

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)**

---

**EVOLUÇÃO METABÓLICA E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE  
JARDINS DE FUNGO DE FORMIGAS ATTINI AVALIADOS POR  
METATRANSCRIPTÔMICA**



0110008511

**SÉRGIO KAKAZU**

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

Sérgio Kakazu

**EVOLUÇÃO METABÓLICA E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE  
JARDINS DE FUNGO DE FORMIGAS ATTINI AVALIADOS POR  
METATRANSCRIPTÔMICA**



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

Orientador: Prof. Dr. Maurício Bacci Júnior

Rio Claro

2017



Class	( 576 K13e
Tombo	T-8511

BRC 23772



UNΦ47685783

576 K13e	<p>Kakazu, Sérgio</p> <p>Evolução metabólica e potencial biotecnológico de jardins de fungo de formigas Attini avaliados por metatranscriptômica / Sérgio Kakazu. - Rio Claro, 2017 105 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro Orientador: Maurício Bacci Júnior</p> <p>1. Micro-organismos. 2. Microbiologia aplicada. 3. Attina. 4. Polissacarídeos vegetais. 5. Enzimas CAZy. 6. Mutualismo. I. Título.</p>
-------------	---

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP  
Campus de Rio Claro/SP

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA TESE: EVOLUÇÃO METABÓLICA E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE JARDINS DE FUNGO DE FORMIGAS ATTINI AVALIADOS POR METATRANSCRIPTÔMICA**

**AUTOR: SÉRGIO KAKAZU**

**ORIENTADOR: MAURICIO BACCI JUNIOR**

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

  
Prof. Dr. MAURICIO BACCI JUNIOR  
CEIS / IB Rio Claro

  
Prof. Dr. ANDRE RODRIGUES  
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB-Rio Claro

  
Prof. Dr. HENRIQUE FERREIRA  
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro

  
Prof. Dr. ANDRÉ RICARDO DE LIMA DAMASIO  
Bioquímica e Biologia Tecidual / Universidade Estadual de Campinas

  
Prof. Dr. VITOR FERNANDES OLIVEIRA DE MIRANDA  
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Rio Claro, 03 de julho de 2017

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Maurício Bacci Júnior, pela oportunidade do doutorado, pela orientação, paciência e por todo conhecimento transmitido durante todos esses anos.

À minha namorada Amarílis pelo amor, dedicação e paciência. Obrigado por ser a minha companheira de todos os momentos e pela alegria que traz à minha vida.

À Dra. Milene Ferro pela colaboração, análise e sugestões ao meu trabalho.

Ao Prof. Dr. André Rodrigues, Profa. Dra. Terezinha Maria Castro Della Lucia e Prof. Dr. Fernando Pagnocca pelos materiais cedidos para a realização desse trabalho.

Aos membros da banca de defesa: Prof. Dr. André Ricardo de Lima Damásio, Prof. Dr. Henrique Ferreira e Prof. Dr. Vitor Fernandes O. de Miranda pelas contribuições ao meu trabalho.

À Dra. Mariana Lyra pela colaboração e sugestões ao meu trabalho.

À Dra. Virginia Elena Masiulionis pela ajuda no isolamento do material de jardim de fungo.

Aos Professores do Centro de Estudos de Insetos Sociais (C. E. I. S.): Prof. Dr. Mario Sergio Palma, Prof. Dr. Odair Correa Bueno e por todas as contribuições.

À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao Centro de Estudos de Insetos Sociais (C. E. I. S.) por fornecer a estrutura para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos colegas, e queridos amigos de laboratório, Milene Ferro, Mariana Lyra, Renata Aquino e Corina Barrera pela amizade, ajuda e brincadeiras que tornaram o dia-a-dia no laboratório muito mais prazeroso.

Aos amigos Thiago, Paixão, Beto, Octávio, Fabrício, Cacá, Iata, Eliana, Íris, Júnior e Franco pela amizade, anos de convivência.

Agradeço as minhas queridas irmãs Miriam, Lúcia e Paula por fazerem parte da minha vida e pelo apoio que sempre me deram.

Agradeço aos meus pais, Yoshiaki e Chiemi pelo amor incondicional, pela educação e pelo apoio durante toda a minha vida.

Agradeço a minha família por todo o amor, apoio e contribuição na minha formação.

Por fim agradeço a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

## Resumo

Formigas cultivadoras de fungo pertencentes à subtribo Attina (subfamília Myrmicinae) caracterizam-se por apresentar um mutualismo obrigatório com fungos basidiomicetos, que elas cultivam nas câmaras de seus ninhos e utilizam como sua principal fonte de alimento e enzimas, notadamente polissacaridasas. Entre as formigas Attina, cinco sistemas agrícolas foram identificados, cada um deles representando uma transição na evolução da fungicultura. Conhecer as enzimas responsáveis por esta bioconversão é importante tanto para estudos evolutivos quanto para prospecção em biotecnologia. No presente estudo, foram construídas bibliotecas de RNAm de dois fungos isolados, um do jardim da formiga *Atta sexdens* (agricultura das cortadeiras), outro do jardim da formiga basal *Mycocepurus goeldii* (agricultura basal), e de mais dois jardins de fungo de formigas Attina, *Acromyrmex subterraneus* (agricultura das cortadeiras) e *Apterostigma* sp. (agricultura de fungos corais), a fim de caracterizar enzimas responsáveis pela bioconversão de matéria vegetal fresca em açúcares redutores. Nossos resultados demonstram que todos os materiais estudados, exceto o jardim de *Apterostigma* sp., expressaram todas as enzimas necessárias para a degradação da celulose. O jardim de *Apterostigma* sp., aparentemente, possui um sistema celulolítico limitado a degradação da celulose do tipo amorfa. Nossos dados indicam que *L. gongylophorus* não sofreu perda na capacidade de degradar polissacarídeos recalcitrantes de parede celular ao longo da sua história evolutiva. Pelo contrário, *L. gongylophorus* apresentou um melhor potencial para a degradação da xilana quando comparado ao fungo mutualista de *M. goeldii*, representante da forma de agricultura basal. A diferença no número de enzimas CAZy observadas entre o fungo *L. gongylophorus* isolado e o jardim de *A. subterraneus* evidencia uma flexibilidade metabólica em resposta ao tipo de substrato utilizado pelo fungo. Entre os materiais analisados, o fungo *L. gongylophorus* isolado apresentou uma sistema enzimático mais completo para a degradação da biomassa vegetal, sendo portando o microrganismo mais promissor para a produção biotecnológica de açúcares fermentáveis.

**Palavras-chave:** Attina, Jardins de fungo, polissacarídeos vegetais, enzimas CAZy, mutualismo.

## Abstract

Fungus-growing ants belonging to the subtribe Attina (subfamily Myrmicinae) are characterized by an obligatory mutualism with basidiomycete fungi which they grow into the chambers of their nests and use as the main source of food and enzymes, notably polysaccharidases. Among attinas, five agricultural systems have been identified, each representing a transition in the evolution of fungiculture. It is important to understand the enzymes responsible for this bioconversion both for evolutionary studies and for prospecting in biotechnology. In the present investigation, we built libraries of mRNA of two different isolated fungi, one from gardens of the leaf-cutter ant *Atta sexdens* (leaf-cutter agriculture) and another isolated from gardens of the basal ant *Mycocepurus goeldii* (lower agriculture), and two other fungal gardens of attina ants, *Acromyrmex subterraneus* (leaf-cutter agriculture) and *Apterostigma* sp. (coral fungus agriculture) in order to characterize enzymes which are responsible for the bioconversion of vegetal matter into reducing sugars. Our results demonstrate that all the analyzed materials, except the *Apterostigma* sp. garden, expressed all the enzymes necessary for the cellulose degradation. The *Apterostigma* sp. garden apparently has a cellulolytic system limited to the degradation of amorphous cellulose. Our data indicate that *L. gongylophorus* did not suffer any loss in the ability to degrade recalcitrant cell wall polysaccharides throughout their evolutionary history. In contrast, *L. gongylophorus* presented a better potential for degradation of xylan compared to the fungus of *M. goeldii*, representative of the lower agriculture. The observed difference between the numbers of CAZymes in the fungus *L. gongylophorus* isolated and the *A. subterraneus* garden shows a metabolic flexibility in response to the type of substrate used by the fungus. Among the analyzed materials, the fungus *L. gongylophorus* isolated presented a more complete enzymatic system for the degradation of the plant biomass, being the most promising microorganism for the biotechnological production of fermentable sugars.

**Keywords:** Attina, fungus gardens, plant polysaccharides, CAZymes, mutualism.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	6
Caracterização do transcriptoma do Jardim de fungo de diferentes espécies de Attina .....	6
Diversidade e Filogenia de Formigas da Subtribo Attina .....	7
Sistemas de cultivo de fungos e microbiota associada estudados no presente Projeto de Doutorado .....	10
Micro-organismos simbiotes das formigas Attina .....	11
Estrutura e fluxo de carbonos nas culturas de fungo mutualista .....	11
Metatranscriptômica avaliando genes e enzimas importantes para o fluxo de carbonos.....	14
Enzimas Ativas em Carboidratos (CAZy) .....	17
Estrutura da parede celular vegetal .....	18
Celulose .....	19
Hemicelulose .....	20
Xilana .....	20
Xiloglucana.....	20
Galactomanana.....	21
Pectina .....	21
Homogalacturonana .....	21
Xilogalacturonana.....	22
Rhamnogalacturonana I.....	22
Lignina .....	22
Cutina.....	22
Enzimas celulolíticas.....	23
Enzimas hemicelulolíticas .....	24
Enzimas pectinolíticas.....	25
Enzimas ligninolíticas.....	27
Lignina peroxidase .....	27
Manganês peroxidase .....	28
Peroxidase versátil .....	29
Lacase .....	29

Cutinases .....	30
Amido .....	31
Enzimas amilolíticas .....	31
Enzimas quitinolíticas .....	32
OBJETIVOS .....	33
MATERIAL E MÉTODOS .....	34
Extração do RNA total de ninhos de formigas <i>Attina</i> .....	34
Isolamento e extração do RNA total de fungos de formigas <i>Attina</i> .....	34
Análise de qualidade do RNA .....	36
Construção e sequenciamento de bibliotecas transcriptômicas e metatranscriptômicas .....	37
Pré-processamento das sequências .....	37
Análise da qualidade da montagem do transcriptoma .....	38
Agrupamento das sequências .....	38
Obtenção de sequências proteicas e codificadoras de proteínas (CDS) .....	38
Categorização de enzimas ativas sobre carboidratos (CAZy) .....	39
Busca de genes ortólogos entre espécies .....	39
Identificação molecular <i>in silico</i> dos fungos mutualistas .....	39
Anotação funcional das enzimas CAZy .....	40
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	40
Análise de qualidade do RNA .....	41
Sequenciamento de transcriptomas .....	42
Pré-processamento das sequências .....	42
Análise qualidade da montagem do transcriptoma .....	46
Identificação molecular <i>in silico</i> dos fungos mutualistas .....	50
Anotação funcional das Carbohidrases .....	57
CONCLUSÕES .....	81
REFERÊNCIAS .....	83

## INTRODUÇÃO

### Caracterização do transcriptoma do Jardim de fungo de diferentes espécies de *Attina*

Formigas cultivadoras de fungo pertencentes à subtribo *Attina* compõem um grupo monofilético com 15 gêneros e aproximadamente de 300 espécies descritas (BRANDÃO; MAYHÉ-NUNES; SANHUDO, 2011, SOSA-CALVO et al., 2013, JEŠOVNIK et al., 2016), que se caracteriza por apresentar um mutualismo obrigatório com fungos basidiomicetos, que elas cultivam e utilizam como principal fonte de alimento e enzimas (CHERRET et al., 1989, MUELLER et al., 1998, SIQUEIRA et al., 1998), notadamente polissacaridasas (SIQUEIRA et al., 1998, SILVA et al., 2003, SCHULTZ; BRADY, 2008). Apresentam uma distribuição restrita ao Continente Americano, sendo que a maioria das espécies ocorre na Região Neotropical (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

Schultz e Brady (2008) realizaram uma reconstrução da evolução da agricultura *Attina*, identificando cinco sistemas de cultivo de fungos entre as duas linhagens principais das formigas: Na linhagem das *Paleoattini*, ocorrem o sistema (1) basal, com cultivo de fungos filogeneticamente relacionados na tribo *Leucocoprinae*, e (2) cultivo de fungos na Família *Pterulaceae*, por algumas espécies no gênero *Apterostigma*. Na linhagem das *Neoattini*, algumas espécies utilizam o sistema basal e ocorrem ainda os sistemas (3) de cultivo de leveduras, por algumas espécies de *Cyphomyrmex*; (4) cultivo de outras espécies fúngicas na tribo *Leucocoprinae*; (5) cultivo de fungo por formigas cortadeiras, que utilizam vegetação fresca.

