument of males.

3.4 Discussion

Arthropods in general harbor a variety of yeasts on their integuments (Ganter 2006). Depending on the arthropod host, integumental yeasts may be considered transient or contribute in the host life cycle (i.e. symbionts). In attine ants, few studies have focused on yeasts found on the integument of these insects. The first study that systematically surveyed

for yeasts on the integument of alates of leaf-cutting ants isolated only 19 strains. These were distributed in three yeast species isolated from the integument of 267 leaf-cutting ant gynes prior to the mating flight (Pagnocca et al. 2008). Our study revealed that leaf-cutting ant males carry more yeasts on their integuments than the gynes sampled by Pagnocca et al. (2008), considering that ants were sampled at the same site. Over half of males of *A. sexdens rubropilosa* harbored yeasts on their integuments and the occurrence of yeasts varied between year of the mating flight and the nest location.

The observed differences in species richness found on males from nest #1 from 2010 and 2011 (Fig. 3.1) may be due to differences on the abundance and composition of yeasts species present in the fungus gardens. For instance, fungus garden from four nests of *Atta texana* sampled in the summer season at two localities in Texas (USA) contained different number of yeasts, ranging from 0.32×10^2 to 80×10^2 colony-forming units (Rodrigues et al. 2009). In addition, fungus gardens also differed regarding the yeast species composition (Rodrigues et al. 2009).

Moreover, the variation in the yeast diversity between males from nest #1 and #2 (Table 3.2) may be related to differences of plant substrates available for the ants in the two collecting sites. However, temporal differences in the diversity of yeasts found on males of nest #1 (mating flights of 2010 and 2011) are likely related to the several factors, including (i) different plant substrates available in each mating flight season and (ii) the different stages in the nest lifecycle (males were collected within a time span of one year). The latter explanation is also supported by the fact that this nest collapsed a few months after the mating flight in 2011 (SLA, personal observation). Then, it is possible that yeast communities in the fungus gardens were also affected.

Although the yeast diversity differed among samples, the observed community structure was similar even considering the different sites and years of collection (Fig. 3.1). The yeast community structure from males of nest #1 collected in 2010 slightly differed from that of nest #2. However, yeasts isolated from males of nest #1 in 2011 appeared to share similar community structure with males from the same nest sampled in 2010 (i.e. spatially similar). Thus, it is possible that workers through their cleaning behavior (i.e. allogrooming) towards the males may be responsible for maintaining the similarity in the structure of yeast communities.

The yeast species composition found on males of *A. sexdens rubropilosa* comprehends mostly basidiomycetous taxa. This result contrasts with the yeast composition on the integument of gynes of *A. laevigata* and *A. capiguara* found by Pagnocca et al. (2008) who

isolated more ascomycetous (11/ 19 strains) than basidiomycetous yeasts (08/ 19 strains). Moreover, Carreiro et al. (1997) also found more ascomycetous yeasts (26/ 39 strains) in the fungus garden of *A. sexdens rubropilosa* than basidiomycetous taxa. On the other hand, the survey of yeasts in the fungus garden of *A. texana* carried out by Rodrigues et al. (2009) supports our result because more basidiomycetous (46/ 59 strains) were found than ascomycetous yeasts (13/ 59 strains).

Cryptococcus was the prevalent genus on the males integument and has been recurrently isolated from fungus garden of attine ants (Carreiro et al. 1997; Rodrigues et al. 2009, Pagnocca et al. 2010, Mendes et al. 2012). According to Rodrigues et al. (2009) and Pagnocca et al. (2010) the frequent association of this genus with plants and soils could explain its the presence in the fungus garden, and consequently on the alates.

Aureobasidium was the second prevalent genus found on the integument of alates of *A. sexdens rubropilosa*. This genus was previously reported from fungus garden of attine ants (Carreiro et al. 2002; Rodrigues et al. 2009) and associated with the integument of gynes of *A. capiguara* and *A. laevigata* (Pagnocca et al. 2008) in the same site where the males of nest #2 (present work) were sampled. This yeast genus is ubiquitous and usually found on leaf surfaces (Li and Andrew, 1997), then its presence in attine gardens and alates is not surprising. *A. pullulans* was isolated in 44.4% of males from nest #1 (Fig. 3.2). This species was also isolated by Pagnocca et al. (2008) showing that it can be dispersed by alates of leaf-cutting ants. *A. leucospermi* was isolated from all samples (44 strains, Table 3.1 and Fig. 3.2) and for the first time it is reported associated with attine ants. *A. leucospermi* is a recent described species (Crous et al. 2011) that shares more than 99% similarity in the D1/D2 region with *A. pullulans*. Our strains were identified as the former species only by phylogenetic analysis (Fig. S3.1). Thus, the incidence of *A. leucospermi* in attine gardens may be underestimated in previous works which only relied in identification based on BLAST results (Carreiro et al. 2002; Rodrigues et al. 2009). *A. leucospermi* was first isolated in association with plants (Crous et al. 2011), than the high abundance of *A. leucospermi* found on males indicates this yeast may play an yet undescribed role in the fungus garden.

In addition, our results revealed that males carry important yeast species for the ecology of the attine ant nest. For example, *C. flavescens* was found on males from all samples (Fig. 3.2). According to Rodrigues et al. (2009), some strains of this species isolated from *A. texana* (Texas, USA) show antagonistic effects towards the garden microfungal parasite *Escovopsis* sp. (Rodrigues et al. 2009). In that study, the authors demonstrated that *C. flavescens* inhibited the mycelial growth of two strains of the parasite. Thus, its presence on

males may reflect that nest #1 and #2 harbor this yeast species. Further studies are necessary to investigate the association of this yeast species with attine ants.

Regarding the isolation of yeasts from soils of the nest tunnels and from non-nest soils (10 m away of ant nests), we observed that species found in soil were different from the ones found on the alates' integument. Only five yeast species out of 29 were present in soil samples and on males (Table 3.1 and 3.3). Although males are in close contact with the soil from the nest tunnels when leaving the parental colony for the mating flight, it appears that soil yeasts do not account for the majority of the yeast assemblage dispersed by these alates; thus suggesting that yeasts found on these insects have their origin mostly from the fungus gardens.

Considering yeasts found on both soil samples and the integument of males, *C. laurentii* was isolated on the males integument from nest #1 in the mating flights of 2010 and 2011 (Table 3.1, Fig. 3.2). This species was also reported in previous surveys of yeasts associated with Attini ants (Carreiro et al. 1997; Pagnocca et al. 2008; Rodrigues et al. 2009; Mendes et al. 2012). The occurrence of *C. laurentii* and additional yeasts such as *R. babjevae* and *Candida maltosa* from soils adjacent to ant nests (Table 3.3) confirms these species are likely introduced in the fungus garden from the soil. Also, *C. nemorosus*, isolated from the soil samples of the nest tunnels (Table 3.3) was for the first time reported in attine ants, suggesting this yeast has been acquired by males at the time they left the nest for the mating flight.

T. chiarellii and *C. haglerorum* were found on males of nest #1 in 2011 (Table 3.1). These species were described in nests of *Myrmicocrypta camargoi* (Pagnocca et al. 2010) and gardens of *A. sexdens rubropilosa* (Middelhoven et al. 2003), respectively, and are considered autochthonous of attine gardens. Such yeasts were not isolated from the gynes integument by Pagnocca et al. (2008) but indeed isolated on the males integument characterizing an interesting way to disperse these yeasts. Interesting, *T. chiarellii* was also found in soils from the tunnel of nest #2 (Table 3.3) but not isolated from the males integument of the same nest (Table 3.1). The exclusive occurrence of *T. chiarellii* in attine ants and the fact that it was also isolated from the tunnels indicates that it was probably incorporated in the soil at moment of soil disturbance by the ants.

Considering that males of leaf-cutting ants carry a higher abundance and richness of yeast species than females alates during the nuptial flight; and that females of the genus *Atta* are polyandrous, and mate with three to eight males on the nuptial flight (Kerr 1961); thus, our results suggest that males could transmit yeasts from their bodies to gynes during mating.

If this transmission of yeasts does occur in nature, thus it is possible that yeasts found in the present study may take part of the initial microbial community of the new incipient fungus garden.

Acknowledgments We thank the “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)” for scholarship to SLA. We are also grateful to Dr. LC Forti from the Department of Vegetal Production (UNESP) and JL Novelli owner of Fazenda Santana for providing the facilities during fieldwork. We also would like to thank Dr. OB Correa and Dr. V Martins for providing the facility for DNA sequencing of yeast samples. We acknowledge the ICMBio and CNPq for collecting and access permits issued to AR.

3.5 References

- Autuori M (1941) Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp.- Hymenoptera-Formicidae). I – Evolução do sauveiro (*Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908). Arq Inst Biol (São Paulo) 12:197-226
- Autuori M (1950) Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp.- Hymenoptera-Formicidae). V – Número de formas aladas e redução dos sauveiros iniciais. Arq Inst Biol (São Paulo) 19:325-331
- Bacci Júnior M, Ribeiro SB, Casarotto MEF, Pagnocca FC (1995) Biopolymer-degrading bacteria from nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. Braz J Med Biol Res 28(1): 79-82
- Carreiro SC, Pagnocca FC, Bacci Júnior M, Bueno OC, Hebling MJA, Middelhoven WJ (2002) Occurrence of killer yeasts in leaf-cutting ant nests. Folia Microbiol 47(3): 259-262
- Carreiro SC, Pagnocca FC, Bueno OC, Bacci Júnior M, Hebling MJA, Silva AO (1997) Yeasts associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908. Antonie van Leeuwenhoek 71:243-248. doi: 10.1023/A:1000182108648
- Colwell RK (2009) Estimate S: statistical estimation of species richness and shared species from sample. Version 8. <http://purl.oclc.org/estimates>. Accessed 27 Feb 2012
- Craven SE, Dix MW, Michaels GE (1970) Attine fungus gardens contains yeasts. Science 169:184-186
- Crous PW, Summer BA, Swart L, Denman S, Taylor JE, Bezuidenhout CM, Palm ME, Marinowitz S, Groenewald JZ (2011) Fungal pathogens of Proteaceae. Persoonia 27:20-45. doi: 10.3767/003158511X606239
- Currie CR, Mueller UG, Malloch D (1999) The agricultural pathology of ant fungus gardens. Proc Natl Acad Sci USA 96(14):7998-8002. doi: 10.1073/pnas.96.14.7998
- Currie CR, Bot ANM, Boomsma JJ (2003) Experimental evidence of a tripartite mutualism: bacteria protect ant fungus gardens specialized parasites. Oikos 101:91-102. doi: 10.1034/j.1600-0706.2003.12036.x
- Della-Lucia TMC, Souza DJ (2011) Importância e história de vida das formigas-cortadeiras. In: Della-Lucia TMC (ed) Formigas cortadeiras, da bioecologia ao manejo, 1st edn. UFV, Viçosa pp 13-26
- Diniz EA, Bueno OC (2010) Evolution of substrate preparation behaviors for cultivation of symbiotic fungus in Attine ants (Hymenoptera: Formicidae). J Insect Behav 23(3):205-214. doi: 10.1007/s10905-010-9207-y
- Fisher PJ, Stradling DJ, Sutton BC, Petrini LE (1996) Microfungi in the fungus gardens of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*: a preliminary study. Mycol Res 100(5):541-546. doi: 10.1016/S0953-7562(96)80006-2

Ganter PF (2006) Yeasts and invertebrates associations. In: Rosa Ca, Peter G (eds) The yeast handbook: biodiversity and ecophysiology of yeasts. Springer Verlag, Berlin pp 263-301

Gotelli NJ, Entsminger GL (2004) EcoSim: Null models software for ecology. Version 7. Acquired Intelligence Inc. & Kesey-Bear. <http://garyentsminger.com/ecosim/index.htm> . Accessed 17 November 2012

Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp Ser 41(1): 95-98

Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001) Past: paleontological statistics software package for education and data analysis. Paleontol Electron 4(1):9 pp

Hernández JV, Jaffé K (1995) Dano econômico causado por populações de formiga *Atta laevigatta* (F. Smith) em plantações de *Pinus caribaea* MOR. e elementos para o manejo da praga. An Soc Entomol Bras 24(2): 287-298

Hölldobler E, Wilson EO (1990) The ants. Belknap/Harvard University Press, Cambridge

Kerr WE (1961) Acasalamento de rainhas com vários machos em duas espécies da tribo Attini (Hymenoptera: Formicoidea). Rev Bras Biol 21(1): 45-48

Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T (2011) The yeasts, a taxonomic study. 5th edn. Elsevier, Amsterdam

Kurtzman CP, Robnett CJ (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. Antonie van Leeuwenhoek 73(4):331-371. doi: 10.1023/A:10011761008817

Li S , Spear RN, Andrews JH (1997) Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Aureobasidium pullulans* on microscope slides and leaf surfaces. Appl. Environ. Microbiol. 63 (8): 3261-3167

Little, AEF, Currie CR (2007) Symbiotic complexity: discovery of a fifth symbiont in the attine ant-microbe symbiosis. Biol Lett 3(5):501-504. doi: 10.1098/rsbl.2007.0253

Little AEF, Currie CR (2008) Black yeast symbionts compromise the efficiency of antibiotic defenses in fungus-growing ants. Ecology 89(5):1216-1222. doi:10.1890/07-0815.1

Magurran AE, Gill BJ (2011) Biological diversity: frontiers in measurement and assessment. Oxford University Press, Oxford

Mendes TD, Rodrigues A, Dayo-Owoyemi I, Marson FAL, Pagnocca FC (2012) Generation of nutrients and detoxification: possible roles of yeasts in leaf-cutting ant nests. Insects 3(1): 228-245. doi: 10.3390/insects3010228

Meyer W, Mitchoell TG, Freedman EZ, Vilgalyz R (1993) Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. J Clin Microbiol 31(9):2274-2280

- Middelhoven WJ, Fonseca A, Carreiro SC, Pagnocca FC, Bueno OC (2003) *Cryptococcus haglerorum*, sp. nov., an anamorphic basidiomycetous yeast isolated from nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. *Antonie van Leeuwenhoek* 83(2):167-174. doi: 10.1023/A:1023384830802
- Mueller UG (2012) Symbiont recruitment versus ant-symbiont co-evolution in the attine ant-microbe symbiosis. *Curr Opin Microbiol* 15(3):269-277. doi: 10.1016/j.mib.2012.03.001
- Pagnocca FC, Carreiro SC, Bueno OC, Hebling MJ, Silva OA (1996) Microbiological changes in the nests of leaf-cutting ants fed on sesame leaves. *J Appl Entomol* 120(1-5):317-320
- Pagnocca FC, Rodrigues A, Nagamoto NS, Bacci Júnior M (2008) Yeasts and filamentous fungi carried by the gynes of leaf-cutting ants. *Antonie van Leeuwenhoek* 94(4): 517-526. doi:10.1007/s10482-008-9268-5
- Pagnocca FC, Legaspe MFC, Rodrigues A, Ruivo CCC, Nagamoto NS, Bacci Júnior M, Forti LC (2010) Yeasts isolated from a fungus-growing ant nest, including the description of *Trichosporon chiarelli* sp. nov., an anamorphic basidiomycetous yeast. *Int J Syst Evol Microbiol* 60(6): 1454-1459. doi: 10.1099/ijs.0.015727-0
- Pagnocca FC, Rodrigues A, Bacci Júnior M (2011) Microrganismos associados às formigas-cortadeiras. In: Della-Lucia TMC (ed) *Formigas cortadeiras, da bioecologia ao manejo*, 1st edn. UFV, Viçosa pp 262-283
- Rodrigues A, Pagnocca FC, Bacci Júnior M, Hebling MJA, Bueno OC, Pfenning LH (2005) Variability of non-mutualistic filamentous fungi associated with *Atta sexdens rubropilosa* nests. *Folia Microbiol* 50(5):421-425
- Rodrigues A, Bacci Júnior M, Mueller UG, Ortiz A, Pagnocca FC (2008) Microfungal “weeds” in the leafcutter ant symbiosis. *Microb Ecol* 56(4): 604-514. doi: 10.1007/s00248-008-9380-0
- Rodrigues A, Cable RN, Mueller UG, Bacci Júnior M, Pagnocca FC (2009) Antagonistic interactions between garden yeasts and microfungus garden pathogens of leaf-cutting ants. *Antonie van Leeuwenhoek* 96(3): 331-342. doi: 10.1007/s10482-009-9350-7
- Rodrigues A, Silva A, Bacci Júnior M, Forti LC, Pagnocca FC (2010) Filamentous fungi found on foundress queens of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae). *J Appl Entomol* 134(4): 342-345. doi: 10.1111/j.1439-0418.2009.01466.x
- Rosa CA, Moraes PB, Santos SR, Peres Neto PR, Mendonça-Hagler, LC, Hagler AN (1995) Yeast communities associated with different plant resources in sandy coastal plains of southeastern Brazil. *Mycol Res* 99(9):1047-1054. doi: 10.1016/S0953-7562(09)80771-5
- Sampaio JP, Gadanho M, Santos S, Duarte FL, Pais C, Fonseca A, Fell JW (2001) Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodosporeidium*: *Rhodosporeidium kratochilovae* and related anamorphic species. *Int J Syst Evol Microbiol* 51(2): 687-697

Scott JJ, Budsberg KJ, Suen G, Wixons DL, Balsler TC, Currie CR (2010) Microbial community structure of leaf-cutter ant fungus gardens and refuse dumps. *PLoS One* 5(3). doi: 10.1371/journal.pone.0009922

Silva-Pinhati ACO, Bacci Júnior M, Hinkle G, Sogin ML, Pagnocca FC, Martins VG, Buneo OC, Hebling MJA (2004) Low variation in ribosomal DNA and internal transcribed spacers of the symbiotic fungi of leaf-cutting ants (Attini: Formicidae). *Braz J Med Biol Res* 37(10):1463-1472. doi: 10.1590/S0100-879X2004001000004

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28 (10): 2731-2739. doi: 10.1093/molbev/msr121

Weber NA (1972) Gardening ants: the attines. The American Philosophical Society, Philadelphia

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Skiksky JJ, White TJ (ed) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, pp 315-322

Table 3.1 Yeasts isolated from males of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* in two consecutive mating flights (2010 and 2011).