Estudos recentes indicaram que suspensões de jardins de fungo de formigas cortadeiras *Atta bisphaerica* (sistema 5) funcionam como um sistema de fermentação em estado sólido, capaz de converter os polissacarídeos das plantas em polióis e monossacarídeos. Tal sistema apresentou um acentuado acúmulo de açúcares redutores nas primeiras doze horas de incubação a 25 °C, o que é uma característica atraente para a produção biotecnológica de açúcares fermentáveis e polióis a partir de biomassa vegetal (SOMERA et al., 2015).

Caracterizar transcritos responsáveis por esta bioconversão é importante tanto para estudos evolutivos quanto para prospecção em biotecnologia. Uma das

maneiras de caracterizar esses transcritos é por meio da confecção de bibliotecas de RNA mensageiro dos micro-organismos presentes em diferentes jardins de fungo. Tal estratégia permite estudar e comparar os perfis de expressão de transcritos de polissacaridases (e outras enzimas) dos micro-organismos presentes nos jardins de fungo dos diferentes sistemas agrícolas, gerando informações importantes para estudos evolutivos. Permite também identificar transcritos microbianos codificando para as proteínas envolvidas com a transferência de carbonos da matéria vegetal para as formigas.

### **Diversidade e Filogenia de Formigas da Subtribo Attina**

As formigas ocupam quase todos os ambientes terrestres e compõem mais de 13.000 espécies descritas (BOLTON et al., 2014). Apresentam um comportamento extremamente especializado, que as tornaram modelo de estudo em muitas áreas da biologia, como evolução, comportamento e comunicação (RABELING et al., 2008).

Todas as espécies de formigas estão agrupadas na família Formicidae, que é dividida em 20 subfamílias (16 atuais e mais 4 extintas) (BOLTON et al., 2014). Dentro da subfamília Myrmicinae está a tribo Attini que, de acordo com a recente reclassificação proposta por Ward et al. (2015), abriga atualmente os membros das antigas tribos *Allomerus*, *Anisopheidole*, *Blepharidatta*, *Cephalotes*, *Diaphoromyrma*, *Lachnomyrmex*, *Lenomyrmex*, *Machomyrma*, *Ochetomyrmex*, *Pheidole*, *Procryptocerus*, *Tranopelta*, *Wasmannia*, bem como os membros da antiga tribo Attini cultivadoras de fungo.

As attina cultivadoras de fungo compõem um grupo monofilético, que se caracteriza por apresentar um mutualismo obrigatório com fungos basidiomicetos. Schultz e Brady (2008) reconstruíram a história evolutiva das attinas com dados de sequenciamento de quatro genes nucleares e fósseis preservados em âmbar demonstraram que a tribo divergiu em dois clados (Paleoattini e Neoattini). O grupo das Paleoattini compreende três gêneros, *Mycocephurus*, *Myrmicocrypta* e *Apterostigma* que formam um grupo menos derivado dentro da tribo. O grupo das Neoattini compreende os gêneros primitivos: *Mycetophylax*, *Mycetarotes*, *Mycetosoritis*, os intermediários *Cyphomyrmex*, *Mycetophylax*, *Mycetagroicus*,

*Sericomyrmex*, *Trachymyrmex*, e os mais derivados *Acromyrmex* e *Atta* (SCHULTZ; BRADY, 2008).

Os membros do grupo das menos derivadas retêm as características mais plesiomórficas e em geral apresentam colônias pequenas, com poucas câmaras de fungos, baixo número de indivíduos e operárias monomórficas. Os membros do grupo derivado pode apresentar grandes colônias com várias câmaras de fungos, um grande número de indivíduos, operárias polimórficas que podem exercer uma função específica dentro da colônia (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

Todas as espécies do grupo menos derivado e a maioria das espécies do grupo derivado utilizam material orgânico morto, como pedaços de folhas e flores secas, sementes e fezes de artrópodes, para o cultivo do fungo mutualista. Já as formigas cortadeiras, que são as mais derivadas e nos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, usam vegetais frescos como substrato para seu fungo (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

Estima-se que esta associação entre as formigas da subtribo *Attina* e seu fungo mutualista tenha se originado há mais de 50 milhões de anos, nas florestas tropicais da América do Sul (MUELLER et al., 2001, SCHULTZ; BRADY, 2008) e constitui um exemplo de simbiose entre herbívoros e comunidade microbiana moldada em milhões de anos de coevolução (SCHULTZ; BRADY, 2008, MIKHEYEV et al., 2010).

Entre as formigas *Attina*, cinco sistemas agrícolas foram identificados, cada um deles representando uma transição na evolução da fungicultura:

Agricultura basal (1), considerada a menos derivada, é praticada até hoje por algumas espécies da subtribo *Attina*. Os fungos cultivados nesse sistema de agricultura pertencem a um grupo parafilético da tribo *Leucocoprineae*, são capazes de levar uma vida livre independente do mutualismo com as attinas (SCHULTZ; BRADY, 2008). As formigas que praticam esse tipo de agricultura são coletoras de detritos e utilizam como substrato para o cultivo do fungo mutualista fezes e restos de artrópodes, flores, frutos e sementes (LEAL; OLIVEIRA, 2000).

Agricultura de fungos corais (2) caracteriza-se pelo cultivo de fungos da família *Pterulaceae*, praticada por algumas espécies de *Apterostigma* do "grupo *pilosum*".

Agricultura tipo *Levedura* (3) caracteriza-se pelo cultivo de fungos da tribo *Leucocoprineae* que crescem em forma de levedura quando associado às attinas,

mas são também capazes de vida livre e nessa situação, cresce na forma de micélio. Praticada por espécies de formigas do “grupo *rimosus*” do gênero *Cyphomyrmex*.

Agricultura Derivada (4) é praticada por espécies do grupo das attinas derivadas que cultivam fungos da tribo Leucocoprinae (SCHULTZ; BRADY, 2008). Estima-se que esse sistema agrícola tenha surgido entre 20 e 10 milhões de anos atrás. As formigas que praticam esse tipo de agricultura utilizam como substrato para o crescimento do fungo vegetação fresca, folhas, flores, polpa de frutos e sementes (LEAL; OLIVEIRA, 2000). Segundo Schultz e Brady (2008) esse tipo de agricultora descende da agricultura basal e apresenta duas características que sugerem um significativo grau de “domesticação” do fungo mutualista: a incapacidade do fungo de exercer uma vida livre, e o surgimento de “gongilídeos” que são vesículas produzidas pelos fungos nas pontas das hifas e utilizadas pelas formigas para a sua alimentação.

Agricultura das Cortadeiras (5), considerada o ápice na evolução da agricultura em Attina (SCHULTZ; BRADY, 2008), é uma subdivisão da agricultura derivada. Este sistema é praticado por espécies dos gêneros *Atta* ou *Acromyrmex*, conhecidas como formigas cortadeiras por terem adquirido a habilidade de cortar e processar material vegetal fresco (folhas e flores) para o cultivo do fungo simbiote (SCHULTZ; BRADY, 2008). Nesse sistema de agricultura as formigas cultivam o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* (Möller), altamente especializado e incapaz de viver fora do mutualismo com as attinas. (MUELLER et al., 2008, MUELLER; RABELING, 2008).

As cortadeiras necessitam de grande quantidade de folhas ou flores para atender à demanda de substrato da colônia, para o desenvolvimento do fungo e alimentação do grande número de indivíduos. Esses recursos são frequentemente adquiridos por meio da desfolhação de florestas neotropicais e savanas (CHERRETT, 1986, HÖLLDOBLER; WILSON 1990, WIRTH et al., 2003), e também de uma ampla faixa de espécies vegetais cultivadas pelo homem, motivo pelo qual algumas espécies de cortadeiras são consideradas pragas para a agricultura (DELLA-LUCIA, 1993, DELLA-LUCIA et al., 2011).

Os ninhos das cortadeiras são, portanto, uma grande biofábrica processando matéria vegetal, notadamente carbonos advindos de polissacarídeos (SIQUEIRA et al., 1998, SILVA et al., 2003), para gerar biomassa de invertebrados e fúngica.

## Sistemas de cultivo de fungos e microbiota associada estudados no presente Projeto de Doutorado

Como citado anteriormente, o cultivo de fungo, conhecido como agricultura é dividido nos cinco sistemas distintos, cada um deles representando uma transição na evolução da fungicultura attina. Com o objetivo de investigar a evolução metabólica que ocorreu desde o sistema mais pleisiomórfico (basal) até a mais derivada (cortadeiras), nós selecionamos abordar no presente trabalho as associações microbianas existentes em quatro espécies em *Attina*: *Apterostigma* sp. (sistema agrícola 2), *Mycocepurus goeldii* (sistema agrícola 1) e as cortadeiras *Acromyrmex subterraneus* e *Atta sexdens* (sistema 5).

O sistema de agricultura do tipo 1, considerado o menos derivado, é praticado até hoje por algumas espécies da subtribo *Attina* (76 espécies). Os fungos cultivados nesse sistema de agricultura pertencem a um grupo parafilético dentro da tribo *Leucocoprineae* e, até onde se sabe, são capazes de levar uma vida livre independente do mutualismo com as attinas (SCHULTZ; BRADY, 2008). As formigas que praticam esse tipo de agricultura são coletoras de detritos e utilizam material orgânico morto, como pedaços de folhas e flores secas, sementes e fezes de artrópodes, para o cultivo do fungo mutualista (MUELLER et al., 2008, MUELLER; RABELING, 2008). Esse tipo de fungicultura surgiu há cerca de 50 milhões de anos, no início do período Eoceno, um período de rápido aquecimento global em que a América do Sul era coberta por grandes florestas úmidas, semelhantes às atuais florestas da Amazônia (MUELLER; RABELING, 2008). O acúmulo de serrapilheira das florestas úmidas favoreceu a instalação de fungos decompositores, proporcionando o cenário ideal para interação das formigas e esses fungos e levando ao surgimento da agricultura nas attinas (MUELLER; RABELING, 2008).