Species	Nest #1 2010 (n=50) ^a	Nest #1 2011 (n=50)	Nest #2 2011 (n=100)	Total
<i>Aureobasidium leucospermi</i>	5 ^b	2	37	44
<i>Aureobasidium pullulans</i>	24	0	0	24
<i>Candida maltosa</i>	0	1	0	1
<i>Cryptococcus flavescens</i>	18	1	7	26
<i>Cryptococcus flavus</i>	3	0	0	3
<i>Cryptococcus haglerorum</i>	0	28	0	28
<i>Cryptococcus laurentii</i>	2	5	0	7
<i>Cryptococcus nemorosus</i>	10	3	0	13
<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>	0	0	2	2
<i>Cryptococcus</i> sp. 1	7	1	2	10
<i>Cryptococcus</i> sp. 2	1	0	2	3
<i>Debaryomyces hansenii</i>	0	0	1	1
<i>Hannaella kunmingensis</i>	2	0	0	2
<i>Hannaella luteola</i>	0	1	6	7
<i>Hannaella sinensis</i>	4	0	0	4
<i>Hannaella</i> sp. 1	3	2	6	11
<i>Hannaella</i> sp. 2	0	1	0	1
<i>Hannaella zeae</i>	2	0	0	2
<i>Kazachstania unispora</i>	1	0	0	1
<i>Rhodospiridium babjevae</i>	1	4	0	5
<i>Rhodospiridium lusitaniae</i>	3	0	0	3
<i>Rhodotorula dairenensis</i>	2	0	0	2
<i>Rhodotorula glutinis</i>	5	0	0	5
<i>Rhodotorula marina</i>	1	0	0	1
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	11	2	0	13
<i>Rhodotorula nothofagi</i>	2	1	0	3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	0	0	1
<i>Trichosporon chiarellii</i>	0	18	0	18
<i>Trichosporon</i> sp.	0	1	0	1
Total number of isolates	108	71	63	242
Species richness (<i>S</i>)	21	15	8	29

^a Figures in parentheses indicate the number of males collected from each nest.

^b Figures indicate the number of yeasts isolated from each sample.

Table 3.2 Abundance of isolates, species richness and diversity indexes of yeasts isolated from integument of males of *Atta sexdens rubropilosa* in two nests and two consecutive mating flights.

Sample	Number of isolates	Species Richness (S)	Chao 1	Simpson (1/D)	Shannon
Nest #1 (2010)	108	21	22.6 (21.2, 32.9)	9.79	2.55
Nest #1 (2011)	71	15	20.2 (16.0, 42.6)	4.49	1.92
Nest #2 (2011)	63	08	8.0 (8.0, 8.1)	2.71	1.4

Table 3.3 Yeasts isolated from the soil of nest tunnels and soil collected 10 m away of nests of *Atta sexdens rubropilosa* in two consecutive years.

Species	Nest #1 2011		Nest #2 2011		Total
	2011-TS	2011-CS	2011-TS	2011-CS	
<i>Candida maltosa</i>	0	2	0	0	2
<i>Candida pseudolambica</i>	0	0	1	0	1
<i>Candida sp.</i>	0	0	1	0	1
<i>Cryptococcus laurentii</i>	5	3	1	0	9
<i>Cryptococcus nemorosus</i>	1	0	0	0	1
<i>Cryptococcus podzolicus</i>	3	1	0	2	6
<i>Rhodosporidium babjevae</i>	0	1	0	0	1
<i>Torulaspora globosa</i>	0	2	0	0	2
<i>Trichosporon chiarellii</i>	0	0	10	0	10
Total	9	9	13	2	33

TS: Yeasts isolated from soil of tunnels of the nests where the males were collected; CS: yeasts isolated from control soil away 10 m of the nests. The numbers inside the table show the total yeasts isolated and identified from each species in the sample.

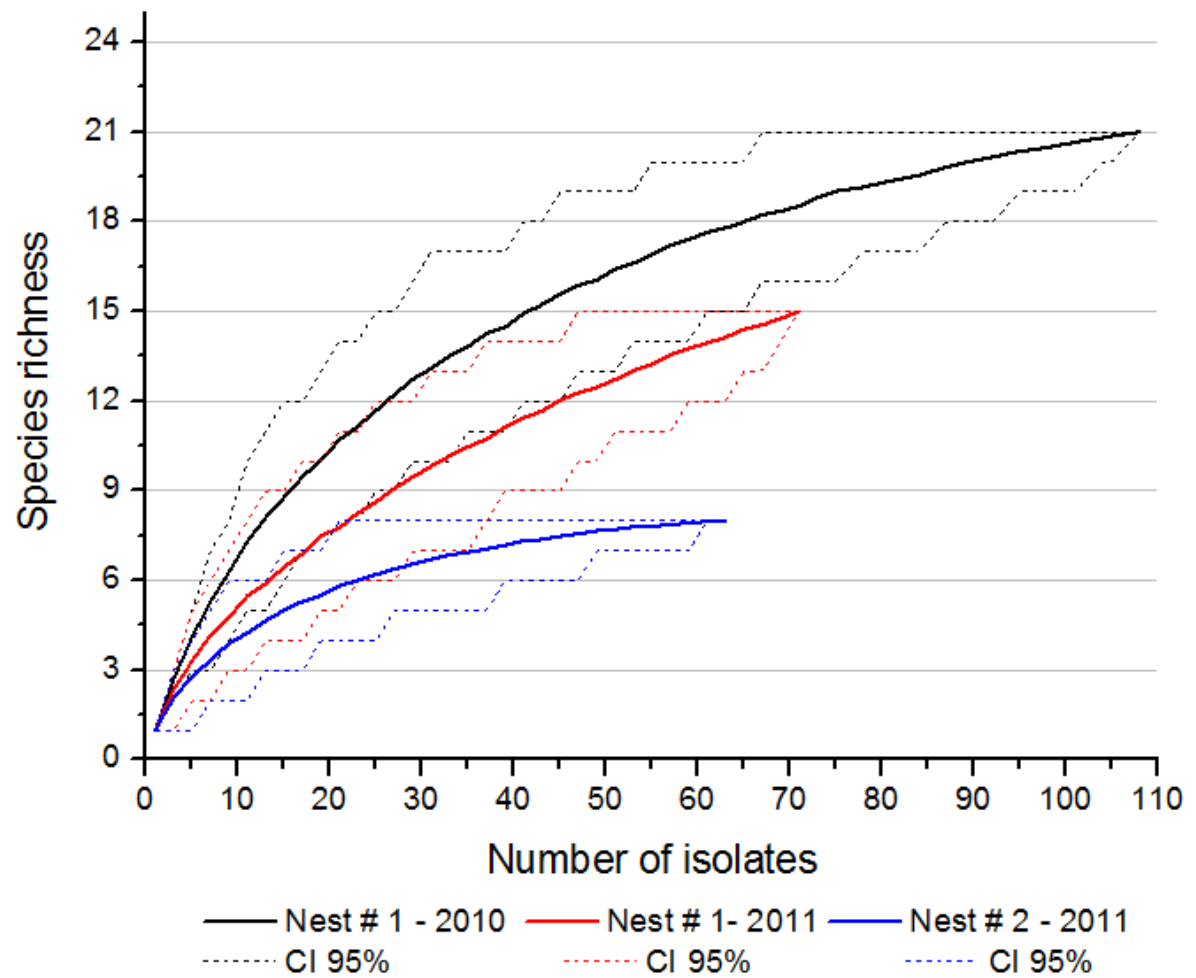


Fig. 3.1 Individual-based rarefaction curves of yeasts species recovered from the integument of males of *Atta sexdens rubropilosa*. Solid lines represent rarefaction curves of yeast species from alates collected from different nests in two consecutive mating flights. Dashed lines represent the confidence intervals (CIs) of 95%.

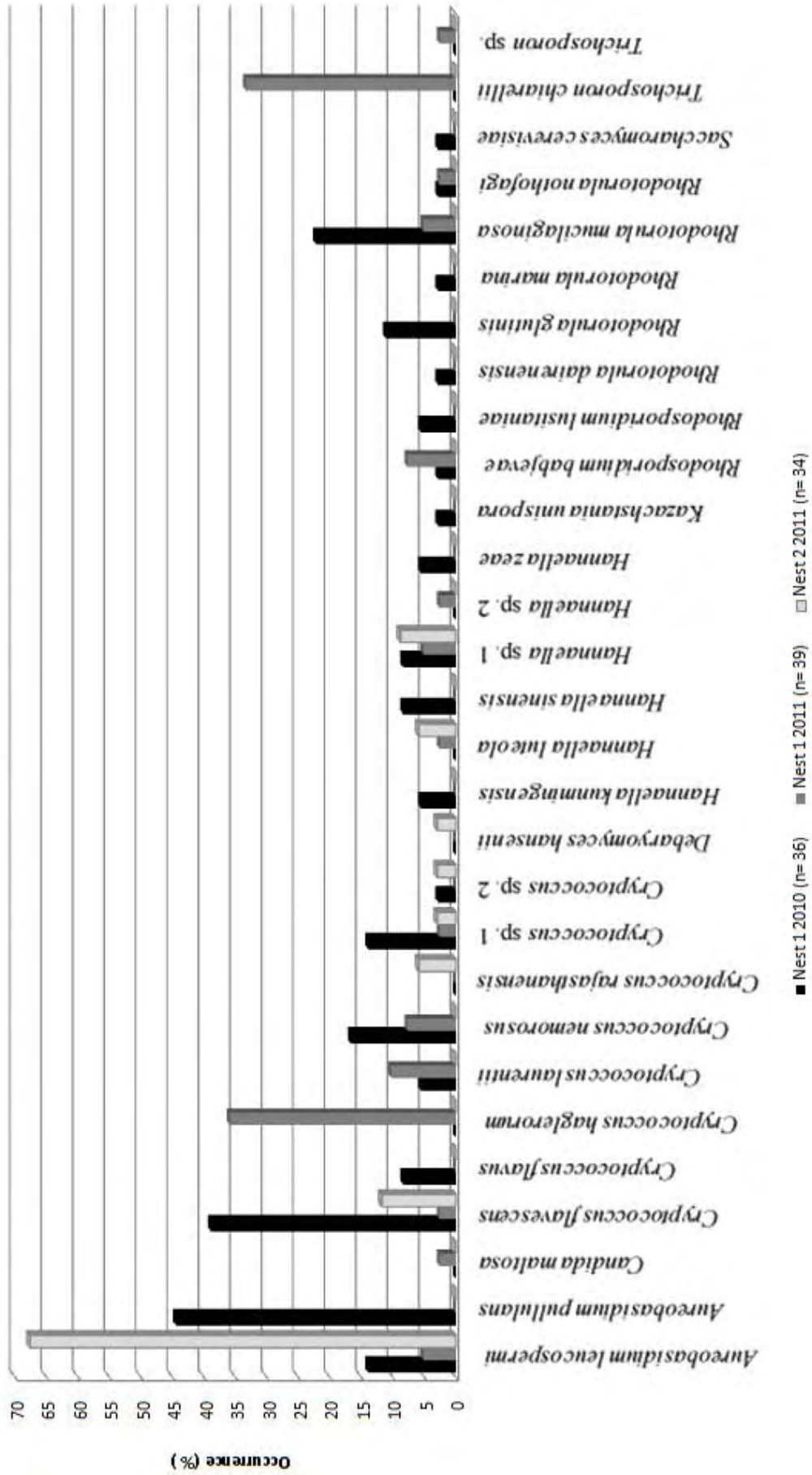


Fig. 3.2 Proportion of yeasts found on the integument of males of *Atta sexdens rubropilosa* from two different nests collected in consecutive mating flights (2010 and 2011). Numbers in parentheses indicate the total number of males from which yeasts were isolated.

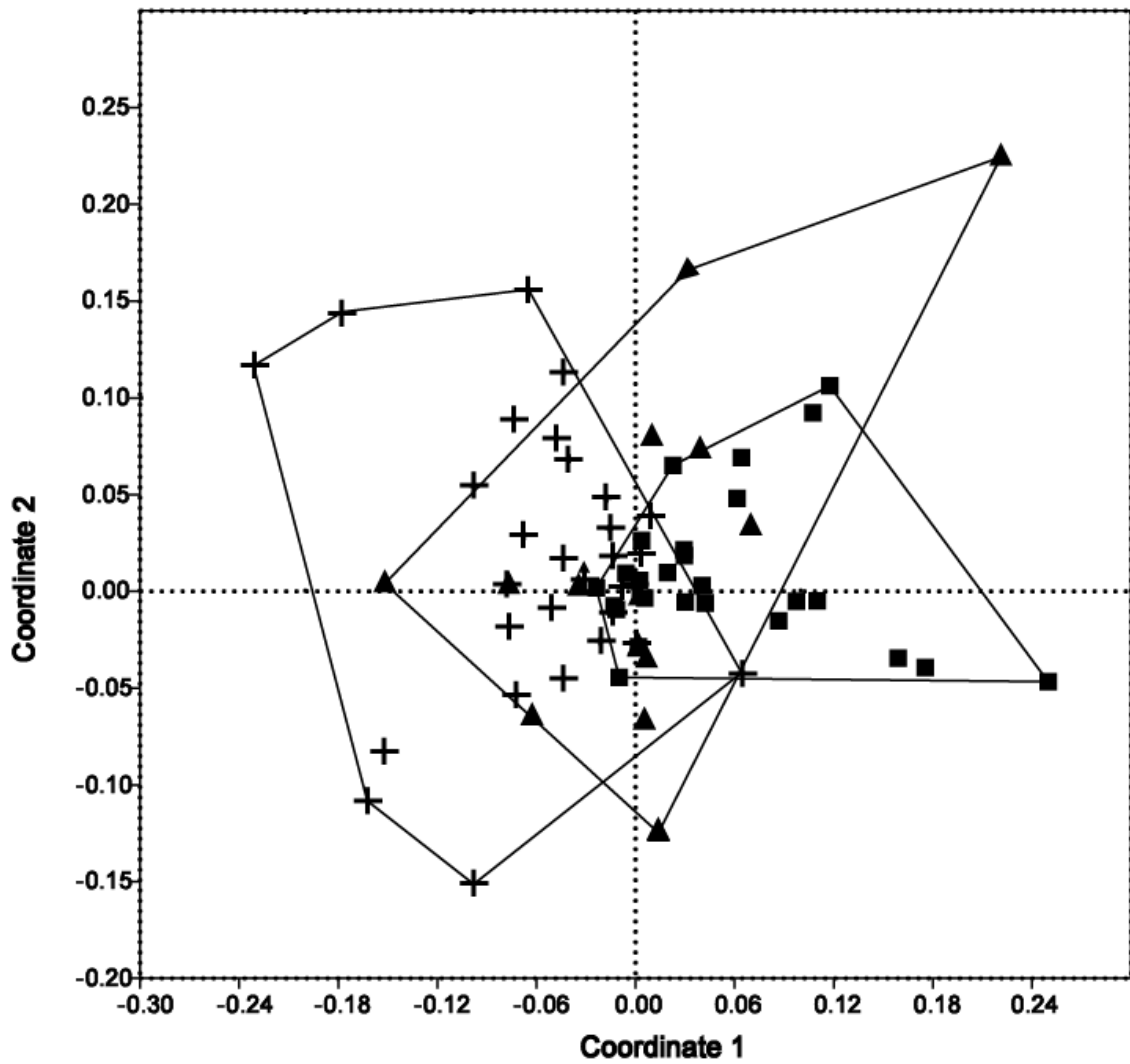


Fig. 3.3 Non-metric multidimensional scaling (NMDS) distribution of yeasts in the samples calculated with Euclidian similarity measure. Yeasts isolated from the males integument of *Atta sexdens rubropilosa* from nest #1 in 2010 (+); nest #1 in 2011 (▲) and from nest #2 in 2011 (■).