O sistema de agricultura do tipo 2, é praticado por espécies de formigas do subgrupo "pilosum" de *Apterostigma*, são as únicas cultivadoras de fungos da família *Pterulaceae* (LATTKE, 1997). Esse tipo de agricultura surgiu entre 10 e 20 milhões de anos atrás (SCHULTZ; BRADY, 2008) e o material utilizado como substrato são fezes de insetos, sementes, partes de flores, pedaços de madeira e frutos (SCHULTZ; BRADY, 2008; MEHDIABADI; SCHULTZ, 2009).

O sistema de agricultura Attina do tipo 5 é uma subdivisão da agricultura do tipo 4. Este sistema é praticado por 40 espécies cortadeiras de folhas nos gêneros *Atta* ou *Acromyrmex*, é o mais recente e surgiu entre 8 e 12 milhões de anos atrás como o ápice na evolução da agricultura Attina (SCHULTZ; BRADY, 2008). No sistema 5, as formigas cortadeiras cultivam a mesma espécie de fungo altamente especializado (MUELLER et al., 2008, MUELLER; RABELING, 2008), denominado *Leucoagaricus gongylophorus* (Möller) Singer (PAGNOCCA et al., 2001, SILVA-PINHATI et al., 2004, MIKHEYEV et al., 2006).

### **Micro-organismos simbiotes das formigas Attina**

As associações simbióticas modelam a ecologia e a evolução de todos os organismos vivos. As formigas são grandes fontes de informação sobre a origem dessas associações e seus mecanismos genéticos e moleculares, pois possuem grande capacidade de cooperar com diversos organismos (BACCI, 2007).

O mutualismo entre as attinas e fungos é complexo e envolve o processamento do substrato que maximiza o crescimento e produção enzimática pelo fungo simbiote (MARTIN, 1970, SILVA et al., 2003) e a utilização de bactérias estreptomicetas produtoras de antibiótico, para controlar nos formigueiros os parasitas micófagos do gênero *Escovopsis* (CURRIE et al., 1999, CURRIE 2001a/b, MUELLER et al., 2008). Envolve também a bactéria Gram-negativa *Burkholderia* sp., para o controle dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* (SANTOS et al., 2004). Outros micro-organismos (*Trichoderma harzianum*, *Acremonium kiliense*) (SILVA et al., 2006) que competem com o fungo simbiote, dezenas de bactérias (BACCI et al., 1995a), fungos filamentosos (RODRIGUES et al., 2005, 2008) e leveduras (CARREIRO et al., 1997, 2002 e 2004, LITTLE; CURRIE, 2007) vivem também nos ninhos das formigas, provavelmente como comensais.

### **Estrutura e fluxo de carbonos nas culturas de fungo mutualista**

O mais estudado fungo mutualista é *Leucoagaricus gongylophorus* (Möller) Singer (SILVA-PINHATI et al., 2004) (Figura 1), cultivado pelas cortadeiras e pertencente ao grupo dos basidiomicetos, que possuem mais de 30.000 espécies

(ROBERTS; EVANS, 2013). No interior dos ninhos, as culturas de fungo mutualista produzem intumescências apicais chamadas gongilídios, ricas em lipídios e carboidratos, que formam aglomerados conhecidos como estáfilos (MÖLLER, 1893, HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

**Figura 1.** Jardim de fungo de *Acromyrmex subterraneus*.



Foto de Sérgio Kakazu (Junho, 2017).

Os solutos gerados por micro-organismos nos jardins de fungo a partir da degradação de matéria vegetal são fonte de nutrientes, enzimas, aminoácidos e açúcares simples para as formigas (SILVA et al., 2003, 2006), resultando em uma relação de mutualismo de caráter nutricional.

O estado atual do conhecimento sobre os jardins de fungo indica que eles são sistemas muito mais complexos que uma cultura pura de fungo. Os estudos a respeito da composição microbiana dos jardins de fungo fazem parte da vanguarda da pesquisa sobre a simbiose fungo e formiga. No entanto, a maior parte desses estudos não aborda de forma direta as propriedades funcionais de cada um dos micro-organismos presentes no sistema. Grande parte das características na relação da formiga com o fungo mutualista é pouco estudada, tais como os nutrientes das folhas carregadas para os ninhos, as propriedades nutricionais que os fragmentos vegetais apresentam e a forma como esse substrato sustenta os micro-organismos presentes nos jardins de fungo (UKAN, 2011).

A biomassa vegetal integrada ao jardim de fungo é fonte de celulose, hemicelulose, proteína, lignina, açúcares simples e vários outros componentes. No entanto, o mecanismo pelo qual esta biomassa é degradada, convertida em energia para as formigas e como os micro-organismos participam deste processo está pouco elucidado. A glicose e xilose, oriundas do processo de degradação nos jardins de fungo, parecem ser as principais fontes de energia para as operárias (SILVA et al., 2003). Contudo, há controvérsia sobre a degradação de celulose.

Martin e Weber (1969) propuseram que a celulase, produzida pelo fungo mutualista, seria a principal enzima para gerar nutrientes para as formigas a partir da degradação da celulose vegetal. Tal degradação pelo fungo mutualista foi comprovada por Bacci et al. (1995b), que demonstraram que o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* possui a capacidade de degradar alguns polissacarídeos pela atividade de exo e endoglucanases, o que é necessário para a utilização do substrato pelas formigas. No entanto, Siqueira et al. (1998) demonstraram que a celulase é produzida em menor quantidade pelo fungo mutualista quando comparada à de outras enzimas como pectinases, xilanases e amilases. Abril e Bucher (2002) demonstraram que *L. gongylophorus* não é capaz de crescer em cultura pura com celulose como única fonte de carbono.

Estudos que mensuram a degradação da celulose em jardins de fungo também possuem resultados conflitantes. Suen et al. (2010) apontaram que aproximadamente 30% da celulose presente na biomassa são degradados, enquanto que Moller et al. (2011) demonstraram que no ninho de *Acromyrmex echinator*, a celulose não foi significativamente degradada e permaneceu como resíduo no lixo descartado pelas formigas.

Somera et al. (2015) constataram uma digestão bifásica, envolvendo os setores jovem e velho no jardim de fungo de *Atta bisphaerica*, com uma baixa atividade celulásica.

Tendo em vista que a degradação do material vegetal nos jardins de fungo das formigas attina e a participação dos micro-organismos nesse processo permanece um assunto controverso, propomos no presente trabalho, utilizar a abordagem transcriptômica e metatranscriptômica para obter uma melhor compreensão dos mecanismos enzimáticos dos jardins de fungos e fungos isolados relacionados à utilização da biomassa vegetal.

### **Metatranscriptômica avaliando genes e enzimas importantes para o fluxo de carbonos**

Os estudos com transcriptoma visam à análise do conjunto de RNAm, ou transcritos, cuja expressão se dá por um único organismo ou por um grupo de células em determinado momento, refletindo genes ativamente expressos. A expressão gênica de um organismo pode variar com as condições ambientais, estado de desenvolvimento e tecido de origem (RUDD, 2003) e a avaliação da abundância dos diferentes transcritos pode estimar expressão gênica de determinada célula ou tecido (BOUCK; VISION, 2007).

Entre as tecnologias utilizadas para caracterizar transcritos, a *Next Generation Sequencing* (NGS) tem sido muito utilizada, pois permite flexibilidade e acurácia em estudos de transcriptomas (BOMAR et al., 2011).

Com a metatranscriptômica é possível identificar transcriptomas coletivos em amostras que contenham múltiplas células, espécies ou unidades operacionais taxonômicas. A partir de um ecossistema microbiano, mRNAs ambientais são recuperados e sequenciados para identificação de genes expressos nessa comunidade (GOSALBES et al., 2011).

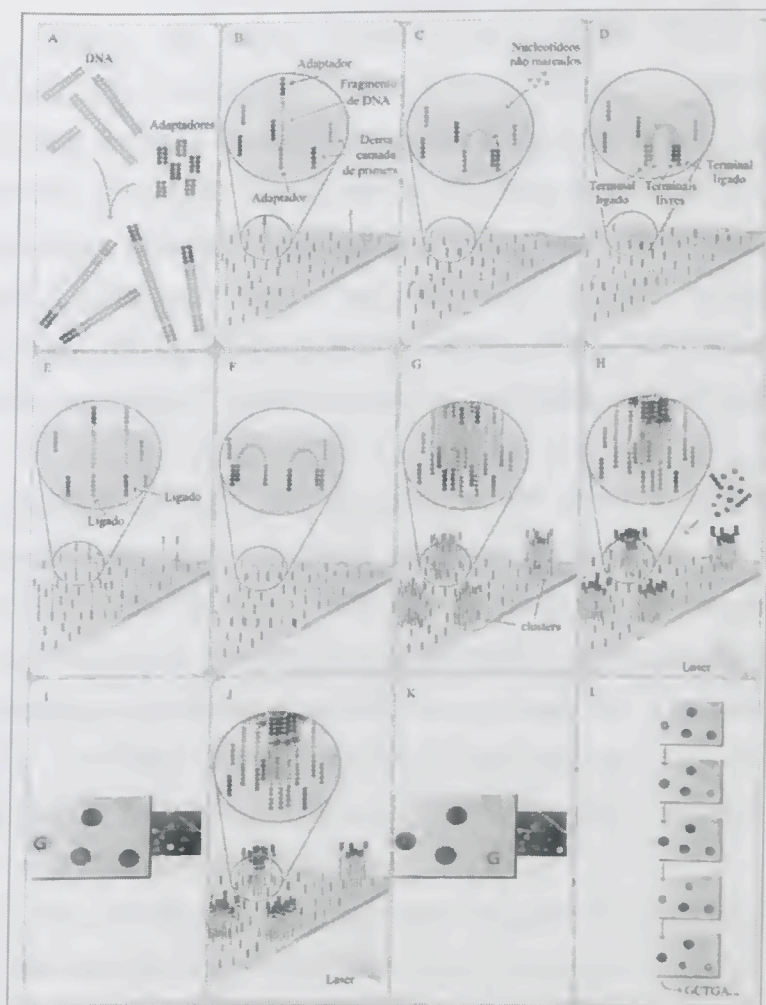
Estudos de expressão gênica bacteriana em larga escala têm substituído a tecnologia microarray por plataformas NGS, já que o sequenciamento de RNA (RNA-seq) tem apresentado várias vantagens sobre técnicas baseadas em hibridização, como detecção de transcrição independente de anotação de sequência, melhor sensibilidade e maior alcance dinâmico para medição da variabilidade em níveis de expressão (CROUCHER; TOMSON, 2010).

Trabalhos recentes com a microbiota intestinal (GOSALBES et al., 2011), amostras de solo (KELLNER et al., 2011) e amostras de água de oceano (SHI et al., 2009) têm utilizado a metatranscritômica na identificação da expressão gênica de comunidades microbianas. Segundo Damon e colaboradores (2012), a genômica ambiental oferece novas oportunidades de se entender, em nível molecular, processos complexos como, por exemplo, a degradação de matéria orgânica, ao permitir o acesso aos genes expressos por micro-organismos presentes em um ambiente.

A tecnologia transcriptômica em pesquisas de jardins de fungo de formigas attina permitiu avaliar as adaptações simbióticas associadas à biossíntese de gongilídeos na cultura fúngica de formigas cortadeiras (DE FINE LICHT et al., 2014). Khadempour et al. (2016) utilizou uma abordagem metatranscritômica para evidenciar uma flexibilidade metabólica em jardins de fungos de formigas cortadeiras em resposta a utilização de diferentes tipos de substratos. Além disso, Nygaard et al. (2016) utilizou uma combinação das abordagens transcriptômica e genômica para documentar mudanças evolutivas em sete espécies de formigas e seus fungos mutualistas, envolvidas com a simbiose.

No presente trabalho, foi feita a caracterização de genes, concentrando naqueles genes relacionados à degradação de polissacarídeos em jardins de fungo de formigas *Attina* em três sistemas de cultivo de fungos distintos. Para tanto, transcritos isolados a partir da microbiota simbiote foram sequenciados utilizando a tecnologia Illumina. Nessa tecnologia, a amostra é preparada com a ligação de adaptadores nas extremidades das sequências de cDNA. Posteriormente, estas são ligadas a uma placa pelos adaptadores e ocorre a amplificação em ponte, sendo formados complexos (*clusters*) de amplificação, que são lidos por um laser que vai identificando as bases. A Figura 2 apresenta um esquema de todas as etapas que compõem o sequenciamento usando Illumina (CARVALHO; SILVA, 2010).

**Figura 2.** Representação das etapas do sequenciamento usando a plataforma Illumina.



(A) Após a extração do RNA total, o kit da TruSeq RNA (Illumina) foi usado para realizar a depleção do rRNA, fragmentação do mRNA, síntese do cDNA e ligação aos adaptadores em ambas as extremidades. (B) As moléculas de DNA fita simples são aderidas por afinidade ao suporte sólido onde estão também aderidos em alta densidade oligonucleotídeos complementares aos adaptadores. Durante a etapa de recozimento (*annealing*) (C), no primeiro ciclo de amplificação da PCR em fase sólida, o adaptador da extremidade livre da molécula aderida ao suporte encontra seu oligonucleotídeo complementar no suporte, formando uma estrutura em ponte. Com os reagentes necessários, a PCR é iniciada utilizando a extremidade 3' livre do oligonucleotídeo como iniciador (*primer*) (C e D). Na etapa de desnaturação (E), a "ponte" é desfeita mediante elevação de temperatura. Repete-se a etapa de recozimento (F), formando novas pontes e iniciando um novo ciclo de amplificação. (G) Após vários ciclos, são obtidos complexos (*clusters*). Com a incorporação de nucleotídeos terminais marcados e excitação a laser (H), é gerado um sinal, o qual é captado por dispositivo de leitura e interpretado como um dos quatro possíveis nucleotídeos componentes da cadeia (I). O processo de incorporação de nucleotídeo marcado, excitação e leitura é repetido para cada nucleotídeo componente da sequência (J, K). A leitura é feita de forma sequencial, o que permite a montagem da sequência completa de cada complexo (L). Fonte: Carvalho e Silva, (2010).

## Enzimas Ativas em Carboidratos (CAZy)

O banco de dados CAZy (Carbohydrate Active enZymes database - [www.CAZy.org](http://www.CAZy.org)), on-line desde 1998, abriga informações sobre as enzimas ativas em carboidratos, ou seja, enzimas envolvidas na síntese, degradação e modificação de carboidratos (LEVASSEUR et al., 2013). Essas enzimas CAZy estão organizadas em diferentes famílias, baseado na sequência de aminoácido relacionada aos módulos catalíticos. Essas famílias são: glicosil hidrolases (GHs), glicosil transferases (GTs), polissacarídeo liases (PLs), carboidratos esterases (CEs), atividades auxiliares (AAs) e módulos de ligação ao carboidrato (CBMs) (CAZy, 2014).

As GHs que são um amplo grupo de enzimas que hidrolisam as ligações glicosídicas entre dois ou mais carboidratos ou entre um carboidrato e outra molécula (HENRISSAT et al., 1997), atualmente são constituídas por 145 famílias de proteínas. Devido ao grande número e ampla distribuição essa classe tornou a mais bem caracterizada, dentre o conjunto de enzimas CAZy (CANTAREL et al., 2009).

As GTs estas são as enzimas responsáveis pela biossíntese de ligações glicosídicas a partir de doadores de açúcares ativados (YIP et al., 2006), compreende atualmente 103 famílias.

As PLs são responsáveis pela clivagem de polissacarídeos contendo ácido urônico através de um mecanismo de  $\beta$ -eliminação gerando um resíduo de ácido hexenurônico insaturado e uma nova extremidade redutora no ponto de clivagem (YIP et al., 2006), compreende 26 famílias.

As CEs removem substituintes ésteres presentes em mono, oligo e polissacarídeos e assim facilitam a ação de GHs em polissacarídeos complexos (CANTAREL et al., 2009), compreendendo atualmente 16 famílias.

As AAs, que agrupam enzimas que atuam na degradação de material lignocelulósico por uma via oxidativa (LEVASSEUR et al., 2013), estão agrupados em 13 famílias.

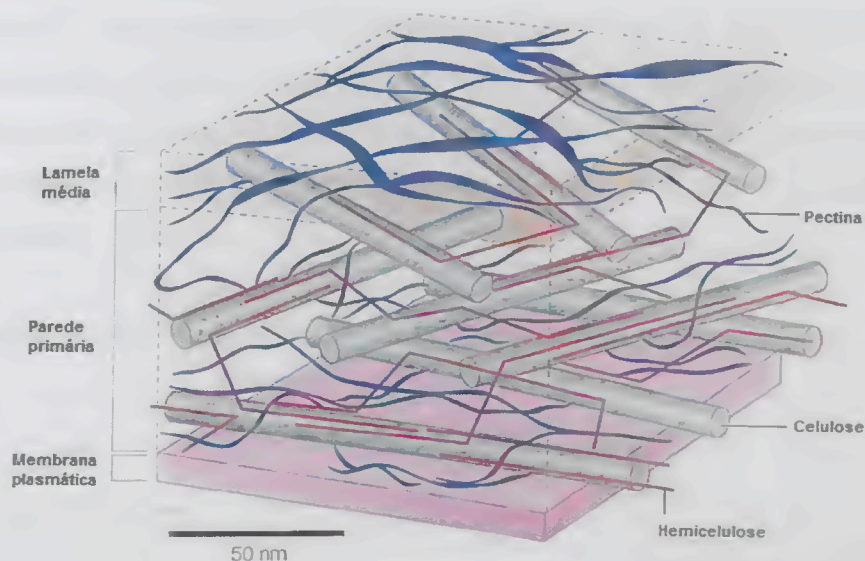
Os CBMs são fragmentos de proteína não catalíticos, estão frequentemente associados aos outros módulos catalíticos de enzimas CAZy no mesmo polipeptídeo e atuam se ligando ao carboidrato para direcionar e prolongar a interação desse módulo catalítico com o substrato e dessa forma potencializar a atividade enzimática (HASHIMOTO, 2006).

As enzimas de fungos envolvidas na degradação de polissacarídeos de plantas estão distribuídas em pelo menos 35 famílias de glicosil hidrolases (GH), 3 famílias de carboidrato esterases (CE) e 6 famílias de polissacarídeo liase (PL) (BATTAGLIA te al., 2011, COUTINHO te al., 2009).

### Estrutura da parede celular vegetal

A parede celular vegetal é composta por uma mistura complexa de polissacarídeos e outros compostos secretados pela célula e que se encontram muito bem organizadas por meio de ligações covalentes e não covalentes (TAIZ; ZIEGER, 2002). Os polissacarídeos representam cerca de 90% do peso seco da parede vegetal e são formados principalmente por celulose, que compõe de 20 a 40% da parede celular, hemicelulose (15-25%) e pectina (~30%) (BUCKERIDGE, 2010) (Figura 3).

**Figura 3.** Estrutura da parede celular vegetal.



Fonte: Modificado de Smith, (2001).

Além dos polissacarídeos, a parede celular é também impregnada pela lignina, um polímero aromático que fornece rigidez a planta (CASSAB, 1998). A composição da biomassa vegetal pode variar em função de diversos fatores como a

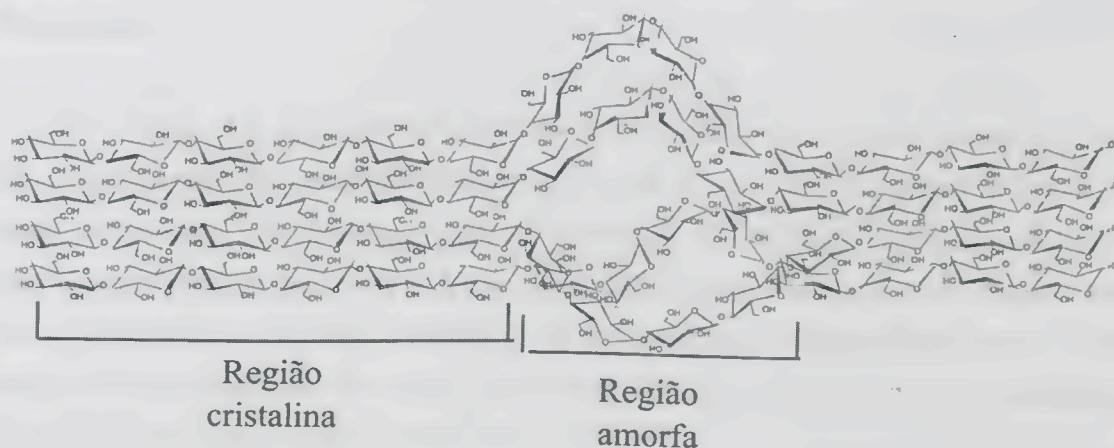
espécie, tipo de tecido, estágio de desenvolvimento e condições ambientais (FRESHOUR et al., 1996, KNOX, 2008, POPPER, 2008).

Nos vegetais, arquitetura da parede celular é determinada, principalmente, pelas moléculas de celulose que estão organizadas em fibrilas entrelaçadas, que são integradas em unidades maiores denominadas microfibrilas, que por sua vez compõem as fibras (PAAKKO et al., 2007). As microfibrilas de celulose se encontram embebidas em uma matriz amorfa, formada de polissacarídeos como hemiceluloses, pectinas, e lignina, conferindo suporte estrutural às plantas (MORTIMER et al., 2010, SILVEIRA et al., 2013).

## Celulose

A celulose é um dos principais constituintes da parede celular vegetal formada por monômeros de D-glicose ligados por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas que formam moléculas de celobiose. As celobioses formam longas cadeias, chamadas de fibrilas, que são ligadas por ligações de hidrogênio e por forças de *van der Waals* (PERÉZ et al., 2002). As microfibrilas, formadas por um conjunto de fibrilas, são altamente organizadas, rígidas, cristalinas, de difícil acesso pelas enzimas e resistentes à degradação. Possuem algumas regiões menos organizadas, chamadas de amorfas na cadeia de celulose, que são suscetíveis ao ataque enzimático (FENGEL; WEGENER, 1989) (Figura 4).