3.6 Supplementary material

Dispersion of yeasts by winged males of *Atta sexdens rubropilosa*

Silvio Lovato Arcuri, Fernando Carlos Pagnocca, Weilan Gomes da Paixão Melo, Nilson Satoru Nagamoto, André Rodrigues

Contents

Fig. S3.1 Neighbour-joining tree obtained with D1/D2 sequences of rDNA of *Aureobasidium pullulans* and *Aureobasidium leucospermi*. The tree was generated using MEGA v 5.05 under the Kimura-2 parameters nucleotide substitution model. Numbers on branches indicate bootstrap values from 1000 pseudoreplicates (values lower than 50% are not shown). Scale bar indicate 0.01 substitutions per site. *Teratosphaerica dimorpha* was used as outgroup. Isolates preceded of code LB were isolated from males' integument of *Atta sexdens rubropilosa* followed by the nest number and year when the males were collected. Accessions numbers of GenBank, ATTC (American Type Culture Collection) or CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures) are also shown.

Fig. S3.2 Estimated and observed species richness yeasts found in males' integument from different samples of *Atta samples rubropilosa*. Black solid lines represent the observed species richness. Red solid lines represents the Chao 1 estimator. Dotted lines represent the confidence intervals (CIs 95%). a: yeasts isolated from males' integument of nest #1 in 2010; b: yeasts isolated from males' integument of nest #1 in 2011; c: yeasts isolated from males' integument of nest #2 in 2011..

TABLE S3.1 Yeasts isolated from the integument of males of *Atta sexdens rubropilosa* and identified according to molecular markers.

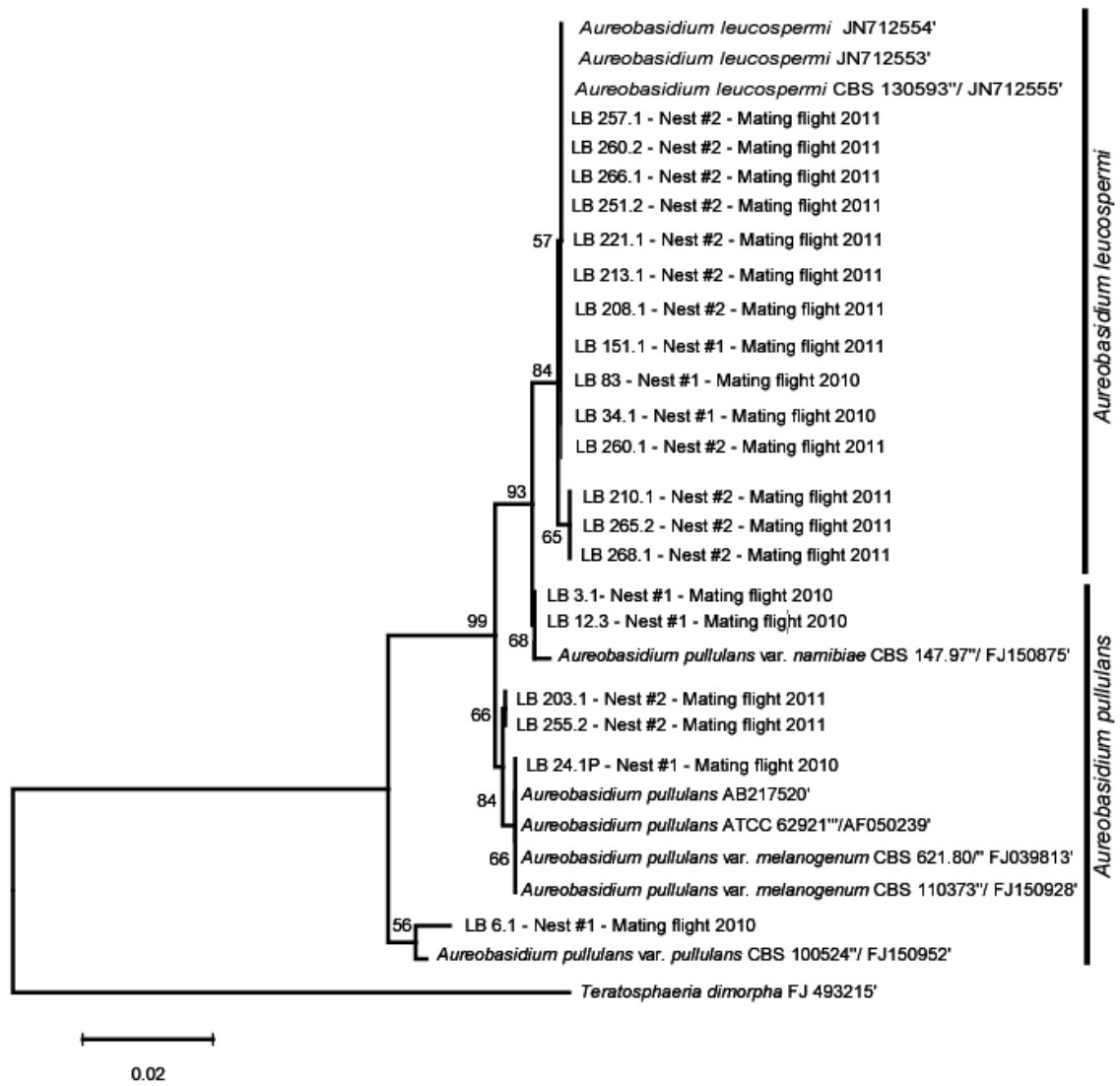


Fig. S3.1

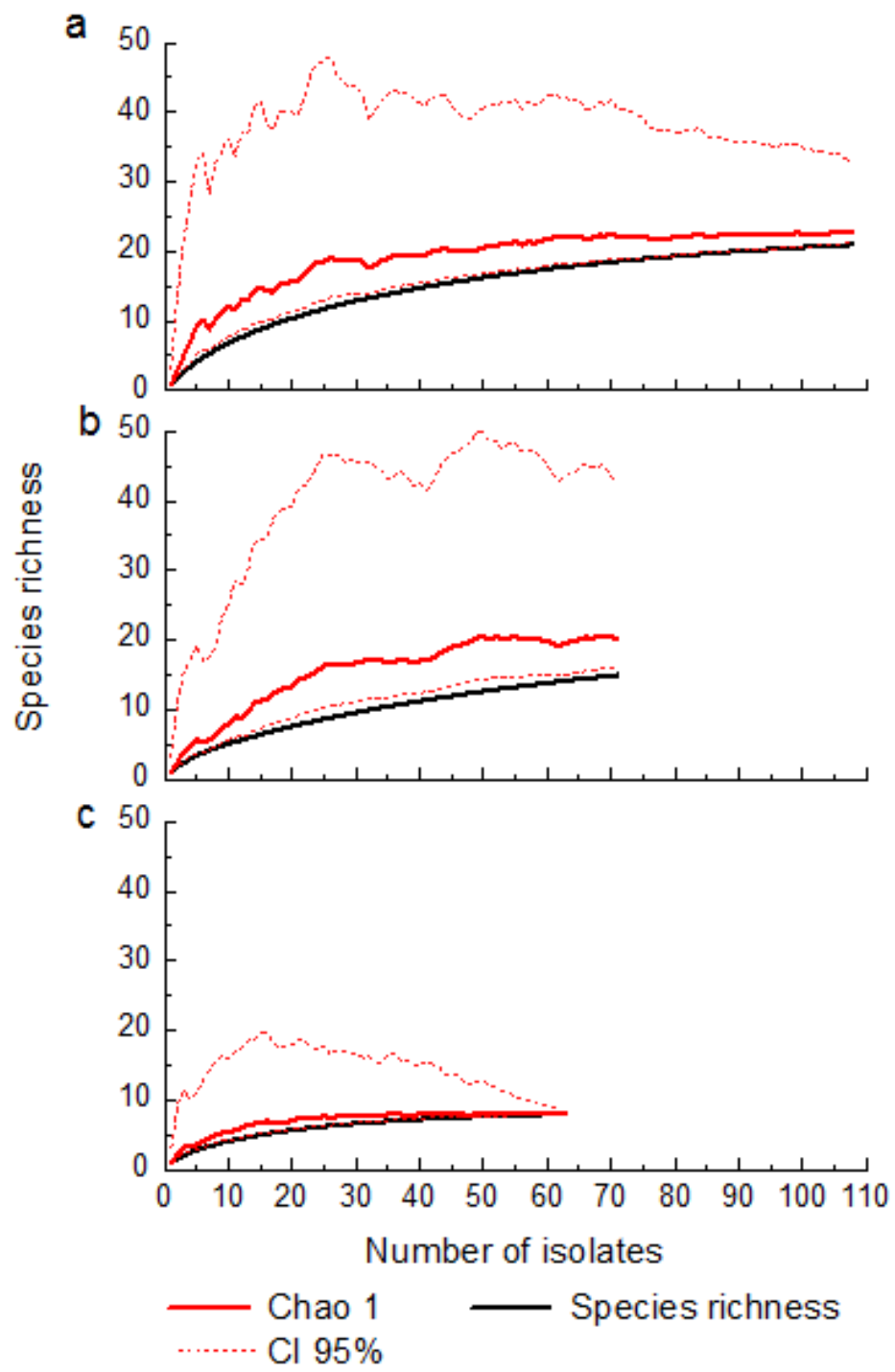


Fig. S3.2

TABLE S3.1 Yeast identification according to molecular markers of strains isolated from males of *Atta sexdens rubropilosa*

Species	DI/D2 SSU rDNA				ITS				² MSP-PCR grouping
	GenBank		CBS		GenBank		CBS		
	%	Accession #	%	Accession #	%	Accession #	%	Accession #	
<i>Aureobasidium leucospermii</i>	571	99	JN712553	-	-	-	-	-	LB 3.1*, LB 12.3*
<i>Aureobasidium leucospermii</i>	573	100	JN712553	-	-	-	-	-	LB 34.1*, LB 257.1*, LB 202.1, LB 212.1, LB 216.1, LB 220.1, LB 221.2, LB 222.1, LB 256.1, LB 256.3, LB 257.2, LB 257.3
<i>Aureobasidium leucospermii</i>	571	100	JN712553	-	-	-	-	-	LB 83*, LB 86*, LB 213.1*, LB 200.1, LB 209.1, LB 260.1*, LB 260.2*, LB 221.1*, LB 204.1, LB 206.1, LB 264.1, LB 264.2, LB 266.1*, LB 266.2 LB 151.1*, LB 102.1
<i>Aureobasidium leucospermii</i>	554	100	JN712553	-	-	-	-	-	LB 203.1*, LB 255.2*, LB 255.1, LB 255.3
<i>Aureobasidium leucospermii</i>	571	99	JN712553	-	-	-	-	-	LB 208.1*
<i>Aureobasidium leucospermii</i>	575	100	JN712553	-	-	-	-	-	LB 210.1*, LB 265.2*, LB 265.1, LB 265.3
<i>Aureobasidium leucospermii</i>	571	99	JN712553	-	-	-	-	-	LB 251.2*, LB 251.1, LB 251.3
<i>Aureobasidium leucospermii</i>	543	100	JN712553	-	-	-	-	-	LB 268.1*, LB 268.2
<i>Aureobasidium leucospermii</i>	529	99	JN712553	-	-	-	-	-	LB 6.1*, LB 111.1, LB 15.2, LB 16, LB 23, LB 31.1, LB 31.2, LB 34.2, LB 36.1, LB 38.1, LB 43.1, LB 44.1, LB 50.1, LB 50.2, LB 54.1, LB 60.1, LB 63.2, LB 65.1, LB 65.2, LB 79.1B, LB 80.1, LB 80.2, LB 89 LB 24.1P*
<i>Aureobasidium pullulans</i>	571	99	FI150916	99.2	CBS 146.30	-	-	-	LB 377.2*, LB 112.1, LB 372.1
<i>Aureobasidium pullulans</i>	571	100	EF595769	100	CBS110373	-	-	-	LB 361.1*
<i>Candida maltosa</i>	541	99	EF120603	99.6	CBS5612	-	-	-	LB 363.1*
<i>Candida pseudolambica</i>	555	99	EF550235	100	CBS7777	-	-	-	LB 5.1*, LB 13.1
<i>Candida sp.</i>	533	98	EF216313	-	-	-	-	-	LB 18.1*, LB 1.4, LB 12.1, LB 18.2, LB 82.2
<i>Cryptococcus flavescens</i>	597	100	AF487885	100	CBS6473	535	99	AM160631	
<i>Cryptococcus flavescens</i>	597	99	AF487885	99.1	CBS6473	-	-	-	

Table S3.1 (Continue)

Species	DI/D2 SSU rDNA				ITS				² MSP-PCR grouping	
	GenBank		CBS		GenBank		CBS			
	¹ bp	%	Accession #	%	Accession #	%	Accession #	%		
<i>Cryptococcus flavescens</i>	597	100	AF487885	100	CBS6473	100	AM160631	100	CBS9956	LB 35.1*, LB 45.1, LB 45.2, LB 69.1
<i>Cryptococcus flavescens</i>	597	98	AF487885	99,4	CBS8366	98,17	EF056301	98,17	CBS8358	LB 52.1*
<i>Cryptococcus flavescens</i>	662	99	AF487885	99,8	CBS6473	100	AM160631	100	CBS9956	LB 79.1A*
<i>Cryptococcus flavescens</i>	597	100	AF487885	100	CBS6473	100	AM160631	100	CBS9956	LB 82.1*
<i>Cryptococcus flavescens</i>	597	99	AF487885	99,1	CBS6473	98,4	FN428902	98,4	CBS4839	LB 82.2*
<i>Cryptococcus flavescens</i>	596	100	AF487885	100	CBS6473	100	AM160631	100	CBS9956	LB 84*
<i>Cryptococcus flavescens</i>	598	100	AF487885	100	CBS6473	99,4	AM160631	99,4	CBS9956	LB 103.2*
<i>Cryptococcus flavescens</i>	597	100	AF487885	100	CBS6473	100	AM160631	100	CBS9956	LB 252.1*
<i>Cryptococcus flavescens</i>	589	100	AF487885	100	CBS6473	99,8	AM160631	99,8	CBS9956	LB 252.2*, LB 267.1
<i>Cryptococcus flavescens</i>	595	100	AF487885	100	CBS6473	100	AM160631	100	CBS8356	LB 254.2*, LB 250.1, LB 250.2, LB 250.3
<i>Cryptococcus flavus</i>	597	99	AF075497	98,9	CBS331 ^T	-	-	-	-	LB 5.2*, LB 76.1
<i>Cryptococcus flavus</i>	594	99	AF075497	99,4	CBS331 ^T	-	-	-	-	LB 67.2*
<i>Cryptococcus haglerorum</i>	561	100	AF407276	100	CBS8902 ^T	-	-	-	-	LB 108.1*, LB 108.2 LB 108.3
<i>Cryptococcus haglerorum</i>	578	100	AF407276	100	CBS8902 ^T	-	-	-	-	LB 131.2*, LB 104.1 LB 104.2, LB 104.3, LB 105.1, LB 105.2, LB 113.1 LB 115.1, LB 116.1, LB 116.2, LB 117.1, LB 118.1, LB 120.1, LB 120.2, LB 129.1, LB 129.2, LB 131.1, LB 142.1, LB 142.2, LB 143.1, LB 147.1, LB 153.1, LB 155.1, LB 157.1, LB 158.1
<i>Cryptococcus laurentii</i>	597	100	AY315663	100	CBS7140	-	-	-	-	LB 121.1*, LB 364.1*, LB 144.1, LB 373.1*, LB 377.1*, LB 125.1, LB 125.2, LB 365.1, LB 365.2
<i>Cryptococcus laurentii</i>	569	100	AY315663	100	CBS7140	-	-	-	-	LB 124.1*
<i>Cryptococcus laurentii</i>	579	99	AY315663	100	CBS7140	-	-	-	-	LB 367.1*, LB 365.3, LB 369.1
<i>Cryptococcus laurentii</i>	597	99	AY315663	99,8	CBS7140	-	-	-	-	LB 378.1*

Table S3.1 (Continue)