Figura 4. Estrutura da celulose com destaque para as regiões cristalina e amorfa.



Fonte: Farinas, (2011).

## Hemicelulose

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos formados por resíduos de hexoses (glicose, manose e galactose), pentoses (xilose e arabinose), ácidos urônicos (LIMAYEM; RICKE, 2012). Esses açúcares estão ligados por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 e ocasionalmente  $\beta$ -1,3 formando uma cadeia principal, a partir da qual surgem ramificações laterais de cadeias curtas de outros compostos. As ramificações laterais têm função de prevenir que a xiloglicana se transforme em uma microfibrila cristalina (SCHELLER; ULVSKOV, 2010). As hemiceluloses são classificadas de acordo com o açúcar predominante na cadeia principal e na ramificação lateral (BUCKERIDGE, 2010).

## Xilana

A xilana corresponde a um grupo de polissacarídeos poliméricos, é a principal hemicelulose encontrada na parede celular secundária das eudicotiledôneas e todos os tipos de parede das monocotiledôneas (PAULY et al., 2013). Sua cadeia principal é formada por unidades de  $\beta$ -D-xilose unidas por ligações  $\beta$ -1,4. Normalmente apresenta ramificações laterais constituídas de resíduos de ácido glicurônico, ácido 4-O-metilglicurônico, L-arabinose, ácido acético, ácido ferúlico, ácido p-cumárico e D-galactose. (DE VRIES; VISSER, 2001, COLLINS et al., 2005, SCHELLER; ULVSKOV, 2010).

## Xiloglucana

A xiloglucana é a hemicelulose mais abundante na parede celular primária das eudicotiledôneas, correspondendo de 20 a 30 % do peso seco (FRY et al., 1989). Apresenta uma cadeia principal formada por resíduos de D-glicose unidos por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4, em que 75 % destes resíduos estão ligados pelo C-6 a unidades de D-xilose. Resíduos de L-arabinose e D-galactose podem estar associados aos resíduos de xilose, formando cadeias laterais di- ou tri-glicosiladas (CAFFALL; MOHNEN, 2009, GÍRIO et al., 2010).

## Galactomanana

Galactomananas são hemiceluloses com estruturas formadas por manose unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) na cadeia principal, com resíduos de galactose unidos por ligações do tipo  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6) (BUCKERIDGE et al., 2000). Ocorrem tipicamente em endosperma de sementes de leguminosas (BUCKERIDGE et al., 1995, VIEIRA et al., 2007) onde exercem um importante papel na regulação hídrica nos primeiros estádios da germinação (REID; BEWLEY, 1979).

## Pectina

Pectina é um termo designado para uma família de polissacarídeos de estrutura complexa e heterogênea, cuja cadeia principal consiste principalmente em resíduos de ácido D-galacturônico unidos por ligações do tipo  $\alpha$ -1,4 que podem ser metilesterificadas ou acetiladas (MOHNEN, 2008). Além do ácido D-galacturônico, proporções variáveis de outros açúcares, como D-galactose, L-arabinose, D-xilose, L-ramnose, L-fucose também podem ser encontradas (MENEZES, 2006). Compreende aproximadamente 30% da matéria seca de biomassa e atua estruturalmente na parede celular das plantas sendo importante nos processos de crescimento, desenvolvimento, morfogênese, defesa, adesão célula-célula e expansão celular (VORAGEN et al., 2009, BUCKERIDGE, 2010).

## Homogalacturonana

A homogalacturonana é o tipo de pectina mais abundante na parede celular vegetal contabilizando aproximadamente 60% da quantidade total desse polissacarídeo (MOHNEN et al., 2008). É constituída de uma cadeia principal composta por unidades de ácido galacturônico em ligação  $\alpha$ -1,4, que podem estar parcialmente esterificadas, razão pela qual são mais resistentes à hidrólise (BRETT; WALDRON, 1996, WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006). É importante ressaltar que não é só a quantidade, mas também a distribuição desses ésteres ao longo do polímero é responsável pela sua propriedade física (VORAGEN et al., 2009).

## Xilogalacturonana

A xilogalacturonana é uma homogalacturonana substituída com resíduos de D-xilose na posição C-3. O grau de xilosidação pode variar entre 25% (melancia) a 75% (maçã). É encontrado principalmente nos tecidos reprodutivos como frutos e sementes (CAFFALL; MOHNEN, 2009, VORAGE et al., 2009).

## Rhamnogalacturonana I

A rhamnogalacturonana I possui uma cadeia principal composta de unidades repetidas do dissacarídeo formado por resíduos de ácido galacturônico em ligação  $\alpha$ -1,4 e resíduos de ramanose em ligação  $\alpha$ -1,2. Apresentam em aproximadamente 50% dos resíduos de ramnose, pontos de ramificação de cadeias laterais curtas, ricas em arabinose e/ou galactose, distribuídas de forma não regular (CAFFALL; MOHNEN, 2009).

## Lignina

É um polímero amorfo composto basicamente de três diferentes unidades de fenilpropanos: álcool p-cumárico, álcool coniferílico e álcool sinapílico. A estrutura da lignina apresenta uma alta complexidade, possui regiões amorfas e estruturas globulares. Devido à sua estrutura a lignina atua como uma barreira física para as enzimas que podem ser irreversivelmente capturadas pela lignina e, conseqüentemente, influenciar na quantidade de enzima requerida para a hidrólise, assim como dificultar a recuperação da enzima após a hidrólise (ROWELL, 2005, SANTOS et al., 2012). A lignina pode representar até 25% de toda a biomassa lignocelulósica produzida no planeta e seu teor nos resíduos vegetais pode atingir até 40% da sua massa seca (FENGEL; WEGENER, 1989).

## Cutina

A cutina é um polímero composto majoritariamente por ácidos graxos C<sub>16</sub> e C<sub>18</sub> contendo grupos hidroxilas e epóxidos. Os monômeros de ácidos graxos estão predominantemente ligados por ligações éster, entretanto ligações do tipo éter e

pontes de peróxido também são encontradas. Encontrada na cutícula de plantas superiores, o papel da cutina é proteger a planta das invasões dos patógenos e sua degradação enzimática é uma das primeiras etapas no processo de infecção (CARVALHO et al., 1999).

## Enzimas celulolíticas

As celulasas são enzimas que constituem um complexo capaz de atuar promovendo a hidrólise de materiais celulósicos. As enzimas do sistema celulolítico podem ser classificadas em três tipos principais que atuam em sinergia para a liberação de glicose. São elas: endoglucanases (EC 3.2.1.4), exoglucanases (EC 3.2.1.91) e  $\beta$ -glicosidase (EC 3.2.1.21) (CASTRO; PEREIRA JR., 2010).

As endoglucanases são as enzimas que hidrolisam randomicamente as regiões internas da fibra celulósica, clivando ligações  $\beta$ -1,4 na região central da molécula e liberando açúcares e oligossacarídeos. Esta atividade resulta em uma rápida redução no tamanho da cadeia, devido à sua fragmentação em oligossacarídeos de diversos tamanhos (DIENES et al., 2004).

As celobiohidrolases atuam nas extremidades da molécula de celulose de maneira progressiva, podem ser divididas em dois tipos: tipo I, que atuam nos terminais redutores e tipo II, que atuam nos terminais não redutores liberando glicose e principalmente, celobiose como produtos (LYND et al., 2002). Essas enzimas geralmente sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise (celobiose) (CASTRO; PEREIRA Jr., 2010).

As  $\beta$ -1,4-glicosidases finalizam a despolimerização da celulose hidrolizando a celobiose e oligossacarídeos solúveis liberando glicose (CASTRO; PEREIRA Jr., 2010).

Quando essas enzimas do complexo celulolítico atuam em conjunto (em sinergismo) apresentam um rendimento superior que a soma dos rendimentos individuais (LYND et al., 2002, ZHANG et al., 2004).

## Enzimas hemicelulolíticas

Devido à diversidade e complexidade da estrutura da hemicelulose, sua degradação requer uma diversidade equivalente de enzimas para a sua degradação (DODD; CANN, 2009).

A hidrólise enzimática da hemicelulose requer a ação sinérgica de diversas endoenzimas, exoenzimas e enzimas auxiliares (KIRK; CHAN, 1981). As exoenzimas removem unidades dos terminais da cadeia principal do polímero, enquanto que as endoenzimas hidrolisam as ligações internas em qualquer ponto ao longo da molécula (MATHEWSON, 1998). As enzimas auxiliares atuam removendo as ramificações laterais tornando a cadeia principal acessível ao ataque enzimático das endoenzimas (VAN DEN BRINK; DE VRIES, 2011).

As endoxilanases e  $\beta$ -xilanases hidrolisam as ligações glicosídicas internas da cadeia principal da xilana, diminuindo o seu grau de polimerização, produzindo xilooligômeros e xilobiose. Os xilooligômeros e xilobiose produzidos pela endoxilanases são hidrolisados pela  $\beta$ -xilosidases que liberam xilose a partir da extremidade não redutora (SUBRAMANIYAN; PREMA, 2002, ALVES-PRADO et al., 2010). As enzimas endo-1,4-  $\beta$ -mananases são responsáveis pela hidrólise aleatória das ligações  $\beta$ -1,4-manano da cadeia principal de galactomananas, liberando cadeias lineares e ramificadas de mananoligossacarídeo de vários comprimentos (KREMnický; BIELY, 1997). A enzima  $\beta$ -1,4-mannosidase atua nas extremidades não redutoras dos mananoligossacarídeos liberando manose (ADEMARK et al., 1998). As enzimas xiloglucanase que atuam quebrando a cadeia principal da xiloglucana liberando xiloglico-oligossacarídeos (FRY, 1995, MASTER et al., 2008).

As cadeias laterais presentes na hemicelulose são removidas pela ação das enzimas auxiliares que requerem a enzima específica para cada grupo a ser hidrolisado.  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases hidrolisam as ramificações de L-arabinose presentes em arabinoxilanas e glicuronoarabinoxilanas (DE VRIES; VISSER, 2001);  $\alpha$ -glucuronidases atuam hidrolisando as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,2 entre o ácido glucurônico ou ácido metil-glucurônico e resíduos de xilose em glucuronoxilano;  $\alpha$ -galactosidases atuam liberando os resíduos de  $\alpha$ -1,6- galactosil a partir da hemicelulose, como xilanos e galactomananos (VAN DEN BRINK; DE VRIES, 2011); acetilxilana esterases removem grupos acetil presentes (CAUFRIER et al., 2003); feruloil esterases clivam as ligações éster entre resíduos de cadeia lateral de

arabinose (JOVANOVIC et al., 2009, POLIZELI et al., 2005);  $\alpha$ -xilosidases hidrolizam resíduos de D-xilose com ligações do tipo alfa da cadeia principal de xiloglucanos (VAN DEN BRINK; DE VRIES, 2011);  $\alpha$ -fucosidases hidrolisam resíduos de L-Fucose em ramificações de xiloglucana (VAN DEN BRINK; DE VRIES, 2011);  $\beta$ -galactosidases hidrolisam os terminais não redutores de resíduos de  $\beta$ -D galactose nos componentes da parede celular vegetal, incluindo hemiceluloses ou pectinas (GAMAUF et al., 2007).

O sinergismo entre as enzimas xilanolíticas aumenta a susceptibilidade do polímero de xilana ao ataque enzimático (DE VRIES et al., 2001).

### Enzimas pectinolíticas

As pectinases são um importante grupo heterogêneo de enzimas, que hidrolisam a pectina presente na lamela média e na parede primária das células vegetais (GOMES et al., 2007). As enzimas do complexo pectinolítico podem ser classificadas em três tipos, de acordo com o seu modo de ação: pectina esterases, hidrolases e liases (GARG et al., 2016).

As pectina esterases, representadas pela enzima pectina metil-esterase, catalisam a deseterificação dos resíduos metil da pectina, liberando metanol, e são as primeiras enzimas a atuar na degradação da pectina (SAKAI et al., 1993), permitindo que poligalacturonases (HUBER, 1983) e liases atuem no polímero (SAKAI et al., 1993).

As hidrolases catalisam a clivagem hidrolítica da ligação  $\alpha$ -1,4-glicosídica do ácido pécico e da pectina (GARG et al., 2016). Esse grupo compreende as enzimas endopoligalacturonases, que catalisam a clivagem da ligação  $\alpha$ -1,4 entre os resíduos de ácido galacturônico pelo mecanismo de hidrólise, liberando oligogalacturonatos; as exopoligalacturonases, que hidrolisam as ligações sucessivas do ácido poligalacturônico a partir da extremidade não redutora, liberando ácidos digalacturônicos livres (PILNIK; ROMBOUTS, 1981, JAYANI et al., 2005); as enzimas endo e exo-ramnogalacturonases, que atuam na despolimerização da cadeia principal das regiões mais ramificadas (ramnogalacturonana) da pectina (VAN DEN BRINK; DE VRIES, 2011); e as xilogalacturonases, que promovem a clivagem hidrolítica da ligação entre resíduos de galacturonato que possuem cadeia

lateral de xilose, liberando dímeros xilose-ácido galacturônico (VLUGT-BERGMANS et al., 2000).

As liases catalisam a clivagem da ligação  $\alpha$ -1,4-glicosídica no ácido péctico e pectina, por reação de trans-eliminação, formando galacturonato e galacturonato de metila, respectivamente (GARG et al., 2016). O grupo das liases incluem as enzimas pectato-liases, que clivam ligações glicosídicas preferencialmente no ácido poligalacturônico formando produtos insaturados (-4,5-D-galacturonato), através de reação de transeliminação; pectina-liases, que catalisam a clivagem de forma randômica da pectina, preferencialmente de alta metilação, produzindo metiloligogalacturonatos através da transeliminação das ligações glicosídicas (PEDROLLI et al., 2009); e ramnogalacturonana liases, que catalisam a transeliminação, ao acaso, da ligação ramnose-galacturonato da cadeia ramnogalacturonana, produzindo um galacturonato insaturado na extremidade não redutora de um oligômero e um segundo oligômero contendo ramnose como o resíduo da extremidade redutora (PEDROLLI et al., 2009).

Existem ainda as enzimas acessórias envolvidas na degradação das cadeias laterais de pectinas, incluindo  $\alpha$ -rhamnosidases, que realizam a clivagem da cadeia de ramnogalacturonana a partir da extremidade não redutora liberando ramnose (PEDROLLI et al., 2009); a ramnogalacturonana hidrolases, que hidrolisam randomicamente a cadeia de ramnogalacturonana, produzindo oligogalacturonatos (PEDROLLI et al., 2009); xilogalacturonases, que catalisam a clivagem hidrolítica das ligações glicosídicas entre dois resíduos galacturonato na cadeia de ramnogalacturonana substituída por xilose, produzindo dímeros xilose-galacturonato (PEDROLLI et al., 2009, VAN DER VLUGT-BERGMANS et al., 2000); exoarabinanases, que liberam a arabinose das extremidades não redutoras de polímeros arabinanas (CHAVEZ MONTES et al., 2008); endoarabinanases, que hidrolisam a cadeia principal de arabinana (DUNKEL; AMADO, 1995); endo-1,4- $\beta$ -galactanases, que hidrolisam polissacarídeos galactanos, nas cadeias laterais de galactano da pectina, resultando na liberação de galactobiose e galactose (DE VRIES; VISSER, 2001);  $\alpha$ -rhamnosidases, que liberam os resíduos de  $\alpha$ -L-Rhamnose dos terminais não redutores (MUTER et al., 1994); pectina acetil-esterases, que removem resíduos acetil da cadeia principal (YADAV et al., 2009); feruloil esterases, que atuam hidrolisando ligações éster de ácidos ferúlicos e outros ácidos hidroxicinâmicos presentes em cadeias de polissacarídeos da parede de

células vegetais (POLIZELI et al., 2005, DODD; CANN, 2009); ramnogalacturonana acetilesterases, que catalisam a clivagem de grupos acetil da cadeia de ramnogalacturonana (PEDROLLI et al., 2009); e  $\alpha$ -arabinofuranosidase,  $\beta$ -galactosidase, endogalactanase,  $\beta$ -xilosidase (VAN DEN BRINK; DE VRIES, 2011).

### **Enzimas ligninolíticas**

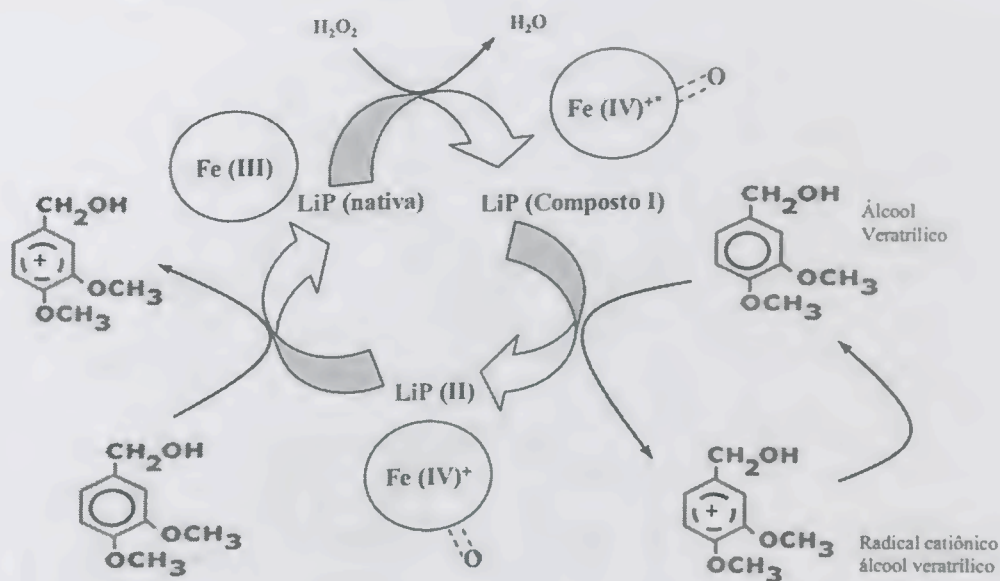
De acordo com Aguiar e Ferraz (2011) o sistema ligninolítico é formado pelas enzimas denominadas fenoloxidasas, que compreendem as peroxidases e lacases, mais as enzimas acessórias.

As peroxidases compreendem um grupo de enzimas oxi-redutases que catalisam a redução do peróxido e a oxidação de uma série de substratos orgânicos e inorgânicos (IKEHATA, 2004). São enzimas extracelulares dependentes de  $H_2O_2$  para atuarem na degradação da lignina (POMPEU, 2010).

### **Lignina peroxidase**

A lignina peroxidase é uma heme-proteína glicosilada, que possui um alto potencial de oxidação, sendo capaz de mediar a oxidação de substratos aromáticos fenólicos e não fenólicos utilizando o  $H_2O_2$  como cofator (PAPINUTTI; FORCHIASSIN, 2004). No ciclo catalítico da lignina peroxidase, o  $Fe^{+3}$  é oxidado a  $Fe^{+4}$ , pelo peróxido de hidrogênio, formando o composto I que é capaz de oxidar a lignina e compostos relacionados. Por meio da transferência de um elétron é formado o composto II e, em presença de um agente redutor a enzima volta à condição nativa. Entretanto, o excesso de peróxido de hidrogênio torna o composto II inativo (MARTINEZ, 2002) (Figura 5).

Figura 5. Ciclo catalítico da lignina peroxidase.

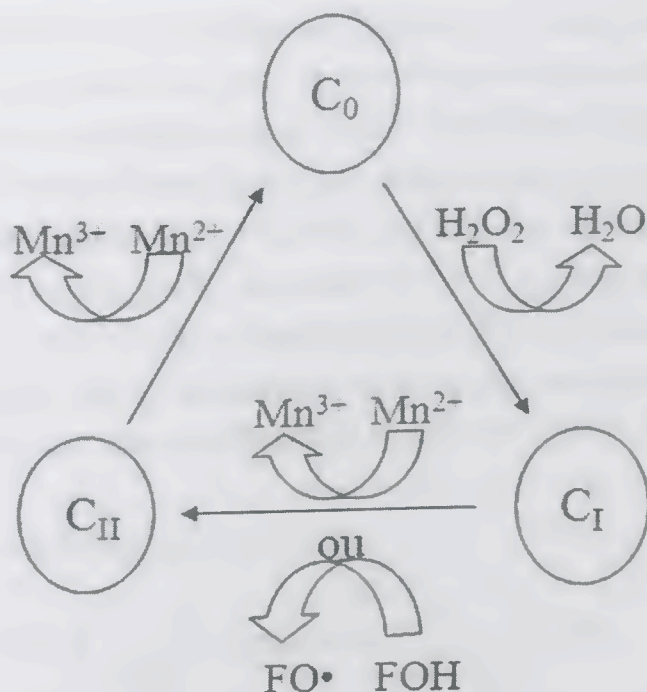


Fonte: Moreira Neto, (2006).

### Manganês peroxidase

A manganês peroxidase é uma heme-proteína glicosilada, possui um ciclo catalítico semelhante à lignina peroxidase, necessitando do  $\text{H}_2\text{O}_2$  como cofator, e catalisa a oxidação de  $\text{Mn}^{+2}$  a  $\text{Mn}^{+3}$  (DASHTBAN et al., 2010; MACIEL et al., 2010), podendo oxidar uma grande variedade de substratos (PAPINUTTI; FORCHIASSIN, 2004). A manganês peroxidase apresenta potencial de redução suficiente para retirar elétrons somente de estruturas fenólicas, embora na presença de mediadores apropriados sua ação possa ser estendida também para estruturas não fenólicas (CARVALHO et al., 2009). O ciclo catalítico desta enzima é iniciado pela ligação do peróxido de hidrogênio ou de um peróxido orgânico à enzima férrica nativa formando o composto I. A seguir, um íon  $\text{Mn}^{+2}$  doa um elétron para este composto, levando a formação do composto II. O composto II abstrai um elétron de outro íon  $\text{Mn}^{+2}$  e retorna à forma nativa. Os íons  $\text{Mn}^{+3}$  gerados neste processo são estabilizados por ácidos orgânicos como o oxalato, malonato, tartarato ou lactato e agem como mediadores difusíveis de baixa massa molecular, os quais atacam moléculas orgânicas não específicas pela abstração de elétrons (HOFRICHTER, 2002) (Figura 6).

Figura 6. Ciclo catalítico da manganês peroxidase.



Fonte: Aguiar e Ferraz, (2011).