Species	DI/D2 SSU rDNA				ITS				² MSP-PCR grouping
	GenBank		CBS		GenBank		CBS		
	¹ bp	%	Accession #	%	Accession #	%	Accession #	%	
<i>Cryptococcus laurentii</i>	597	100	AY315663	99,3	CBS7140	-	-	-	LB 1.2*, LB 4.1
<i>Cryptococcus nemorosus</i>	590	99	AF472625	98,9	CBS9606 ^T	-	-	-	LB 144.2*, LB 101.1
<i>Cryptococcus nemorosus</i>	597	99	AF472625	98,9	CBS9606 ^T	-	-	-	LB 145.1*, LB 369.2*, LB 57.1*, LB 57.2
<i>Cryptococcus nemorosus</i>	578	99	AF472625	98,9	CBS9606 ^T	-	-	-	LB 12.4*, LB 70.2, LB 85.2, LB 59.2, LB 72.1
<i>Cryptococcus nemorosus</i>	571	99	AF472625	98,9	CBS9606 ^T	-	-	-	LB 20.1*, LB 62.1*
<i>Cryptococcus nemorosus</i>	657	99	AF472625	98,9	CBS9606 ^T	-	-	-	LB 85.1*
<i>Cryptococcus podzolicus</i>	592	99	AF075481	100	CBS 6490	-	-	-	LB 353.1*
<i>Cryptococcus podzolicus</i>	586	99	AF075481	100	CBS 7143	-	-	-	LB 366.1*, LB 354.1
<i>Cryptococcus podzolicus</i>	592	99	AF075481	99,8	CBS7143	-	-	-	LB 366.2*, LB 355.1
<i>Cryptococcus podzolicus</i>	591	99	AF075481	100	CBS 7143	-	-	-	LB 368.2*, LB 373.2
<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>	597	100	AM262324	100	CBS10406 ^T	-	-	-	LB 267.2*, LB 269.1*
<i>Cryptococcus</i> sp.	564	99	EU002805	99,6	CBS10081	-	-	-	LB 17.3*, LB 17.1, LB 48.1, LB 17.2, LB 12.2
<i>Cryptococcus</i> sp.	594	99	EU002805	99,8	CBS10181	-	-	-	LB 47.2*
<i>Cryptococcus</i> sp.	599	99	EU002805	99,8	CBS10181	-	-	-	LB 141.1*, LB 10.1*, LB 67.1
<i>Cryptococcus</i> sp.	560	99%	HQ591443	-	-	-	-	-	LB 258.1*, LB 258.2
<i>Cryptococcus</i> sp.	559	99	EU002805	99,8	CBS10181	-	-	-	LB 270.2*, LB 270.1
<i>Debaryomyces hansenii</i>	571	100	AJ716108	100	CBS9683	-	-	-	LB 201.1*
<i>Hannaella kummingensis</i>	597	100	AF444703	100	CBS8367	-	-	-	LB 63.1*
<i>Hannaella kummingensis</i>	603	100	AF444703	100	CBS8367	-	-	-	LB 49.1*
<i>Hannaella luteola</i>	597	99	AJ555466	98,9	CBS943 ^T	-	-	-	LB 159.2*
<i>Hannaella luteola</i>	584	99	AJ555466	100	CBS943 ^T	-	-	-	LB 273.1*, LB 271.1, LB 271.2, LB 272.1, LB 272.2, LB 273.2
<i>Hannaella sinensis</i>	594	100	AF189857	100	CBS7225	-	-	-	LB 37.1*, LB 87, LB73.1, LB 37.2*

Table S3.1 (Continue)

Species	DI/D2 SSU rDNA				ITS				² MSP-PCR grouping
	GenBank		CBS		GenBank		CBS		
	%	Accession #	%	Accession #	%	Accession #	%	Accession #	
<i>Hannaella</i> sp.	596	100	AF444705	100	CBS8369	-	-	-	LB 51.1*, LB 119.1*, LB 254.1*
<i>Hannaella</i> sp.	597	100	AF444705	100	CBS8369	-	-	-	LB 52.3*
<i>Hannaella</i> sp.	569	99	AF444705	99.8	CBS8369	-	-	-	LB 53.1*
<i>Hannaella</i> sp.	536	99	FI844398	-	-	-	-	-	LB 123.1*
<i>Hannaella</i> sp.	587	100	AF444705	100	CBS8369	-	-	-	LB 128.1*
<i>Hannaella</i> sp.	592	100	AF444705	100	CBS8369	-	-	-	LB 259.2*, LB 253.1, LB 253.2, LB 253.3, LB 259.1
<i>Hannaella zeae</i>	597	99	JQ754112	99.3	CBS10801 ^T	-	-	-	LB 37.3*
<i>Hannaella zeae</i>	597	100	JQ754112	100	CBS10801 ^T	-	-	-	LB 75.1*
<i>Kazachstania unispora</i>	562	99	AY007916	99.1	CBS2420	-	-	-	LB 52.2*
<i>Rhodospiridium babjevae</i>	574	99	AF389826	99.3	CBS322	-	-	-	LB 70.1*, LB 109.1*, LB 371.1*, LB 134.1
<i>Rhodospiridium babjevae</i>	575	99	AF389828	99.3	CBS7809	-	-	-	LB 139.2*, LB 139.1
<i>Rhodospiridium lusitaniae</i>	589	99	AF070423	99.1	CBS7604 ^T	-	-	-	LB 14.1*, LB 4.2, LB 14.2
<i>Rhodotorula glutinis</i>	564	99	AY646097	99.4	CBS208919	-	-	-	LB 26*, LB 46.1, LB 71.1, LB 21, LB 58.1
<i>Rhodotorula glutinis</i>	571	100	AF387146	100	CBS7715	-	-	-	LB 61.1*, LB 60.2
<i>Rhodotorula marina</i>	599	99	AF189944	98.4	CBS2365 ^T	-	-	-	LB 68.1*
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	570	99	AF406911	99.1	CBS8987	-	-	-	LB 47.1*, LB 35.2, LB 24.1R, LB 2.2, LB 23.2
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	571	99	FN428899	99.8	CBS11729	-	-	-	LB 66.1*, LB 72.2*, LB 78.1*, LB 77.1, LB 78.2, LB 88, LB 100.1*, LB 159.1
<i>Rhodotorula nothofagi</i>	588	100	AF444736	100	CBS9091	-	-	-	LB 30.1*, LB 30.2*
<i>Rhodotorula nothofagi</i>	551	100	AF444736	100	CBS9091	-	-	-	LB 133.1*
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	572	100	JQ689017	100	CBS6333	-	-	-	LB 55.1*
<i>Torulasporea globosa</i>	573	100	AB499988	100	CBS5116	-	-	-	LB 376.1*, LB 372.2
<i>Trichosporon chigarelli</i>	590	100	EU030272	100	CBS11177 ^T	-	-	-	LB 110.1*

Table S3.1 (Continue)

Species	DI/D2 SSU rDNA				ITS				² MSP-PCR grouping	
	GenBank		CBS		GenBank		CBS			
	¹ bp	%	Accession #	%	Accession #	%	Accession #	%		Accession #
<i>Trichosporon chitarellii</i>	582	100	EU030272	100	CBS11177 ^T	-	-	-	-	LB 130.1*, LB 122.1, LB 126.1,
<i>Trichosporon chitarellii</i>	597	100	EU030272	100	CBS11177 ^T	-	-	-	-	LB 127.1, LB 132.1, LB 140.1, LB 140.2, LB 148.1, LB 150.2, LB 362.1, LB 362.4
<i>Trichosporon chitarellii</i>	596	100	EU030272	100	CBS11177 ^T	-	-	-	-	LB 137.3*, LB 106.1, LB 107.1, LB 127.2, LB 135.1, LB 137.1, LB 137.2, LB 150.1
<i>Trichosporon coprophilum</i>	571	99	AB180199	-	-	-	-	-	-	LB 259.2*, LB 359.1, LB 362.3*, LB 357.1, LB 357.2, LB 358.1, LB 358.2, LB 362.2
<i>Trichosporon scarabaeorum</i>	596	100	AB164372	100	CBS5601 ^T	-	-	-	-	LB 352.1*
<i>Trichosporon</i> sp.	587	-	-	-	-	-	-	-	-	LB 154.1*

* Sequenced strains; ¹bp: base pairs; ²sequences grouped by microsatellite primed technique (MSP-PCR).

^T Type strain.

4 CAPÍTULO 2

CONTRIBUIÇÃO NA DEGRADAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL NOS JARDINS DE FUNGO POR LEVEDURAS TRANSPORTADAS PELOS BITUS DE *Atta sexdens* *rubropilosa*

RESUMO

Fêmeas (içás) e machos (bitus) alados de formigas do gênero *Atta* anualmente realizam o voo nupcial, onde acasalam e provavelmente transferem micro-organismos entre seus corpos. Nos jardins de fungo, leveduras podem contribuir na degradação do material vegetal e assimilação de compostos danosos às formigas. Nesse contexto, avaliamos a contribuição de bitus de *Atta sexdens rubropilosa* na dispersão de leveduras capazes de degradar compostos presentes no material vegetal. Além disso, verificamos a capacidade de assimilação dos açúcares gerados pela degradação desses compostos vegetais pelas leveduras. Foram realizados testes qualitativos com 242 estirpes isoladas de bitus de *A. sexdens rubropilosa* e 31 estirpes isoladas de solo dos túneis dos ninhos e solos próximos aos ninhos, quanto à capacidade de produção de amilase, celulase (CMCase), ligninases, lipase, xilanase e pectinases (hidrólise da pectina e ácido poligalacturônico). Também foram realizados testes fisiológicos quanto à capacidade de assimilação de ácido galacturônico, celobiose, glicose, maltose e xilose pelas estirpes isoladas do corpo dos bitus. Das 242 estirpes isoladas do corpo dos bitus, 211 (87,1%) produziram ao menos uma das enzimas. Lipase foi produzida por 50,8% dessas estirpes, a pectina foi hidrolisada por 43,4% das estirpes e ácido poligalacturônico por 42,1%. CMCase foi produzida por 37,6% e xilanase por 36,4%. Esses dados mostram que bitus carregam leveduras capazes de degradar o material vegetal presente nos jardins de fungo, destacando espécies do gênero *Aureobasidium*, frequentemente produtores da maioria das enzimas avaliadas, revelando ser uma importante levedura na ecologia dos jardins de fungo. Como resultado da degradação desses compostos vegetais, nutrientes de fácil assimilação são gerados e tornam-se disponíveis nos jardins de fungo. Embora todas as leveduras isoladas do integumento dos bitus foram capazes de assimilar glicose, 80,5%, 95,8% e 93,8% assimilaram celobiose, maltose e xilose, respectivamente, mostrando que, além de gerar os açúcares livres, também podem utiliza-los como nutrientes, provavelmente competindo com o fungo mutualista e outros micro-organismos encontrados nos jardins de fungo. Por outro lado a assimilação de ácido galacturônico por 70,6% das leveduras, composto danoso às formigas, e praticamente não utilizado pelo fungo mutualista, coloca as leveduras com agentes importantes na manutenção da homeostase desse microhabitat.

4.1 Introdução

Os gêneros *Atta* e *Acromyrmex* são conhecidos popularmente como formigas cortadeiras, pois utilizam folhas e flores como substrato para o cultivo de um fungo. Esses insetos pertencem à tribo Attini (Hymenoptera: Formicidae), a qual compreende aproximadamente 297 espécies de formigas cultivadoras de fungos (BRANDÃO, MAYHÉ-NUNES, SANHUDO, 2011). Juntamente com os gêneros *Sericomyrmex* e *Trachymyrmex*, as formigas cortadeiras fazem parte de um grupo derivado filogeneticamente da tribo Attini (SCHULTZ; BRADY, 2008). Membros desse grupo cultivam fungos basidiomicetos que apresentam nas extremidades das hifas, vesículas ricas em nutrientes conhecidas como gongilídeos (WEBER, 1972). As formigas cortadeiras cultivam em seus ninhos o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* (Basidiomycota: Agaricales), utilizado como alimento por esses insetos (SILVA-PINHATI et al., 2004).

Devido aos hábitos de cortar folhas e flores frescas, as formigas cortadeiras são consideradas pragas agrícolas, especialmente quando ocorre em áreas de reflorestamento. As formigas oferecem o substrato vegetal para o fungo mutualista, o qual utiliza como fonte nutricional para seu crescimento (SIQUEIRA et al., 1998, SILVA et al., 2006; DELLA-LUCIA; SOUZA, 2011). Os fungos são utilizados como única fonte de alimento pelas larvas, as quais consomem exclusivamente os gongilídeos (WEBER, 1966).

Sabe-se que a degradação do substrato vegetal nos jardins de fungo não é realizada exclusivamente pelo fungo *L. gongylophorus* (BACCI JÚNIOR et al., 1995, MENDES et al., 2012). Em cultura pura, o fungo é capaz de degradar pectina em proporções mais elevadas do que outros polissacarídeos como amido, xilana e celulose (SIQUEIRA et al., 1998, SILVA et al., 2006). Este último polímero é degradado em níveis não significativos em cultura pura (ABRIL; BUCHER, 2002; ERTHAL JÚNIOR et al., 2009); entretanto, a atividade celulolítica é observada nos jardins de fungo (D'ETTORRE et al., 2002; ERTHAL JÚNIOR et al., 2009). Portanto, a atividade enzimática dentro desse habitat pode ser proveniente de outras fontes biológicas, como por exemplo, a complexa comunidade de bactérias (SUEN et al., 2010) e leveduras presentes nos jardins de fungo, capazes de degradar os polissacarídeos vegetais, incluindo a celulose (MENDES et al., 2012).

Ninhos de formigas do gênero *Atta* produzem anualmente uma elevada quantidade de castas reprodutivas aladas, as quais deixam os ninhos parentais para acasalarem durante o voo nupcial (AUTUORI, 1941; HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). A constatação que o

integumento das castas aladas apresenta micro-organismos aderidos, pode ser indicador da comunidade microbiana existente nos ninhos desses insetos, visto que esses indivíduos são criados nos jardins de fungo e permanecem nesse local até o dia do voo nupcial. O isolamento de leveduras de castas aladas foi realizado por Pagnocca et al. (2008), os quais amostraram iças de *Atta capiguara* e *Atta laevigata* momentos após saírem dos ninhos para o voo nupcial. Os autores encontraram uma baixa riqueza e abundância de espécies de leveduras associadas ao integumento dessas formigas.

Considerando que as iças são as responsáveis pela fundação de um novo ninho (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990) e que a mesma fêmea pode acasalar com três até oito machos (KERR, 1961), é possível que os bitus transmitam leveduras do integumento para as fêmeas. Desse modo, os bitus podem atuar como vetores de leveduras que serão incorporadas na microbiota do novo ninho. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar se as leveduras presentes no integumento de bitus de *Atta sexdens rubropilosa* apresentam a capacidade de degradar polissacarídeos vegetais e outros compostos presente nos jardins de fungo. Adicionalmente, foi avaliado a capacidade das leveduras em assimilar as fontes de carbono resultantes da degradação do material vegetal. Os resultados sugerem que as leveduras isoladas desses insetos apresentam um elevado potencial enzimático e assimilativo, o que demonstra a importância desses micro-organismos como parte da microbiota dos ninhos.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Origem das estirpes

Um total de 273 estirpes de leveduras provenientes da coleção de cultura do Centro de Recursos Microbianos (CRM), situado na Universidade Estadual Paulista ‘Júlio de Mesquita Filho’ (UNESP), Rio Claro, SP, foram utilizadas para a triagem enzimática. Dessas, 242 estirpes (29 espécies) foram isoladas do integumento de bitus de *A. sexdens rubropilosa* e 31 estirpes (9 espécies) foram isoladas de solos dos túneis dos ninhos por onde esses bitus caminharam e de solos distantes a 10 metros dos ninhos. As estirpes provenientes das amostras de solos foram utilizadas nesse trabalho com o intuito de comparar se leveduras de outros ambientes também apresentam o mesmo perfil de produção de enzimas hidrolíticas que as leveduras do integumento dos bitus.

Das leveduras isoladas dos bitus, 108 estirpes, compreendidas em 21 espécies, foram isoladas de bitus do ninho #1 (SLA100918-01), localizado na cidade de Rio Claro, SP (GPS: S22°23'705'' e W47°32'544'') em 2010. Adicionalmente, 71 estirpes (compreendendo 15 espécies) foram isoladas de bitus do mesmo ninho em 2011 e 63 estirpes (compreendendo 8 espécies) foram isoladas de bitus do ninho #2 (SLA111012-01), localizado na cidade de Botucatu, SP (S22°50'643'' e W48°26'086'') em 2011.

O isolamento, purificação, estocagem e identificação polifásica das leveduras foram descritos detalhadamente no capítulo 1 (ver material e métodos, p. 26-27).

4.2.2 Ensaio enzimáticos

A triagem enzimática foi realizada utilizando o método de alta eficiência (*high throughput screening*). Para tanto, cada estirpe foi incubada durante 24 horas em 150 µL de meio basal *Yeast Nitrogen Base* (YNB) a 0,67%, acrescido de 0,3% de glicose. As estirpes foram incubadas em placa de Elisa (96 poços). Após o período de incubação, com auxílio de um replicador estéril, as suspensões de leveduras dos poços da placa de Elisa foram transferidas para placas de Petri contendo os meios de cultivo com os substratos para a avaliação da atividade enzimática extracelular. As placas foram incubadas a 25 °C durante cinco dias e os resultados foram avaliados. Para os experimentos de determinação da atividade ligninolítica, as placas foram incubadas por até 21 dias.

A atividade celulolítica foi avaliada em placas de Petri contendo 0,1% de Carboximetilcelulose (CMC, Sigma); 0,1% de extrato de levedura; 1,0 mg% de FeSO₄.7H₂O; 0,1% de MgSO₄.7H₂O; 0,1% de K₂HPO₄; 0,05 % de NaNO₃ e 1.5% de ágar. Os resultados foram revelados segundo método de Theather e Wood (1982), que consiste em adicionar solução de vermelho congo (0,1%) ao meio de cultura durante 15 min. Após, a solução do corante foi retirada e foi adicionado solução de NaCl (1 M) durante 15 min. Os resultados foram considerados positivos para a produção de CMCase quando foram observados halos claros ao redor das colônias.

A atividade amilolítica foi avaliada utilizando um meio de cultivo adaptado de Looder (1970) contendo: 2,0 % de amido solúvel (Sigma, S-9765); 0,5% de (NH₄)₂SO₄; 1,0 % de KH₂PO₄; 1,8% de ágar. Após incubação, o meio de cultura foi recoberto com Lugol diluído (0,5% de KI e 0,25% de I₂). Colônias produtoras de amilase foram consideradas positivas quando observado halos claros ao redor das colônias.