### Peroxidase versátil

A peroxidase versátil é uma peroxidase que apresenta uma característica híbrida possuindo ambas as atividades de manganês e lignina peroxidase (CRESTINI et al., 2011; JANUSZ et al., 2013), encontrada em espécies fúngicas dos gêneros *Pleurotus* e *Bjerkandera* (CAMARERO, 1996, MOREIRA et al., 2005). O ciclo catalítico da peroxidase versátil é semelhante ao das demais peroxidases, em que a enzima catalisa a transferência de elétrons para um substrato oxidável como o  $H_2O_2$  envolvendo a formação e redução dos compostos intermediários I e II até a enzima nativa (WONG, 2009).

### Lacase

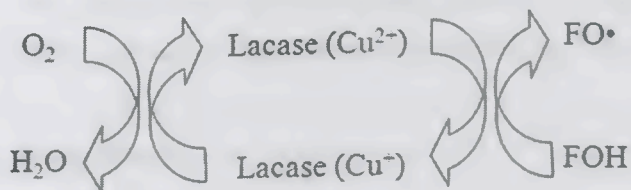
As lacases são polifenóis oxidases (fenoloxidas) produzidas por fungos, bactérias, algas e plantas. São produzidas pela maioria dos Basidiomicetos e sua

massa molecular pode variar de 45 a 100 KDa dependendo da espécie e da isoforma (MOREIRA NETO, 2006).

Essas enzimas são excepcionalmente versáteis e catalisam a oxidação de uma variedade de substâncias orgânicas e inorgânicas até redução do oxigênio molecular em água, por meio de sucessivas oxidações monoelétrônicas do substrato (variedade de substâncias orgânicas e inorgânicas) (BALDRIAN, 2006).

As lacases atuam sobre estruturas fenólica pela abstração de um elétron, em função da redução de  $\text{Cu}^{+2}$  a  $\text{Cu}^{+1}$  que, por sua vez, reduz  $\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$ , retornando a sua forma nativa ( $\text{Cu}^{+2}$ ), e permitindo que a enzima atue de forma cíclica. Essas enzimas também podem degradar estruturas aromáticas não fenólicas através da oxidação de alguns mediadores como o hidroxibenzotriazol (HBT), derivados do ácido benzoico e íons  $\text{Mn}^{+2}$  (AGUIAR; FERRAZ, 2011) (Figura 7).

**Figura 7.** Ciclo catalítico da lacase.



Fonte: Aguiar e Ferraz, (2011).

As enzimas acessórias são enzimas que produzem peróxido. Essas enzimas geram peróxido de hidrogênio, possibilitando a atuação das peroxidases. As principais enzimas produtoras de peróxido envolvidas na biodegradação de lignina são glicose-oxidase e metanol-oxidase, que utilizam glicose e metanol como substratos, respectivamente (KUHAD et al. 1997; KIRK; CULLEN, 1998).

## Cutinases

As cutinases são esterases capazes de degradar polímeros de cutina, são os menores membros da família das serinas hidrolases, consistindo de 197 resíduos de aminoácidos, que apresentam o sítio ativo composto pela tríade catalítica, serina, histidina e ácido aspártico. A sub-família das cutinases consiste em cerca de 20

membros, baseada em sequência de aminoácidos similares (EGMOND; VLIEG, 2000).

## Amido

O amido é um polissacarídeo de reserva do reino vegetal, pode ser armazenado em diferentes órgãos e tecidos vegetais como nas raízes, sementes e tubérculos, na forma de grânulos insolúveis, na maioria das plantas superiores (LEONEL; CEREDA, 2002). Esse polímero é formado por resíduos de glicose ligados uns aos outros através de ligações glicosídicas (LEONEL; CEREDA, 2002). Dois tipos de macromoléculas estão presentes no amido: amilose e amilopectina. A amilose é um polissacarídeo formado por cadeias lineares helicoidais de resíduos de glicose unidas por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 (KOSSMANN; LLOYD, 2000). A amilopectina é uma macromolécula ramificada formada por uma cadeia principal de resíduos de glicose em ligação glicosídica  $\alpha$ -1,4, das quais partem ramificações constituídos de resíduos de glicose unido por ligações  $\alpha$ -1,6 (LASZLO et al., 1986).

## Enzimas amilolíticas

As enzimas que atuam na conversão do amido em compostos de baixa massa molecular são chamadas de enzimas amilolíticas ou  $\alpha$ -glicanases (VIHINEN; MÄNTSÄLÄ, 1989; ANTRANIKIAN et al., 1995). Diferentes enzimas atuam em conjunto para promover a hidrólise enzimática do amido (PANDEY et al., 2006). Com base no seu mecanismo de ação, as amilases podem ser divididas em duas categorias: as endoamilases e as exoamilases. As endoamilases hidrolisam as ligações glicosídicas ao acaso no interior da molécula de amido liberando oligossacarídeos e as exoamilases hidrolisam, sucessivamente, as ligações glicosídicas a partir da extremidade não redutora da molécula, liberando glicose ou maltose (GUZMÁN-MALDONADO; PAREDES-LOPEZ, 1995).

As  $\alpha$ -amilases são endoamilases, que atuam aleatoriamente no interior da molécula de amido e hidrolisando as ligações  $\alpha$ -1,4 liberando maltooligosacarídeos de diversos tamanhos (dextrinas) (NAJAFI et al., 2005;).

As  $\beta$ -amilases são exoamilases que hidrolisam a penúltima ligação  $\alpha$ -1,4 a partir de extremidade não-redutora da molécula (amilose, amilopectina e glicogênio) liberando maltose (VIHINEN; MANTSALA, 1989).

As glucoamilases são exoamilases que catalisam a quebra das ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 a partir de uma extremidade não redutora da molécula de amido, liberando D-glucose na configuração  $\beta$  (VIHINEN; MANTSALA, 1989).

As  $\alpha$ -D-glucosidases ou maltases são exoamilases que hidrolisam ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 de sacarídeos curtos liberando  $\alpha$ -D-glucose a partir da extremidade não redutora (VIHINEN; MANTSALA, 1989).

As pululanases são endoamilases desramificantes que quebram as ligações  $\alpha$ -1,6 do pululano, um polissacarídeo linear que consiste de maltotrioses unidas por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,6 e que não pode ser degradado por  $\alpha$ - ou  $\beta$ -amilase, liberando maltotrioses (VIHINEN; MANTSALA, 1989).

As isoamilases são endoamilases desramificantes que hidrolisam as ligações  $\alpha$ -1,6 de amilopectina, glicogênio e oligossacarídeos, mas não hidrolisam a ligação  $\alpha$ -1,6 do pululano (VIHINEN; MANTSALA, 1989).

Ciclomaltodextrina Glucanotransferase são exoamilases que hidrolisam o amido, amilose e outros polissacarídeos formando oligossacarídeos cíclicos não redutores, conhecidos como ciclodextrinas (VIHINEN; MANTSALA, 1989).

## Enzimas quitinolíticas

A quitina é um componente estrutural, encontrada associada a outros polissacarídeos e proteínas, sendo o principal componente do exoesqueleto de insetos, parede celular de alguns fungos e carapaças de crustáceos, como lagostas e camarões (THARANATHAN; KITTER, 2003). A quitina apresenta uma estrutura linear composta por monômeros de N-acetil-D-glucosamina, unidos por meio de ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4, que podem estar organizadas em microfibrilas de configuração antiparalelas ( $\alpha$ -quitina), paralelas ( $\beta$ -quitina) ou mista ( $\gamma$ -quitina) (DAHYA et al., 2006).

As quitinases são enzimas que catalisam a hidrólise das ligações  $\beta$ -1,4 do polímero de N-acetil-D-glucosamina da quitina (FLEURI; SATO, 2005). São amplamente distribuídas na natureza e são encontradas em uma grande variedade de organismos (ARAKANE; MUTHUKRISHNAN, 2010). Nos fungos, as quitinases

estão relacionadas com a autólise, a nutrição, a morfogênese e a defesa (PATIL et al., 2000).

A hidrólise enzimática completa da quitina é feita por um sistema quitinolítico, cuja ação ocorre de forma sinérgica (PATIL et al., 2000). As enzimas quitinolíticas podem ser classificadas em duas categorias principais: Endoquitinases, que clivam aleatoriamente pontos internos do polímero liberando oligômeros de N-acetil-D-glucosamina, como a quitotetraose, a quitotriose e a diacetilquitobiose; Exoquitinases que podem ser divididas em quitobiosidases, que atuam na extremidade não redutora da quitina, liberando unidades de diacetilquitobiose e em  $\beta$ -N-acetilglicosaminidases, que clivam oligômeros produzidos pela atividade de endoquitinases liberando monômeros de N-acetil-D-glucosamina (DAHIYA et al., 2006).

## OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

(1) Identificar os transcritos relacionados aos complexos enzimáticos celulolítico, hemicelulolítico, pectinolítico e amilolítico dos fungos mutualista isolados e dos diferentes jardins de fungo;

(2) Avaliar os transcritos nos diferentes jardins de fungo e fungos isolados, com o intuito de identificar as enzimas envolvidas com o fluxo de carbono nos ninhos e possivelmente aquelas dando suporte à herbivoria, que é a habilidade básica das cortadeiras pragas;

(3) Prospectar transcritos com potencial biotecnológico na geração e açúcares simples a partir da matéria vegetal;

(4) Compreender como ocorreu a evolução metabólica nos jardins dos três grupos atíneos, desde as formigas menos derivadas *Apterostigma* sp. e *Mycocepurus goeldii* até as mais derivadas *Acromyrmex subterraneus* e *Atta sexdens*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Extração do RNA total de ninhos de formigas *Attina*

Para o desenvolvimento do presente estudo foram utilizados ninhos de:

*Acromyrmex subterraneus* (material cedido pela Profa. Dra. Terezinha Maria Castro Della Lucia - Departamento de Biologia Animal - UFV - Viçosa/MG/Brasil). Os ninhos (Fig. 1) foram mantidos no insetário da Universidade Federal de Viçosa de acordo com protocolo proposto por Della Lucia et al. (1993). As colônias foram alimentadas diariamente com folhas de *Acalypha* sp. e *Ligustrum* sp. Elas foram mantidas em salas com temperaturas de 25±2,5° C, umidade relativa de 70 a 80% e fotoperíodo de 10 horas de luz.

*Apterostigma* sp. (material cedido pelo Prof. Dr. André Rodrigues Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Instituto de Biociências - UNESP - Rio Claro/SP/Brasil). Para a extração de RNA total, pedaços dos jardins foram coletados e limpos por meio de remoção de larvas, pupas, operárias e soldados. Com o objetivo de amostrar todos os setores do jardim de fungo, foram utilizados em torno de 5 pedaços do jardim de fungo, coletados aleatoriamente, totalizando de 60 a 100 mg. Para a obtenção do RNA total de cada ninho foi utilizado o *kit Power Plant RNA Isolation (Mobio)* de acordo com as instruções do fabricante.