A atividade pectinolítica foi avaliada frente a dois substratos: ácido poligalacturônico (Sigma, P-3889) e pectina de maçã (Sigma, P-8471). A atividade de poligalacturonase seguiu método proposto por McKay (1988). Foi preparado um meio basal contendo 0,67 g de YNB, 0,2 g glicose; 0,5 g agarose em 50 mL de KH_2PO_4 (100 mM) e autoclavado durante 15 min. a 121 °C. Separadamente, foi preparada uma solução contendo ácido poligalacturônico (1,25 g ácido poligalacturônico em 50 mL de água destilada) com pH ajustado para 5,5 com KOH (1,0 M) e esterilizado em autoclave durante 15 min. a 110 °C. Após esterilização, as duas soluções foram misturadas e vertidas em placas de Petri. O resultado foi revelado adicionando solução de vermelho de rutênio (0,1%) ao meio de cultura durante 1 hora. Após, a solução foi removida e as placas foram lavadas com água destilada. Foram considerados resultados positivos halos de coloração roxa ao redor das colônias (McKAY, 1988).

A hidrólise da pectina foi avaliada segundo método de Oliveira et al. (2006). Foi preparado o meio basal descrito anteriormente e separadamente foi preparada uma solução de pectina (1,0 g de pectina de maçã em 50 mL de água destilada) esterilizada em autoclave durante 15 min a 110 °C. Em seguida, os dois conteúdos foram misturados e vertidos em placas de Petri. Os resultados foram analisados segundo descrito para atividade de poligalacturonase. Halos claros ao redor das colônias foram considerados indicativos para a produção de pectinase.

Para avaliar a capacidade lipolítica quanto à degradação da trioleína foi utilizado o meio contendo: 0,67% de YNB; 0,05% de extrato de levedura e 1,5% de ágar (pH ajustado para 7,0). Esse meio foi autoclavado em alíquotas de 30 mL durante 15 min. a 121° C. Após, foi resfriado e mantido a 60 °C, e então adicionado 0,94 mL de azeite de oliva purificado e 0,3 mL de solução de Rodamina B (10 mg de rodamina B em 10 mL de etanol absoluto) para cada 30 mL de meio. O meio foi agitado vigorosamente e vertido nas placas de Petri. Estirpes produtoras de lipase, apresentaram halos fluorescentes ao redor das colônias quando expostas à luz UV (350 nm) (KOUKER; JAEGER, 1987).

Para determinar a atividade xilanolítica das estirpes foi utilizado o método descrito por Mendes et al. (2012). O meio de cultivo continha: 0,67% de YNB; 1,0% de xilana de *beechwood* (Sigma, X-4252) e 1,8% de ágar. Após o período de incubação, o resultado foi revelado adicionando Lugol no meio de cultura. Halos claros ao redor das colônias indicaram produção de xilanase (CHOI et al., 2005).

A atividade ligninolítica foi avaliada de duas maneiras: i) degradação do corante *Remazol Brilliant Blue – R* (RBB-R) e (ii) a oxidação do guaiacol. Ambos os testes são

indicativos para a seleção de micro-organismos capazes de quebrar moléculas complexas como a lignina (OKINO et al., 2000). Os meios consistiram de: 0,67% de YNB; 1,0% de glicose; 0,2% de peptona; 0,1% de extrato de levedura; 1,8% de ágar; 0,03% do substrato desejado (RBB-R, Sigma, R-8001 ou guaiacol, Sigma, G5502). As placas foram incubadas por até 21 dias e a formação de halos claros ao redor das colônias nas placas contendo o corante RBB-R indicou a produção de ligninase, assim como a coloração avermelhada ao redor das colônias nas placas contendo guaiacol indicou a produção de fenol oxidases (ligninase).

4.2.3 Assimilação de fontes de carbono

Foram preparadas suspensões das estirpes de leveduras em poços de placas de Elisa contendo 0,67% de YNB adicionado de 0,3% de glicose as quais foram incubadas por 24 horas a 25 °C. Após incubação, as suspensões foram transferidas com auxílio de um replicador para placas de Petri contendo os meios 0,67% de YNB, 1,5% de ágar e 0,5% das respectivas fontes de carbono a serem testadas. As fontes de carbono testadas foram glicose, ácido galacturônico, celobiose, maltose e xilose. As suspensões também foram replicadas em placas de Petri sem a adição de fonte de carbono (controle negativo). As placas foram incubadas a 25 °C e as leituras foram realizadas aos 7 e 14 dias de incubação.

4.2.4 Análise dos dados

Todos os resultados foram avaliados qualitativamente e tabulados. Para os testes enzimáticos os resultados foram considerados positivos quando ocorreu a formação de halos de degradação ao redor das colônias. Especificamente para as duas espécies do gênero *Aureobasidium* (*Aureobasidium pullulans* e *Aureobasidium leucospermi*) foi realizado uma análise de escalonamento multidimensional (NMDS) utilizando o software Past v. 2.16 (HAMMER; HARPER, 2001) com a finalidade de separar os perfis enzimáticos relacionados a essas espécies.

4.3 Resultados e discussão

No geral, bitus de *A. sexdens rubropilosa* transportaram em seus integumentos, leveduras capazes de degradar polissacarídeos encontrados em substratos vegetais. Dentre as

242 estirpes isoladas do integumento dos bitus, um total de 211 estirpes (87,1%) produziu, pelo menos, uma das enzimas avaliadas (Apêndice A).

A única estirpe de *Candida maltosa* e as duas estirpes de *Hannaella zae* foram aquelas que não produziram nenhuma das enzimas (Tabela 4.1). Além disso, nove estirpes de *Cryptococcus flavescens* (de um total de 26), 6 estirpes de *Cryptococcus haglerorum* (de um total de 28), 5 estirpes de *Cryptococcus* sp. 1 (de um total de 10), 5 estirpes de *Hannaella* sp. 1 (de um total de 11), quatro estirpes de *Hannaella luteola* (total de 7), uma estirpe de *Hannaella sinensis* (de um total de 4) e uma estirpe de *Trichosporon chiarellii* (de um total de 18) não produziram as enzimas avaliadas (Apêndice A).

Tabela 4.1 – Perfil de leveduras isoladas do corpo de bitus de *Atta sexdens rubropilosa* que produzem polissacaridasas

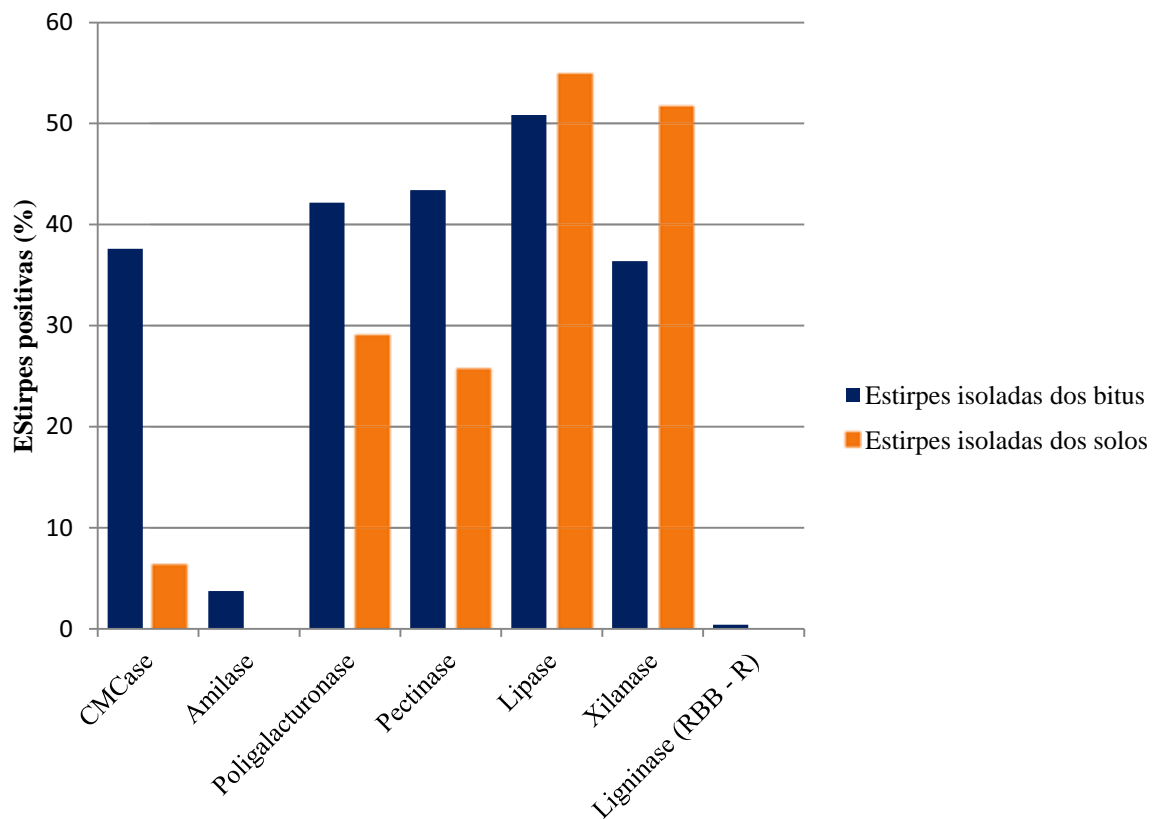
Espécies de leveduras	Total de estirpes	Número de estirpes positivas						
		CMC ^a	AM	PG	PL	LIP	XIL	Lig (RBB - R)
<i>Aureobasidium leucospermi</i>	44	44	5	44	44	44	33	
<i>Aureobasidium pullulans</i>	24	10	1	3	22	21	23	1
<i>Candida maltosa</i>	1							
<i>Cryptococcus flavescens</i>	26	8		8	5	3	2	
<i>Cryptococcus flavus</i>	3		3	1	1		3	
<i>Cryptococcus haglerorum</i>	28	1		18	6	1	3	
<i>Cryptococcus laurentii</i>	7					5	5	
<i>Cryptococcus nemorosus</i>	13	9		1	3		10	
<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>	2				2	2		
<i>Cryptococcus</i> sp. 1	10			1	4	1	1	
<i>Cryptococcus</i> sp. 2	3				1			
<i>Debaryomyces hansenii</i>	1				1			
<i>Hannaella kunmingensis</i>	2	1		2	1	1	1	
<i>Hannaella luteola</i>	7			3				
<i>Hannaella sinensis</i>	4			2	1	2		
<i>Hannaella</i> sp. 1	11			4	3		2	
<i>Hannaella</i> sp. 2	1				1			
<i>Hannaella zeae</i>	2							
<i>Kazachstania unispora</i>	1	1				1		
<i>Rhodospiridium babjevae</i>	5				1	5		
<i>Rhodospiridium lusitaniae</i>	3	3		1	2			
<i>Rhodotorula dairenensis</i>	2	2			1	1		
<i>Rhodotorula marina</i>	1	1				1		
<i>Rhodotorula glutinis</i>	5	1			1	5		
<i>Rhodotorula mucilaginoso</i>	13	5		1	1	13		
<i>Rhodotorula nothofagi</i>	3	1		1	3		3	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	1						
<i>Trichosporon chiarellii</i>	18	3		12	1	17	1	
<i>Trichosporon</i> sp.	1						1	
Total	242	91	9	102	105	123	88	1

^a CMC: CMCCase, AM: amilase, PG: poligalacturonase, PL: pectinase, LIP: lipase, XIL: xilanase, Lig: ligninase

As enzimas produzidas em maior frequência pelas 242 estirpes isoladas do integumento dos bitus foram a lipase (50,8%) seguida de pectinase (43,4%) e poligalacturonase (42,1%, Figura 4.1). CMCCase e xilanase foram produzidas por 37,6% e 36,4% das estirpes, respectivamente (Figura 4.1). Somente 3,7% das estirpes produziram amilase. A atividade ligninolítica das estirpes foi avaliada frente a dois substratos diferentes, sendo que somente uma estirpe de *A. pullulans* foi capaz de degradar o corante RBB-R (0,4%) e nenhuma estirpe degradou o guaiacol (Apêndice A).

Ao comparar a produção enzimática de estirpes isoladas do integumento dos bitus com as estirpes isoladas de amostras de solos dos túneis e adjacentes aos ninhos de formigas cortadeiras, foi observado que as estirpes isoladas dos bitus produziram em maior porcentagem CMCase e amilase e foram as estirpes que mais degradaram pectina e ácido poligalacturônico, proporcionalmente. Por outro lado, as estirpes isoladas do solo produziram lipase e xilanase em um maior percentual do que as estirpes provenientes dos bitus (Figura 4.1). Nenhuma estirpe isolada de solo produziu amilase e ligninase.

Figura 4.1 – Proporção de estirpes de leveduras isoladas do integumento dos bitus de *Atta sexdens rubropilosa* e de amostras de solos, positivas para produção de enzimas.



Segundo Mendes et al. (2012), o jardim de fungos abriga uma grande diversidade de leveduras com potencial para degradar polímeros vegetais. O fato de uma maior proporção de estirpes provenientes de bitus degradarem compostos vegetais como celulose e pectina, quando comparado às estirpes isoladas do solo, possivelmente deve-se ao fato dessas leveduras terem uma possível origem nos jardins de fungo. Nesse sentido, essas leveduras passariam facilmente ao corpo dos bitus por contato (conforme detalhado no CAPÍTULO 1), pois os machos (bitus) também estão presentes neste substrato e aí permanecem por vários dias antes de deixarem os ninhos para o voo nupcial. Desta maneira, a elevada proporção de estirpes produtoras de pectinase e poligalacturonase (43,4% e 42,1%, respectivamente)

isoladas do integumento dos bitus, sinaliza o possível papel desses micro-organismos nos jardins de fungo. Por exemplo, visto que o fungo mutualista possui grande capacidade de degradação do material pécico (SIQUEIRA et al., 1998), essas leveduras poderiam contribuir com o fungo na degradação da pectina, auxiliando o acesso do fungo mutualista aos componentes intracelulares da célula vegetal. Nossos resultados se assemelham aos de Mendes et al. (2012), os quais avaliaram a produção de poligalacturonase por leveduras isoladas dos jardins de fungo de *Atta texana* e *Acromyrmex* spp. Os autores encontraram que 44% do total de estirpes de leveduras (n= 82 estirpes) foram capazes de hidrolisar o ácido poligalacturônico.

O ácido galacturônico é o principal produto gerado pela quebra do ácido poligalacturônico e é fracamente assimilado pelo fungo mutualista (SIQUEIRA et al., 1998). Além disso, esse composto apresenta efeito deletério para as formigas (SILVA et al., 2003). Mendes et al. (2012) ao avaliarem a capacidade de leveduras isoladas dos jardins de fungo de formigas cortadeiras em assimilar o ácido galacturônico, encontraram que 64% das leveduras isoladas de ninhos de *A. texana* e 79% de leveduras isoladas de ninhos de *Acromyrmex* spp. assimilaram esse composto. Assim, os autores sugerem que estas leveduras auxiliam na remoção deste composto dos jardins de fungo. Os resultados obtidos no presente trabalho reforçam a hipótese proposta por Mendes et al. (2012), pois das 242 leveduras isoladas do integumento dos bitus, 171 (70,6%) foram capazes de assimilar ácido galacturônico.

Adicionalmente, nossos resultados mostraram que não somente o ácido galacturônico foi assimilado por grande parte das leveduras, mas também outros açúcares gerados da degradação do amido, da celulose e da xilana. Todas as estirpes foram capazes de assimilar glicose, 195 estirpes (80,5 %) assimilaram celobiose, 232 estirpes (95,8%) assimilaram maltose e 227 estirpes (93,8%) assimilaram xilose (APÊNDICE A). A presença de leveduras nos jardins de fungo poderia, até certo ponto, estar beneficiando o crescimento do fungo mutualista devido à produção de enzimas extracelulares que atacam componentes da parede celular vegetal. Essas enzimas contribuem com a liberação de açúcares mais facilmente assimiláveis para todos (insetos e micro-organismos) e também atuam na detoxificação dos jardins de fungo pelo consumo do ácido galacturônico (MENDES et al., 2012). Contudo, sabe-se também que o fungo mutualista utiliza glicose, xilose, maltose e celobiose como fonte de carbono para seu crescimento (SIQUEIRA et al., 1998). Assim, as leveduras presentes nos jardins de fungo são capazes de consumir os mesmos açúcares necessários ao crescimento do fungo mutualista e poderiam atuar também como competidoras por nutrientes nos jardins de

fungo. Entretanto, não é possível quantificar se os nutrientes gerados pelas leveduras excede ou não a quantidade que é consumida por elas e assim a questão geração *versus* consumo de nutrientes permanece aberta.

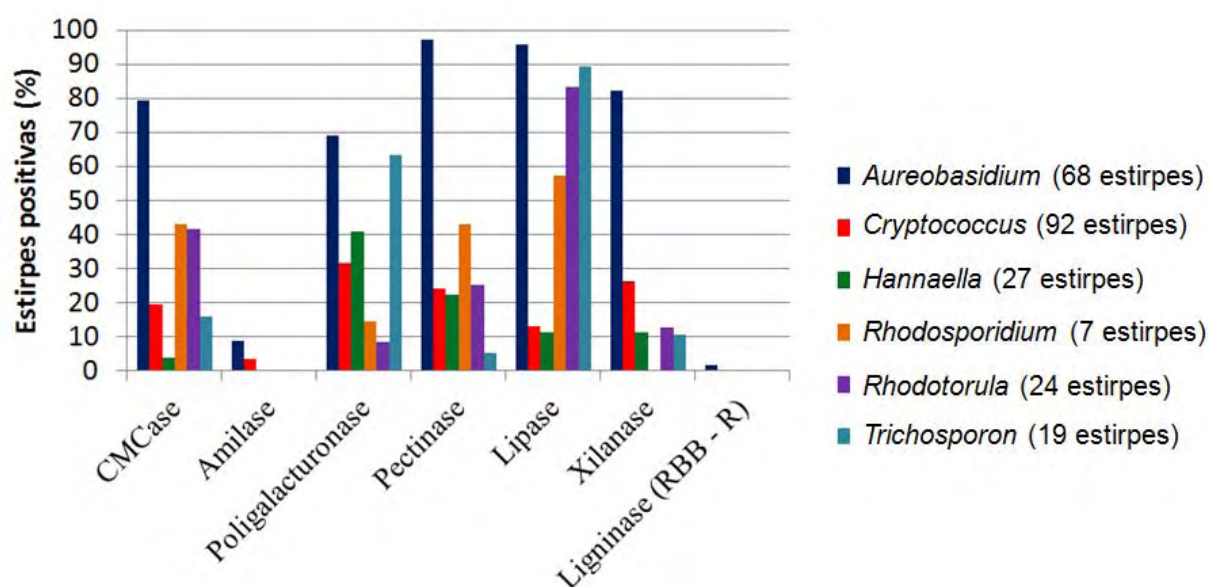
A presença e incorporação de leveduras celulolíticas (37,6%) e xilanolíticas (36,4%) no integumento dos bitus pode ser devido ao jardim de fungos ser um ambiente propício para o desenvolvimento desses micro-organismos. Moller et al. (2011) verificaram em ninhos de formigas cortadeiras *Acromyrmex echinator*, que o material dos jardins de fungo que são descartados (lixo), possuem ainda quantidades significativas de xilana e celulose, mostrando que o jardim de fungo é um ambiente favorável ao suporte de uma microbiota capaz de utilizar esses polissacarídeos como fonte nutricional. Ainda, existe a controvérsia sobre a capacidade celulolítica do fungo mutualista (BACCI JÚNIOR; ANVERSA ; PAGNOCCA, 1995; ABRIL; BUCHER, 2002; 2004), sendo que alguns estudos mostram que a atividade celulolítica nos jardins de fungo pode ser proveniente da complexa microbiota encontrada nesse micro-habitat, incluindo bactérias e leveduras (BACCI JÚNIOR. et al., 1995; SUEN et al., 2010; MENDES et al., 2012). O material celulósico presente nos jardins de fungo pode explicar o fato de que uma maior porcentagem das leveduras isoladas de bitus foi capaz de degradar o CMC (37,6%), quando comparadas com leveduras isoladas de solos (6,5%). Ao produzirem enzimas extracelulares capazes de quebrar celulose e xilana do material vegetal nos jardins de fungo, essas leveduras disponibilizam glicose, celobiose e xilose nos jardins, açúcares que são consumidos por parte das leveduras e pelo fungo mutualista. (SIQUEIRA et al., 1998).

Aparentemente nenhum estudo avaliou a concentração e composição de lipídios dentro dos jardins de fungo, mas sabe-se que esses insetos coletam folhas frescas como substrato para o crescimento do fungo mutualista (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990), as quais além de polissacarídeos estruturais podem conter uma variedade de lipídios (RAUGHAN; BATT, 1969). Ainda, pouco se sabe sobre a capacidade lipolítica tanto de culturas do fungo mutualista, quanto dos jardins de fungo das formigas cortadeiras. Das enzimas extracelulares avaliadas nesse trabalho, a hidrólise da trioleína pela produção de lipase foi realizada por 50,8% das estirpes isoladas dos bitus e por 54,8% das estirpes isoladas de solos, mostrando que as leveduras podem atuar na quebra do material lipídico presente nos jardins de fungo das formigas cortadeiras.

Das 242 estirpes isoladas do integumento dos bitus, 68 (28%) pertencem ao gênero *Aureobasidium*. Tal gênero é explorado comercialmente devido aos diversos aspectos

biotecnológicos de interesse comercial, dentre eles a capacidade de produzir enzimas hidrolíticas (GAUR et al., 2010). De fato, no presente trabalho estirpes desse gênero mostraram-se capazes de produzir diversas dessas enzimas, sendo a degradação da pectina mais frequente (97,1%) seguido da produção de lipase (95,6%). CMCcase, poligalacturonase, e xilanase foram produzidas por 79,4%, 69,1%, e 82,4% das estirpes de *Aureobasidium*, respectivamente (Figura 4.2). Ainda, Mendes et al. (2012) avaliaram a produção de enzimas hidrolíticas por leveduras isoladas de formigas *A. texana* e mostraram que as três estirpes de *A. pullulans* avaliadas foram produtoras de celulase e xilanase. *Aureobasidium* já foi encontrado anteriormente em jardins de fungo de *A. sexdens rubropilosa* (CARREIRO et al., 2002; RODRIGUES et al., 2009) e associado ao integumento das içãs de *A. capiguara* e *A. laevigata*, momentos antes de deixarem os ninhos para realizarem o voo nupcial (PAGNOCCA et al., 2008). Segundo esses autores, *A. pullulans* pode ser transportado para os jardins de fungo juntamente com o material vegetal cortado pelas operárias. O frequente isolamento de *Aureobasidium* associados às formigas cortadeiras e o alto percentual de estirpes produtoras de enzimas extracelulares encontrado neste estudo, sugerem que este gênero pode estar envolvido na degradação do material vegetal nos jardins de fungo das formigas cortadeiras.

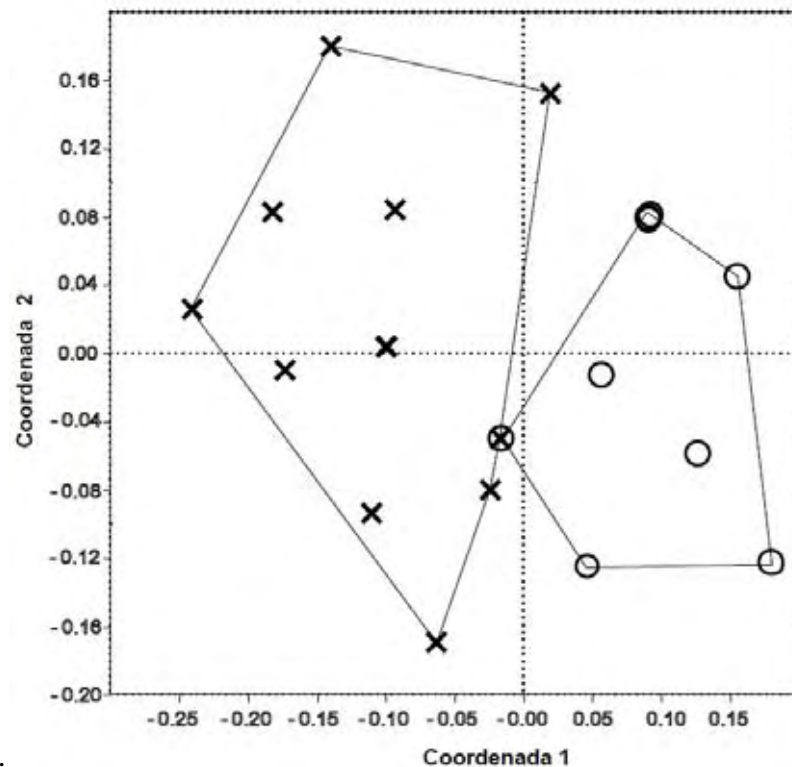
Figura 4.2 – Proporção de estirpes de diferentes gêneros de leveduras isoladas do integumento dos bitus de *Atta sexdens rubropilosa* e positivas para produção enzimática



Dados referentes aos gêneros *Debaryomyces*, *Saccharomyces*, *Kazachstania*, *Candida* foram excluídos do gráfico, pois apenas uma estirpe foi isolada de cada.

O potencial enzimático demonstrado para *Aureobasidium* se deve principalmente a espécie *A. leucospermi*, espécie descrita no ano de 2011 e que apresenta similaridade na região D1/D2 maior que 99% com *A. pullulans* (CROUS et al., 2011). Das 44 estirpes avaliadas de *A. leucospermi*, todas foram produtoras de CMCase, pectinases (degradação da pectina e ácido poligalacturônico) e lipase. Xilanase foi produzida por 33 estirpes (75%) e amilase por cinco estirpes (11,3%). As enzimas mais produzidas pelas 24 estirpes de *A. pullulans* foram: xilanase por 23 estirpes (95,8%), pectinase por 22 estirpes (91,6%) e lipase por 21 estirpes (87,5 %). As enzimas que apresentaram menor proporção de isolados produtores foram CMCase por 10 estirpes (41,6%), poligalacturonase por três estirpes (12,5%), amilase e ligninase produzidas somente por uma estirpe cada (4,1%, Tabela 4.1). A divergência no perfil de produção dessas enzimas por essas espécies pode ser ainda observada pelos distintos perfis enzimáticos formados na análise de escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS), o qual indica a similaridade relativa das amostras por distância de ordenação. Tal análise demonstrou que ocorreu uma separação clara das estirpes de cada espécie ao longo da coordenada 1 (Figura 4.3) segundo o perfil de produção enzimático.

Figura 4.3 - Perfil de produção enzimática segundo a análise de Escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS) de estirpes de *Aureobasidium pullulans* e *Aureobasidium leucospermi*



Comparação do perfil enzimático de estirpes de *Aureobasidium pullulans* (○) e *Aureobasidium leucospermi* (×).

É importante destacar que as espécies *T. chiarellii* e *C. haglerorum* somente foram isoladas até o momento em associação com formigas Attini (PAGNOCCA et al., 2010, MENDES et al. 2012; CAPÍTULO 1). Dentre as 18 estirpes de *T. chiarellii* isoladas do integumento dos bitus, 17 (94,4%) produziram lipase e 12 (66,6%) produziram poligalacturonase. Em relação a *C. haglerorum*, a maioria (64,2%) das 28 estirpes avaliadas produziu poligalacturonase demonstrando que estas leveduras, encontradas até o momento exclusivamente em ninhos de formigas Attini, podem desempenhar um papel ecológico na decomposição de materiais lipídicos e do ácido poligalacturônico nos jardins de fungo, tornando-se necessário estudos complementares para a confirmação dessa hipótese.

Conforme sugerido no Capítulo 1, grande parte das leveduras isoladas do integumento dos bitus pode ser originária dos jardins de fungo. É possível que os machos alados transfiram leveduras para as iças durante o contato no acasalamento. Grande parte dessas leveduras poderão realizar importantes funções no desenvolvimento dos novos jardins de fungo, considerando que uma porcentagem dessas, podem degradar os principais polissacarídeos vegetais e consumir açúcares disponíveis nos jardins de fungo, inclusive o ácido galacturônico, composto danoso ao desenvolvimento das formigas. Assim, o presente trabalho contribuiu para o conhecimento do papel ecológico das leveduras associadas à *A. sexdens rubropilosa*.

4.4 Conclusões

- Bitus de *A. sexdens rubropilosa* carregam em seus integumentos leveduras, muitas das quais são capazes de degradar polissacarídeos vegetais, como xilana, celulose, pectina, amido e também realizar a hidrólise do material lipídico;
- O presente trabalho reforça estudos prévios a respeito do papel das leveduras no consumo de ácido galacturônico e conseqüentemente detoxificação dos jardins de fungo;
- *A. pullulans* e *A. leucospermi* mostraram-se importantes leveduras isoladas do integumento dos bitus, podendo essas quando presentes nos jardins de fungo serem as principais leveduras relacionadas à degradação do material vegetal nesse ambiente.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A abundância e riqueza de espécies de leveduras encontradas no integumento dos bitus de *A. sexdens rubropilosa*, momentos após deixarem os ninhos para o voo nupcial, sugerem que esses insetos são importantes vetores na dispersão desses micro-organismos;
- As diferenças na riqueza, diversidade e composição de espécies de leveduras encontradas nos bitus provavelmente podem ser explicadas por fatores como local de coleta e ano em que ocorreu a revoada; contudo, fatores adicionais poderiam explicar as diferenças observadas;
- A presença de taxa autóctones de ninhos de formigas cortadeiras como, *T. chiarellii* e *C. haglerorum*, indica um possível modo de dispersão dessas leveduras entre ninhos de formigas cortadeiras da mesma espécie;
- O presente trabalho corrobora resultados de estudos prévios, pois demonstrou que leveduras presentes nos bitus apresentam capacidade de degradar polímeros vegetais e assimilar os compostos resultantes da degradação desses substratos. É possível que esses micro-organismos consumam açúcares importantes para nutrição do fungo mutualista, podendo atuar como competidoras. Por outro lado, o papel benéfico desse grupo microbiano destaca-se pelo consumo de ácido galacturônico por grande parte das leveduras (composto tóxico para as formigas).

6 PERSPECTIVAS

Considerando a diversidade de leveduras encontrada no integumento dos machos alados de *A. sexdens rubropilosa*, é provável que esses insetos contribuam na transferência de micro-organismos para o corpo das fêmeas durante o acasalamento. Devido às fêmeas serem as responsáveis por fundar novos ninhos, é possível que as leveduras adquiridas façam parte da microbiota inicial do novo jardim de fungo. Trabalhos futuros podem direcionar esforços na amostragem de leveduras de fêmeas recém-fertilizadas e de jardins de fungo de ninhos recém-fundados, com a finalidade de demonstrar que a microbiota dos machos foi realmente transferida ao corpo das fêmeas e se estabeleceu nesse ambiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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, may 2002.
- ABRIL, A.B.; BUCHER, E.H. Nutritional sources of the fungus cultured by leaf-cutting ants. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 26, n. 3, p. 243-247, jul. 2004.
- ARAÚJO, M. S.; RIBEIRO, M. M. R.; MARINHO, C. G. S.; OLIVEIRA, M. A.; DELLA-LUCIA, T. M. C. Fundação e estabelecimento de formigueiros. In: DELLA-LUCIA, T. M. C. **Formigas cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. 1 ed. Viçosa: UFV, 2011, p. 173-188.
- AUTUORI, M. Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp.- Hymenoptera-Formicidae). I – Evolução do sauveiro (*Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 12, p. 197-226, nov. 1941.
- AUTUORI, M. Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp.- Hymenoptera-Formicidae). V – Número de formas aladas e redução dos sauveiros iniciais. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 19, p. 325-331, maio 1950.
- BACCI JÚNIOR, M.; ANVERSA, M. M.; PAGNOCCA, F. C. Cellulose degradation by *Leucocoprinus gongylophorus*, the fungus cultured by the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*, **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 67, n. 4, p. 385-386, dec. 1995.
- BACCI JÚNIOR M.; RIBEIRO, S. B.; CASAROTTO, M. E. F.; PAGNOCCA, F. C. Biopolymer-degrading bacteria from nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 28, n. 1, p. 79-82, 1995.
- BAER, B.; BOOMSMA, J. J. Male reproductive investment and queen mating-frequency in fungus-growing ants. **Behavioral Ecology**, Cary, v. 15, n. 3, p. 426-432, may 2004.
- BRANDÃO, C. R. F.; MAYHÉ-NUNES, A. J.; SANHUDO, C. E. D. Taxonomia e filogenia das formigas-cortadeiras. In: DELLA-LUCIA, T. M. C. **Formigas cortadeiras, da bioecologia ao manejo**. 1 ed. Viçosa: UFV, 2011, p. 28-48.
- BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; SCHNEIDER, M. O.; PAGNOCCA, F. C.; BACCI JÚNIOR, M. Occurrence of winged forms of *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) in laboratory colonies. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 469-473, jul.-sep. 2002.
- 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**, Praha, v. 47, n. 3, p. 259-262, 2002.

CARREIRO, S. C.; PAGNOCCA, F. C.; BACCI JÚNIOR, M.; LACHANCE, M-A.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; RUIVO, C. C. C.; ROSA, C. A. *Sympodiomyces attinorum* sp. nov., a yeast species associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, n. 5, p. 1891-1894, set. 2004.

CARREIRO, S. C.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; BACCI JÚNIOR, M.; HEBLING, M. J. A.; SILVA, O. A. Yeasts associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 71, n. 3, p. 243-248, mar. 1997.

CHAPELA, I. H.; REHNER, S. A.; SCHULTZ, T. R.; MUELLER, U. G. Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi. **Science**, Washington, v. 266, n. 5.191, p. 1691-1694, dec. 1994.

CHOI, Y.W.; HODGKISS, I.J.; HYDE, K.D. Enzyme production by endophytes of *Brucea javanica*. **Journal of Agricultural Technology**, Bangkok, v.1, n.1, p. 55-66, jun. 2005.

CRAVEN, S. E.; DIX, M. W.; MICHAELS, G. E. Attine fungus gardens contain yeasts. **Science**. Washington, v. 169, n. 3.941, p. 184-186, jul. 1970.

CROUS, P. W.; SUMMERELL, B. A.; SWART, L.; DENMAN, S.; TAYLOR, J. E.; BEZUIDENHOUT, C. M.; PALM, M. E.; MARINCOWITZ, S.; GROENEWALD, J. Z. Fungal pathogens of Proteaceae. **Persoonia**, Leideen, v. 27, p. 20-45, 2011.

CURRIE, C. R. A community of ants, fungi, and bacteria: a multilateral approach to studying symbiosis. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 55, p. 357-380, oct. 2001.

CURRIE, C. R.; BOT, A. N. M.; BOOMSMA, J. J. Experimental evidence of a tripartite mutualism: bacteria protect ant fungus gardens from specialized parasites. **Oikos**, Buenos Aires, v. 101, n. 1, p. 91-102, 2003.

CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G.; MALLOCH, D. The agricultural pathology of ant fungus gardens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 96, n. 14, p. 7998-8002, jul. 1999.

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

CURRIE, C. R.; STUART, A. E. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Science**, Edinburgh, v. 268, n. 1471, p. 1033-1039, may 2001.

D'ETTORRE, P.; MORA, P.; DIBANGOU, V.; ROULAND, C.; ERRARD, C. The role of the symbiotic fungus in the digestive metabolism of two species of fungus-growing ants. **Journal of Comparative Physiology B**, New York, v. 172, n. 8, p. 169-176, jan.-dec. 2002.

DE 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.

- DELABIE, J. H. C.; ALVES, H. S. R.; REUSS-STRENZEL, G. M.; CARMO, A. F. R.; NASCIMENTO, I. C. Distribuição das formigas-cortadeiras dos gêneros *Acromyrmex* e *Atta* no Novo Mundo. In: DELLA-LUCIA, T. M. C. **Formigas cortadeiras, da bioecologia ao manejo**. 1 ed. Viçosa: UFV, 2011, p. 80-101.
- 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**. 1 ed. Viçosa: UFV, 2011, p. 13-26.
- DINIZ, E. A.; BUENO, O. C. Evolution of substrate preparation behaviors for cultivation of symbiotic fungus in Attine ants (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Insect Behavior**, New York, v. 23, n. 3, p. 205-214, may 2010.
- ERTHAL JÚNIOR, M.; SILVA, C.P.; COOPER, R.M.; SAMUELS, R.I. Hydrolytic enzymes of leaf-cutting ant fungi. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B, New York, v. 152, n. 1, p. 54-59, jan. 2009.
- FERNÁNDEZ, F. Subfamilia Myrmicinae. In: _____. **Introducción a las hormigas de la región Neotropical**. Ed. 2003, Bogotá. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt. Cap. 22, 2003, p. 307-330.
- FERNÁNDEZ-MARÍN, H.; ZIMMERMAN, J. K.; WCISLO, W. T. Fungus garden platforms improve hygiene during nest establishment in *Acromyrmex* ants (Hymenoptera, Formicidae, Attini). **Insectes Sociaux**, Paris, v. 54, n. 1, p. 64-69, feb. 2004.
- 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**, Cambridge, v. 100, n. 5, p. 541-546, may 1996.
- GAUR, R.; SINGH, R.; GUPTA, M.; GAUR, M.K. *Aureobasidium pullulans*, economically important polymorphic yeast with special reference to pullulan. **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v. 9, n. 47, p. 7989-7997, nov. 2010.
- GERARDO, N. M.; JACOBS, S. R.; CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G. Ancient host-pathogen associations maintained by specificity of chemotaxis and antibiosis. **PLoS Biology**, Cambridge, v. 4, n. 8, p. 1358-1363, aug. 2006.
- HAMMER, Ø., HARPER, D.A.T. Past: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, 9 pp., 2001.
- HERNANDÉZ, J. V.; JAFFÉ, K. Dano econômico causado por populações de formiga *Atta laevigatta* (F. Smith) em plantações de *Pinus caribaea* MOR. e elementos para o manejo da praga. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 287-298, 1995.
- HÖLLDOBLER, E.; WILSON, E. O. **The ants**. Cambridge: Belknap/Harvard University Press, 1990, 732p.

ISHAK, H. D.; MILLER, J. L.; SEN, R.; DOWD, S. E.; MEYER, E.; MUELLER, U. G. Microbiomes of ant castes implicate new microbial roles in the fungus-growing ant *Trachymyrmex septentrionalis*. **Scientific Reports**, London, v. 204, p. 1-12, 2011.

KERR, W. E. Acasalamento de rainhas com vários machos em duas espécies da tribo Attini (Hymenoptera: Formicoidea). **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 1, p. 45-48, jun. 1961.

KOUKER, G.; JAEGER, K.E. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, n. 1, p. 211-213, jan. 1987.

LITTLE, A. E. F.; CURRIE, C. R. Black yeast symbionts compromise the efficiency of antibiotic defenses in fungus-growing ants. **Ecology**, Tempe, v. 89, n. 5, p. 1216-1222, may 2008.

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

LOODER, J. **The yeast: a taxonomic study**. 2 ed. Amsterdam: North-Holland Publishing Company, 1970.

MANGONE, D. M.; CURRIE, C. R. Garden substrate preparation behaviours in fungus-growing ants. **The Canadian Entomologist**, Ottawa, v.139, n. 6, p. 841-848, dec. 2007.

MARINHO, C. G. S.; OLIVEIRA, M. A.; ARAÚJO, M. S.; RIBEIRO, M. M. R.; DELLA-LUCIA, T. M. C. Voo nupcial ou revoada de formigas-cortadeiras. In: DELLA-LUCIA, T. M. C. **Formigas cortadeiras, da bioecologia ao manejo**. 1 ed. Viçosa: UFV, 2011, p. 165-172.

MAYHÉ-NUNES, A. J.; JAFFÉ, K. On the biogeography of Attine (Hymenoptera: Formicidae). **Ecotropicos**, Caracas, v. 11, n. 1, p. 45-54, jan.- jun. 1998.

McKAY, A.M.; A plate assay method for the detection of fungal polygalacturonase secretion. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 56, n. 3, p. 355-358, dec. 1988.

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**, Postfach, v. 3, n. 1, p. 228-245, mar. 2012.

MIDDELHOVEN, W. J.; FONSECA, A.; CARREIRO, S. C.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C. *Cryptococcus haglerorum*, sp. nov., an anamorphic basidiomycetous yeast isolated from nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 83, n. 2, p. 167-174, mar. 2003.

MIKHEYEV, A. S.; MUELLER, U. G.; ABBOT, P. Cryptic sex and many-to-one coevolution in the fungus-growing ant symbiosis. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 28, p. 10702-10706, jul. 2006.

- MINTZER, A. C. Primary polygyny in the ant *Atta texana*: number and weight of females and colony foundation success in the laboratory. **Insectes Sociaux**, Paris, v. 34, n. 2, p. 108-117, jun. 1987.
- MOLLER, I.E.; LICHT, H.H.F.; 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, v. 6, n. 3, p. 1-9, mar. 2011.
- MUELLER, U. G. Symbiont recruitment versus ant-symbiont co-evolution in the attine ant-microbe symbiosis. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 15, n. 3, p. 269-277, jun. 2012.
- NAGAMOTO, N.S.; GARCIA, M.G.; FORTI, L.C. VERZA, S.S.; NORONHA, N.C.; RODELLA, R.A. Microscopic evidence supports the hypothesis of high cellulose degradation capacity by the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. **Journal of Biological Research**, Thessaloniki, v. 16, p. 308-312, 2011.
- OH, D.-C.; POULSEN, M.; CURRIE, C. R.; CLARDY, J. Dentigerumycin: a bacterial mediator of an ant-fungus symbiosis. **Nature Chemical Biology**, New York, v. 5, n. 6, p. 1-4, jun. 2009.
- OKINO, L.K.; MACHADO, K.M.G.; FABRIS, C. BONONI, V.L.R. Ligninolytic activity of tropical rainforest basidiomycetes. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 16, n.8-9, p. 889-893, sep. 2000.
- 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, apr. 2006.
- PAGNOCCA, F. C.; CARREIRO, S. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J.; SILVA, O. A. Microbiological changes in the nests of leaf-cutting ants fed on sesame leaves. **Journal of Applied Entomology**, Berlim, v. 120, n.1-5, p. 317-320, jan. – dec. 1996.
- PAGNOCCA, F. C.; LEGASPE, M. F. C.; RODRIGUES, A.; RUIVO, C. C. C.; NAGAMOTO, N. S.; BACCI JÚNIOR, M.; FORTI, L. C. Yeasts isolated from a fungus-growing ant nest, including the description of *Trichosporon chiarelli* sp. nov., an anamorphic basidiomycetous yeast. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 60, n. 6, p. 1454-1459, jun. 2010.
- PAGNOCCA, F. C.; RODRIGUES, A.; BACCI JÚNIOR, M. Microrganismos associados às formigas-cortadeiras. In: DELLA-LUCIA, T. M. C. **Formigas cortadeiras, da bioecologia ao manejo**. 1 ed. Viçosa: UFV, 2011, p. 262-283.
- PAGNOCCA, F. C.; RODRIGUES, A.; NAGAMOTO, N. S.; BACCI JÚNIOR, M. Yeasts and filamentous fungi carried by the gynes of leaf-cutting ants. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 94, n. 4, p. 517-526, nov. 2008.

- PINTO-TOMÁS, A. A.; ANDERSON, M. A.; SUEN, G.; STEVENSON, D. M.; CHU, F. S. T.; CLELAND, W. W.; WEIMER, P. J.; CURRIE, C. R. Symbiotic nitrogen fixation in the fungus gardens of leaf-cutter ants. **Science**, Washington, v. 326, n. 5956, p. 1120-1123, nov. 2009.
- QUINLAN, R. J.; CHERRETT, J. M. The role of the fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. **Ecological Entomology**, London, v. 4, n. 2, p. 151-160, may 1979.
- RIBEIRO, F. J. L. A escavação do solo pela fêmea da saúva (*Atta sexdens rubropilosa*). **Psicologia USP**, São Paulo, v.6, n. 1, p. 75-93, 1995.
- RODRIGUES, A.; BACCI JÚNIOR, M.; MUELLER, U. G.; ORTIZ, A.; PAGNOCCA, F. C. Microfungal “weeds” in the leafcutter ant symbiosis. **Microbial Ecology**, New York, v. 56, n. 4, p. 604-514, nov. 2008b.
- RODRIGUES, A.; CABLE, R. N.; MUELLER, U. G.; BACCI JÚNIOR, M.; PAGNOCCA, F. C. Antagonistic interactions between garden yeasts and microfungal garden pathogens of leaf-cutting ants. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 96, n. 3, p. 331-342, out. 2009.
- RODRIGUES, A.; CARLETTI, C. D.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C. Leaf-cutting ant faecal fluid and mandibular gland secretion: effects on microfungi spore germination. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 64-67, jan. – mar. 2008a.
- RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F. C.; BACCI JÚNIOR, M.; HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C. PFENNING, L. H. Variability of non-mutualistic filamentous fungi associated with *Atta sexdens rubropilosa* nests. **Folia Microbiologica**, Praha, v. 50, n. 5, p. 421-425, 2005.
- RODRIGUES, A.; SILVA, A.; BACCI JÚNIOR, M.; FORTI, L. C. PAGNOCCA, F. C. Filamentous fungi found on foundress queens of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 134, n. 4, p. 342-345, may 2010.
- RONHEDE, S.; BOOMSMA, J. J.; ROSENDAHL, S. Fungal enzymes transferred by leaf-cutting ants in their fungus gardens. **Mycological Research**, Cambridge, v. 108, n. 1, p. 101-106, jan. 2004.
- ROUGHAN, P.G.; BATT, R.D. The glycerolipid composition of leaves. **Phytochemistry**, New York, v. 8, n. 2, p. 363-369, feb. 1969.
- SCHIOTT, M.; ROGOWSKA-WRZESINSKA, A.; ROEPSTORFF, P.; BOOMSMA, J.J. Leaf-cutting ant fungi produce cell wall degrading pectinase complexes reminiscent of phytopathogenic fungi. **BMC Biology**, London, v. 8, n. 156, p. 1-12, dec. 2010.
- SCHULTZ, T. R.; BRADY, S. G. Major evolutionary transition in ant agriculture. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 105, n. 14, p. 5435-5440, apr. 2008.
- SCOTT, J. J.; BUDSBERG, K. J.; SUEN, G.; WIXONS, D. L.; BALSER, T. C.; CURRIE, C. R. Microbial community structure of leaf-cutter ant fungus gardens and refuse dumps. **PLoS One**, San Francisco, v. 5, n. 3, mar. 2010.

SEN, R.; ISHAK, H. D.; ESTRADA, D.; DOWD, S. E.; HONG, E.; MUELLER, U. G. Generalized antifungal activity and 454-screening of *Pseudonocardia* and *Amycolatopsis* bacteria in nests of fungus-growing ants. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 106, n. 42, p. 17805-17810, oct. 2009.

SILVA, A.; BACCI JÚNIOR, M.; 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**, New York, v. 53, n. 1, p. 68-71, jul. 2006.

SILVA, A.; BACCI JÚNIOR, M.; 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. 49, n. 5, p. 397-313, may 2003.

SILVA-PINHATI, A. C. O.; BACCI JÚNIOR, M.; HINKLE, G.; SOGIN, M. L.; PAGNOCCA, F. C.; MARTINS, V. G.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A. Low variation in ribosomal DNA and internal transcribed spacers of the symbiotic fungi of leaf-cutting ants (Attini: Formicidae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 37, n. 10, p. 1463-1472, out. 2004.

SIQUEIRA, C.G.; BACCI JÚNIOR, M.; 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* L. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 12, p. 4820-4822, dec. 1998.

SOLOMON, S. E; BACCI JÚNIOR, M.; MARTINS JÚNIOR, J.; VINHA, G. V.; MUELLER, U. G. Paleodistributions and comparative molecular phylogeography of leafcutter ants (*Atta* spp.) provide new insight into the origins of Amazonian diversity. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 2, n. 3, p. 1-15, jul. 2008.

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.; BOUFFARD, P.; 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**, San Francisco, v. 6, n. 9, p. 1-14, sep. 2010.

TEATHER, R.M.; WOOD, P.J. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 43, n. 4, p. 777-780, apr. 1982.

VO, T. L.; MUELLER, U. G.; MIKHEYEV, A. S. Free-living fungal symbionts (Lepiotaceae) of fungus-growing ants (Attini: Formicidae). **Mycologia**, New York, v. 101, n. 2, p. 206-210, mar.– apr. 2009.

WEBER, N. A. **Gardening ants: the attines**. Philadelphia: The American Philosophical Society, 1972.

WEBER, N. A. Evolution in fungus-growing ants. **Proceedings of the Tenth International Congress of Entomology**, Montreal, v. 2, p. 459-473, 1956.

WEBER, N. A. Fungus-growing ants. **Science**, Washington, v. 153, n. 3736, p. 587-604, aug. 1966.

WETTERER, J. K.; SCHULTZ, T. R.; MEIER, R. Phylogeny of fungus-growing ants (tribe Attini) based on mtDNA sequence and morphology. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 9, n. 1, p. 42-47, feb. 1998.

WILLATS, W.G.T.; McCARTNEY, L.; MACKIE, W.; KNOX, J.P. Pectin: cell biology and prospects for nutritional analysis. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 47, n. 1-2, p. 9-27, sep. 2001.

APÊNDICE

Apêndice A. Perfil da atividade enzimática extracelular e assimilação de fontes de carbono por espécie de leveduras isoladas do integumento de bitus de *Atta sexdens rubropilosa* e do solo.

Estirpe	Identificação	Triagem enzimática							Assimilação					
		¹ CMC	AM	PG	PE	LIP	XIL	Lig RBB-R	Lig (Lac)	Glicose	Celobiose	Ac. galacturônico	Maltose	Xilose
LB 1.2	<i>Cryptococcus laurentii</i>	0*	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 1.4	<i>Cryptococcus flavescens</i>	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 2.2	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1
LB 3.1	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 4.1	<i>Cryptococcus laurentii</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 4.2	<i>Rhodospiridium lusitaniae</i>	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
LB 5.1	<i>Cryptococcus flavescens</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 5.2	<i>Cryptococcus flavus</i>	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 6.1	<i>Aureobasidium pullulans</i>	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 10.1	<i>Cryptococcus sp. 1</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 11.1	<i>Aureobasidium pullulans</i>	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 12.1	<i>Cryptococcus flavescens</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1
LB 12.2	<i>Cryptococcus sp. 1</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 12.3	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 12.4	<i>Cryptococcus nemorosus</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 13.1	<i>Cryptococcus flavescens</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 14.1	<i>Rhodospiridium lusitaniae</i>	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
LB 14.2	<i>Rhodospiridium lusitaniae</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
LB 15.2	<i>Aureobasidium pullulans</i>	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 16	<i>Aureobasidium pullulans</i>	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 17.1	<i>Cryptococcus sp. 1</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 17.2	<i>Cryptococcus sp. 1</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 17.3	<i>Cryptococcus sp. 1</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 18.1	<i>Cryptococcus flavescens</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 18.2	<i>Cryptococcus flavescens</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 19.1	<i>Cryptococcus flavescens</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
LB 19.2	<i>Cryptococcus flavescens</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 20.1	<i>Cryptococcus nemorosus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 21	<i>Rhodotorula glutinis</i>	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0
LB 22.2	<i>Cryptococcus flavescens</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 23	<i>Aureobasidium pullulans</i>	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 23.2	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1
LB 24.1P	<i>Aureobasidium pullulans</i>	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
LB 24.1R	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1

APÊNDICE A (continuação)		Triagem enzimática										Assimilação			
Estirpes Ninho1 (2010)		¹ CMC	AM	PG	PE	LIP	XIL	Lig RBB-R	Lig (Lac)	Glicose	Celobiose	Ac. galacturônico	Maltose	Xilose	
LB 26	<i>Rhodotorula glutinis</i>	0*	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	
LB 30.1	<i>Rhodotorula nothofagi</i>	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	
LB 30.2	<i>Rhodotorula nothofagi</i>	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	
LB 31.1	<i>Aureobasidium pullulans</i>	0	0	1	1	1	1	0	0	1	w	w	1	1	
LB 31.2	<i>Aureobasidium pullulans</i>	0	0	0	1	1	1	0	0	1	w	w	1	1	
LB 34.1	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	
LB 34.2	<i>Aureobasidium pullulans</i>	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	
LB 35.1	<i>Cryptococcus flavescens</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	
LB 35.2	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1	0	0	0	1	0	0	0	1	w	1	1	1	
LB 36.1	<i>Aureobasidium pullulans</i>	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	
LB 37.1	<i>Hamaella sinensis</i>	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	
LB 37.2	<i>Hamaella sinensis</i>	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	
LB 37.3	<i>Hamaella zeae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	
LB 38.1	<i>Aureobasidium pullulans</i>	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	
LB 43.1	<i>Aureobasidium pullulans</i>	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	
LB 44.1	<i>Aureobasidium pullulans</i>	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	
LB 45.1	<i>Cryptococcus flavescens</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	
LB 45.2	<i>Cryptococcus flavescens</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	
LB 46.1	<i>Rhodotorula glutinis</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	
LB 47.1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	
LB 47.2	<i>Cryptococcus sp. 2</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	w	1	1	
LB 48.1	<i>Cryptococcus sp. 1</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	
LB 49.1	<i>Hamaella kanningensis</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	
LB 50.1	<i>Aureobasidium pullulans</i>	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	
LB 50.2	<i>Aureobasidium pullulans</i>	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	
LB 51.1	<i>Hamaella sp. 1</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	
LB 52.1	<i>Cryptococcus flavescens</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	
LB 52.2	<i>Kazachstania unisporea</i>	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	
LB 52.3	<i>Hamaella sp. 1</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	
LB 53.1	<i>Hamaella sp. 1</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	
LB 54.1	<i>Aureobasidium pullulans</i>	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	w	1	1	
LB 55.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	
LB 57.1	<i>Cryptococcus nemorosus</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	
LB 57.2	<i>Cryptococcus nemorosus</i>	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	
LB 58.1	<i>Rhodotorula glutinis</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	1	w	0	1	1	

APÊNDICE A (continuação)

Estirpe	Identificação	Triagem enzimática										Assimilação			
		¹ CMC	AM	PG	PE	LIP	XIL	Lig RBB-R	Lig (Lac)	Glicose	Celobiose	Ac. galacturônico	Maltose	Xilose	
LB 59.2	<i>Cryptococcus nemorosus</i>	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	
LB 60.1	<i>Aureobasidium pullulans</i>	1*	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	
LB 60.2	<i>Rhodotorula dairenensis</i>	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	
LB 61.1	<i>Rhodotorula dairenensis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	
LB 62.1	<i>Cryptococcus nemorosus</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
LB 63.1	<i>Hamaella kunningensis</i>	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	
LB 63.2	<i>Aureobasidium pullulans</i>	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	
LB 65.1	<i>Aureobasidium pullulans</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	
LB 65.2	<i>Aureobasidium pullulans</i>	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	
LB 66.1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	
LB 67.1	<i>Cryptococcus sp. I</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
LB 67.2	<i>Cryptococcus flavus</i>	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	
LB 68.1	<i>Rhodotorula marina</i>	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	w	1	
LB 69.1	<i>Cryptococcus flavescens</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
LB 70.1	<i>Rhodospiridium babjevae</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	
LB 70.2	<i>Cryptococcus nemorosus</i>	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	
LB 71.1	<i>Rhodotorula glutinis</i>	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	
LB 72.1	<i>Cryptococcus nemorosus</i>	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	
LB 72.2	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	
LB 73.1	<i>Hamaella sinensis</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
LB 75.1	<i>Hamaella zeae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
LB 76.1	<i>Cryptococcus flavus</i>	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	
LB 77.1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	
LB 78.1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	
LB 78.2	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	
LB 79.1A	<i>Cryptococcus flavescens</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
LB 79.1B	<i>Aureobasidium pullulans</i>	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	
LB 80.1	<i>Aureobasidium pullulans</i>	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	
LB 80.2	<i>Aureobasidium pullulans</i>	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	
LB 82.1	<i>Cryptococcus flavescens</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
LB 82.2	<i>Cryptococcus flavescens</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	
LB 83	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	
LB 84	<i>Cryptococcus flavescens</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
LB 85.1	<i>Cryptococcus nemorosus</i>	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	
LB 85.2	<i>Cryptococcus nemorosus</i>	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	

APÊNDICE A (continuação)

Estirpe	Identificação	Triagem enzimática							Assimilação					
		¹ CMC	AM	PG	PE	LIP	XIL	Lig RBB-R	Lig (Lac)	Glicose	Celobiose	Ac. galacturônico	Maltose	Xilose
LB 86	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 87	<i>Hannaella sinensis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 88	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 89	<i>Aureobasidium pullulans</i>	1*	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1
Total		46	7	17	42	53	41	1	0	108	91	83	99	101

APÊNDICE A (continuação)

Estirpe	Identificação	Triagem enzimática							Assimilação					
		¹ CMC	AM	PG	PE	LIP	XIL	Lig RBB-R	Lig (Lac)	Glicose	Celobiose	Ácido galacturônico	Maltose	Xilose
LB 100.1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	0*	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 101.1	<i>Cryptococcus nemorosus</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 102.1	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 103.2	<i>Cryptococcus flavescens</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 104.1	<i>Cryptococcus haglerorum</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
LB 104.2	<i>Cryptococcus haglerorum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
LB 104.3	<i>Cryptococcus haglerorum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1
LB 105.1	<i>Cryptococcus haglerorum</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1
LB 105.2	<i>Cryptococcus haglerorum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1
LB 106.1	<i>Trichosporon chiarellii</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1
LB 107.1	<i>Trichosporon chiarellii</i>	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 108.1	<i>Cryptococcus haglerorum</i>	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 108.2	<i>Cryptococcus haglerorum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 108.3	<i>Cryptococcus haglerorum</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 109.1	<i>Rhodospiridium babjevae</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1
LB 110.1	<i>Trichosporon chiarellii</i>	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1
LB 112.1	<i>Candida maltosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 113.1	<i>Cryptococcus haglerorum</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
LB 115.1	<i>Cryptococcus haglerorum</i>	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 116.1	<i>Cryptococcus haglerorum</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 116.2	<i>Cryptococcus haglerorum</i>	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 117.1	<i>Cryptococcus haglerorum</i>	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 118.1	<i>Cryptococcus haglerorum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 119.1	<i>Hannaella sp. 1</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 120.1	<i>Cryptococcus haglerorum</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
LB 120.2	<i>Cryptococcus haglerorum</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1

Estirpe	Identificação	Triagem enzimática										Assimilação			
		¹ CMC	AM	PG	PE	LIP	XIL	Lig RBB-R	Lig (Lac)	Glicose	Celobiose	Ácido galacturônico	Maltose	Xilose	
LB 121.1	<i>Cryptococcus laurentii</i>	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 122.1	<i>Trichosporon chiarellii</i>	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
LB 123.1	<i>Hannaella</i> sp. 2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
LB 124.1	<i>Cryptococcus laurentii</i>	0*	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1
LB 125.1	<i>Cryptococcus laurentii</i>	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1
LB 125.2	<i>Cryptococcus laurentii</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1
LB 126.1	<i>Trichosporon chiarellii</i>	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
LB 127.1	<i>Trichosporon chiarellii</i>	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LB 127.2	<i>Trichosporon chiarellii</i>	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
LB 128.1	<i>Hannaella</i> sp. 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
LB 129.1	<i>Cryptococcus haglerorum</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
LB 129.2	<i>Cryptococcus haglerorum</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
LB 130.1	<i>Trichosporon chiarellii</i>	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
LB 131.1	<i>Cryptococcus haglerorum</i>	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
LB 131.2	<i>Cryptococcus haglerorum</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
LB 132.1	<i>Trichosporon chiarellii</i>	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1
LB 133.1	<i>Rhodotorula nothofagi</i>	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1
LB 134.1	<i>Rhodospiridium babjevae</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1
LB 135.1	<i>Trichosporon chiarellii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
LB 137.1	<i>Trichosporon chiarellii</i>	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
LB 137.2	<i>Trichosporon chiarellii</i>	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
LB 137.3	<i>Trichosporon chiarellii</i>	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
LB 139.1	<i>Rhodospiridium babjevae</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1
LB 139.2	<i>Rhodospiridium babjevae</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1
LB 140.1	<i>Trichosporon chiarellii</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
LB 140.2	<i>Trichosporon chiarellii</i>	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
LB 141.1	<i>Cryptococcus</i> sp. 1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1
LB 142.1	<i>Cryptococcus haglerorum</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
LB 142.2	<i>Cryptococcus haglerorum</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
LB 143.1	<i>Cryptococcus haglerorum</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
LB 144.1	<i>Cryptococcus laurentii</i>	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1
LB 144.2	<i>Cryptococcus nemorosus</i>	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1
LB 145.1	<i>Cryptococcus nemorosus</i>	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1
LB 147.1	<i>Cryptococcus haglerorum</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
LB 148.1	<i>Trichosporon chiarellii</i>	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1

APÊNDICE A (continuação)

Estirpe	Identificação	Triagem enzimática							Assimilação					
		¹ CMC	AM	PG	PE	LIP	XIL	Lig RBB-R	Lig (Lac)	Glicose	Celobiose	Ácido galacturônico	Maltose	Xilose
LB 150.1	<i>Trichosporon chiarellii</i>	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1
LB 150.2	<i>Trichosporon chiarellii</i>	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1
LB 151.1	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 153.1	<i>Cryptococcus haglerorum</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 154.1	<i>Trichosporon</i> sp.	0*	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1
LB 155.1	<i>Cryptococcus haglerorum</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
LB 157.1	<i>Cryptococcus haglerorum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1
LB 158.1	<i>Cryptococcus haglerorum</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1
LB 159.1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 159.2	<i>Hamaella luteola</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1
Total		8	0	34	14	30	18	0	0	71	43	31	70	70

APÊNDICE A (continuação)

Estirpe	Identificação	Triagem enzimática							Assimilação					
		¹ CMC	AM	PG	PE	LIP	XIL	Lig RBB-R	Lig (Lac)	Glicose	Celobiose	Ácido galacturônico	Maltose	Xilose
LB 200.1	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	1*	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 201.1	<i>Debaryomyces hansenii</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	w
LB 202.1	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 203.1	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 204.1	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 206.1	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 208.1	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 209.1	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 210.1	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 212.1	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 213.1	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 216.1	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 220.1	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 221.1	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 221.2	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 222.1	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 250.1	<i>Cryptococcus flavescens</i>	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 250.2	<i>Cryptococcus flavescens</i>	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 250.3	<i>Cryptococcus flavescens</i>	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 251.1	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1

Estirpe	Identificação	Trigrem enzimática							Assimilação					
		¹ CMC	AM	PG	PE	LIP	XIL	Lig RBB-R	Lig (Lac)	Glicose	Celobiose	Ácido galacturônico	Maltose	Xilose
LB 251.2	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 251.3	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 252.1	<i>Cryptococcus flavescens</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 252.2	<i>Cryptococcus flavescens</i>	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	w
LB 253.1	<i>Hannaella sp. 1</i>	0*	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 253.2	<i>Hannaella sp. 1</i>	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 253.3	<i>Hannaella sp. 1</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 254.1	<i>Hannaella sp. 1</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 254.2	<i>Cryptococcus flavescens</i>	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 255.1	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 255.2	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	w
LB 255.3	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 256.1	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	w
LB 256.3	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 257.1	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 257.2	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 257.3	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 258.1	<i>Cryptococcus sp. 2</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 258.2	<i>Cryptococcus sp. 2</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 259.1	<i>Hannaella sp. 1</i>	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	w
LB 259.2	<i>Hannaella sp. 1</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 260.1	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 260.2	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 264.1	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 264.2	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 265.1	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 265.2	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 265.3	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 266.1	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 266.2	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 267.1	<i>Cryptococcus flavescens</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 267.2	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 268.1	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	w
LB 268.2	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	w
LB 269.1	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1

APÊNDICE A (continuação)

Estirpes Ninho1 (2011)		Triagem enzimática							Assimilação					
Estirpe	Identificação	¹ CMC	AM	PG	PR	LIP	XIL	Lig RBB-R	Lig (Lac)	Glicose	Celobiose	Ácido galacturônico	Maltose	Xilose
LB 270.1	<i>Cryptococcus sp. 1</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 270.2	<i>Cryptococcus sp. 1</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 271.1	<i>Hamaella luteola</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	w	1	1
LB 271.2	<i>Hamaella luteola</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	w	1	1
LB 272.1	<i>Hamaella luteola</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	w	1	1
LB 272.2	<i>Hamaella luteola</i>	0*	0	1	0	0	0	0	0	1	1	w	1	1
LB 273.1	<i>Hamaella luteola</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	w	1	1
LB 273.2	<i>Hamaella luteola</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	w	1	1
total		37	2	49	48	40	29	0	0	63	61	57	63	56
TOTAL (BITUS)		91	9	100	104	123	88	1	0	242	195	171	232	227

APÊNDICE A (continuação)

Estirpes do solo		Triagem enzimática							Assimilação					
Estirpe	Identificação	¹ CMC	AM	PG	PE	LIP	XIL	Lig RBB-R	Lig (Lac)	Glicose	Celobiose	Ácido galacturônico	Maltose	Xilose
LB 357.1	<i>Trichosporon chiarellii</i>	0*	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
LB 357.2	<i>Trichosporon chiarellii</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
LB 358.1	<i>Trichosporon chiarellii</i>	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1
LB 358.2	<i>Trichosporon chiarellii</i>	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1
LB 359.1	<i>Trichosporon chiarellii</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1
LB 359.2	<i>Trichosporon chiarellii</i>	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1
LB 361.1	<i>Candida pseudolambica</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 362.1	<i>Trichosporon chiarellii</i>	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1
LB 362.2	<i>Trichosporon chiarellii</i>	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1
LB 362.3	<i>Trichosporon chiarellii</i>	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1
LB 362.4	<i>Trichosporon chiarellii</i>	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1
LB 363.1	<i>Candida sp.</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 364.1	<i>Cryptococcus laurentii</i>	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 365.1	<i>Cryptococcus laurentii</i>	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	w	1	1
LB 365.2	<i>Cryptococcus laurentii</i>	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1
LB 365.3	<i>Cryptococcus laurentii</i>	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1
LB 366.1	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1
LB 366.2	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 367.1	<i>Cryptococcus laurentii</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1
LB 368.2	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 369.1	<i>Cryptococcus laurentii</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1

APÊNDICE A (continuação)

Estirpe	Identificação	Triagem enzimática								Assimilação				
		¹ CMC	AM	PG	PE	LIP	XIL	Lig RBB-R	Lig (Lac)	Glicose	Celobiose	Ácido galacturônico	Maltose	Xilose
LB 371.1	<i>Rhodospiridium babjevae</i>	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1
LB 372.1	<i>Candida maltosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1
LB 372.2	<i>Torulaspota globosa</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	w	w
LB 373.1	<i>Cryptococcus laurentii</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1
LB 373.2	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	0*	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 376.1	<i>Torulaspota globosa</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	w	w
LB 377.1	<i>Cryptococcus laurentii</i>	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 377.2	<i>Candida maltosa</i>	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1
LB 378.1	<i>Cryptococcus laurentii</i>	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0
Total solos		2	0	9	8	17	16	0	0	31	16	13	28	28

¹ CMC: CMCase, AM: amilase, PG: poligalacturonase, PL: pectinase, LIP: lipase, XIL: xilanase, Lig RBB-R: ligninase, Lig (Lac): ligninase (lacase). * números '0' indicados na tabela indicam que atividade enzimática e ou assimilação das fontes de açúcar para a referente estirpe e enzima não foi constatada; números '1' indicados na tabela indicam atividade enzimática e ou assimilação das fontes de açúcar foi constatada para a referente estirpe e enzima; 'w' indica uma assimilação das fontes de açúcar para a referente estirpe.