### Isolamento e extração do RNA total de fungos de formigas *Attina*

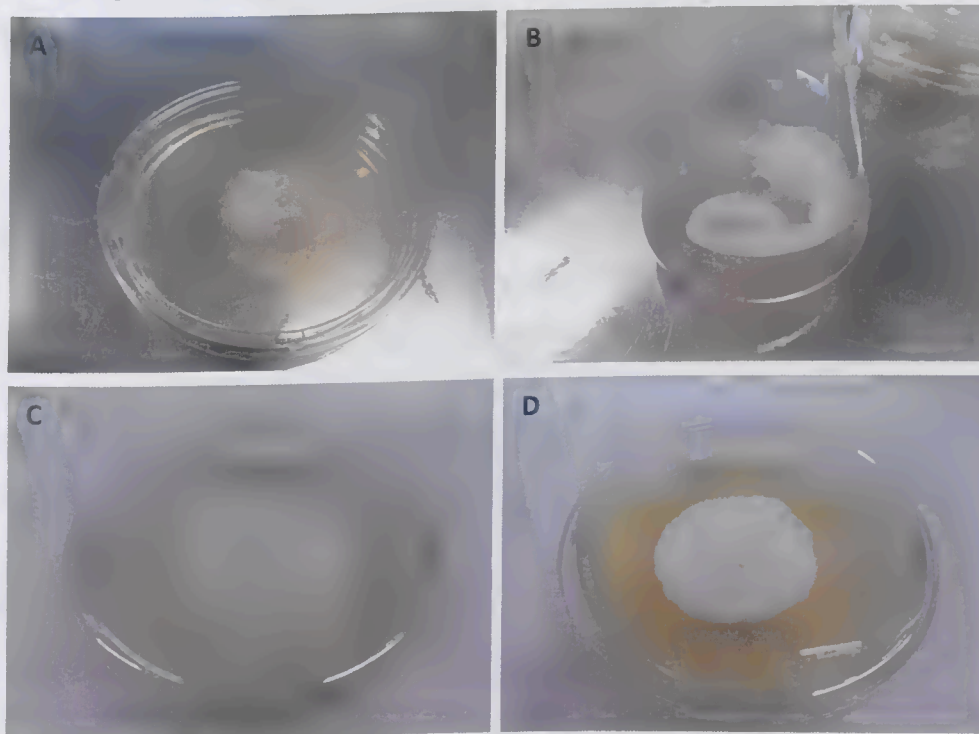
Os fungos isolados dos ninhos de *Mycocephalus goeldii* e *Atta sexdens* (materiais cedidos pelo Prof. Dr. Fernando Pagnocca – Centro de Estudos de Insetos Sociais – CEIS – UNESP – Rio Claro/SP/Brasil) foram usados para a extração. Para isso os fungos foram repicados para os meios sólidos (PAGNOCCA et al., 1990) com antibiótico cloranfenicol a 0,026% (p/v), as placas foram incubadas em estufa a 25°C por 30 dias (Figura 8a, 8c e 8d). Após esse período de crescimento, pequenos discos do meio sólido, de aproximadamente 6 mm de diâmetro, contendo o fungo, foram assepticamente transferidos para o meio líquido contendo, *Yeast Nitrogen Base* (YNB, Difco cód. 291940), tampão citrato-fosfato (pH 5.0) e amido (Sigma cód. S 9765) como única fonte de carbono (Figura 8b), de modo a induzir a produção de polissacaridases, de acordo com SILVA et al. (2006). Após

30 dias de crescimento a 25 °C, os micélios foram filtrados (0,22 µm Stericup, Millipore) e macerados com nitrogênio líquido em almofariz de porcelana. A extração do RNA total foi realizada utilizando o kit *RNeasy Plant Mini Kit* (QIAGEN), usando 100 mg do macerado, seguindo as instruções do fabricante.

A verificação de pureza foi feita por meio de análise da integridade das porções 28S e 18S do RNA ribossomal, que foi avaliada em gel de agarose 1%, corado com *GelRed* (Biotium), e a quantificação de RNA total foi feita com o aparelho *NanoDrop 2000* (Thermo Fisher Scientific).

As amostras que apresentaram DNA genômico foram tratadas com *DNase I, RNase-free* (Thermo Fisher Scientific), de acordo com as recomendações do fabricante. Para eliminação do DNA genômico das amostras, 1 µg de RNA total foi incubado com 1 unidade de *DNase I RNase-free* (Thermo Fisher Scientific), 1 µL de tampão 10X com MgCl<sub>2</sub> (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 25 mM MgCl<sub>2</sub> e 1 mM CaCl<sub>2</sub>) e água DEPC, em uma reação de 10 µL. As amostras foram incubadas a 37 °C por 30 min a seguir, para inativação da DNase I, a 65 °C por 10 min.

**Figura 8.** Fungos mutualistas isolados.



A) fungo isolado do ninho de *Mycocephalus goeldii* em meio sólido na primeira semana de crescimento; B) fungo isolado dos ninhos de *Mycocephalus goeldii* em meio líquido após 30 dias de crescimento; C) fungo isolado do ninho de *Mycocephalus goeldii* em meio sólido na terceira semana de crescimento; D) *L. gongylophorus* isolado em meio sólido na terceira semana de crescimento. Foto de Sérgio Kakazu (Agosto, 2014).

### **Análise de qualidade do RNA**

Uma segunda verificação foi feita antes de se construir a biblioteca, pela empresa Macrogen Inc. (Seul, Coreia). A quantidade de RNA em cada amostra foi avaliada de acordo com o Protocolo de Quantificação *qPCR* da *Illumina*, enquanto a qualidade do RNA foi verificada por meio de eletroforese em *chip*, utilizando o equipamento *BioAnalyzer RNA nanochip* (*Agilent*) com Número de Integridade do RNA (RIN). Foram consideradas aptas as preparações de RNA total com valor de RIN > 7 e quantidade total > 3 µg.

Para cada amostra, foram feitas duas réplicas, que foram enviadas para a Macrogen Inc. (Seul, Coreia).

## Construção e sequenciamento de bibliotecas transcriptômicas e metatranscriptômicas

Para a construção das bibliotecas transcriptômicas foi utilizado o kit *TruSeq RNA* (Illumina Part # 15026495 Rev. D) e para a construção das bibliotecas metatranscriptômicas foi utilizado o kit *TruSeq Stranded Total RNA Sample Preparation Guide* (Illumina Part # 15031048 Rev. E). As réplicas avaliadas com os melhores resultados foram sequenciadas, resultando um sequenciamento para cada material biológico analisado. As amostras foram sequenciadas em ambos os sentidos (2x100 pb), utilizando a plataforma Illumina HiSeq 2000 pela empresa Macrogen como serviço terceirizado.

### Pré-processamento das sequências

A qualidade dos *reads* gerados foi avaliada com o programa FASTQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Essa ferramenta realiza um controle de qualidade dos *reads* por meio de análises estatísticas e apresenta resultados como qualidade das sequências por base, conteúdo de N por bases e presença de sequências super-representadas (indicam presença de adaptadores ou *primers* ou sequência biologicamente significativa), sendo estas análises importantes para avaliar a qualidade dos *reads* e decidir quais os filtros que serão utilizados no pré-processamento.

Os *reads* com alta qualidade de cada um dos transcriptomas e metatranscriptomas foram montados *de novo* com o programa de montagem de *reads* curtos Trinity (GRABHERR et al., 2011). É importante lembrar que a grande cobertura em dados de RNA é essencial para análises de expressão gênica. No entanto, para realizar a montagem *de novo*, uma grande quantidade de *reads* pode também significar uma maior quantidade de erros e necessidade de alto poder computacional (BROWN et al., 2012). Para minimizar esses riscos, o processo de normalização digital reduz a quantidade de *reads* redundantes nos dados o que consequentemente reduz os erros de sequenciamento e otimiza a montagem dos transcritos (TULIN et al., 2013). Foi utilizado o protocolo de normalização digital de Brown e colaboradores (2012), que está incorporado ao programa Trinity, mantendo uma cobertura mínima de 20 vezes para cada trecho de sequência.

Todas as análises foram feitas em um servidor de alto desempenho com 98 GB de memória e 8 TB de HD, com sistema operacional Linux distribuição Debian 6.0.6, que temos no Laboratório de Evolução Molecular (LEM).

### **Análise da qualidade da montagem do transcriptoma**

Quando se trabalha com transcriptomas ou genomas que não possuem referências, sempre temos a dúvida se a montagem *de novo* que realizamos está boa o suficiente para termos genes completos e o quanto do que montamos refere-se a genes completos, fragmentados ou quais são os genes não amostrados. Para verificar isso foi usada a ferramenta BUSCO (SIMÃO et al., 2015), que fornece uma medida quantitativa de quão completo está a montagem de um transcriptoma, baseado em bases de dados de genes contendo ortólogos de cópia única universais (OrthoDB) para determinados grupos taxonômicos. As análises foram feitas usando a base de dados de fungos do OrthoDB versão 9.

### **Agrupamento das sequências**

Para realizar o agrupamento das sequências visando reduzir a quantidade de sequências redundantes (isoformas) geradas na montagem pelo programa Trinity, foi usado o programa CD-HIT-EST, disponível no pacote de programas do CD-HIT (FU et al., 2012), utilizando um percentual de identidade entre as seqüências de 90%.

### **Obtenção de sequências proteicas e codificadoras de proteínas (CDS)**

Para obter as sequências proteicas e codificadoras de proteínas, foi utilizado o programa *ORFPredictor* (MIN et al., 2005), que realiza uma tradução em todas as fases de leitura para todos *contigs* em análise, usando o código genético especificado.

## Categorização de enzimas ativas sobre carboidratos (CAZy)

O *software dbCAN* (YIN et al., 2012) foi utilizado para identificar as glicosil hidrolases, polissacarídeo liases, glicosil transferases e carboidrato esterases expressas pelos diferentes materiais analisados. Essas quatro classes principais de enzimas unem, modificam e desagregam oligo e polissacarídeos (LOMBARD et al., 2013). A identificação ocorreu através de comparação das sequências dos transcritos com a base de dados CAZy (*Carbohydrate-active Enzymes database-CAZy*) (<http://www.cazy.org/>). Esta base contém as sequências de aminoácidos representativas dos domínios proteicos envolvidos com a degradação de carboidratos.

Para tanto, as sequências proteicas, no formato FASTA, geradas pelo programa *ORFPredictor* (MIN et al., 2005), foram usadas. O *software dbCAN* (YIN et al., 2012) utilizou os seguintes critérios: *e-value* menor que  $1e-5$  para alinhamentos maiores que 80 aminoácidos e *e-value* menor que  $1e-3$  para alinhamentos com menos de 80 aminoácidos.

## Busca de genes ortólogos entre espécies

As sequências das bibliotecas analisadas codificadoras de proteínas (CDS) que apresentaram domínios associados à degradação de carboidratos foram usadas para identificar pares de ortólogos entre as bibliotecas analisadas, utilizando o programa OrthoVenn (WANG et al., 2015). Essa plataforma compara grupos de genes ortólogos entre múltiplas bibliotecas, usando uma heurística popular chamada OrthoMCL, que realiza um alinhamento BLASTP todos-contra-todos, identificando os relacionamentos de ortólogos e parálogos com o algoritmo *Inparanoid* (REMM et al., 2001) e gerando grupos de proteínas estritamente relacionadas com o Algoritmo de Agrupamento de Markov (MCL).

## Identificação molecular *in silico* dos fungos mutualistas

Com o objetivo de confirmar a identidade dos fungos presentes tanto nas amostras de isolados como nos ninhos, foi usado o programa de alinhamento local *blastn* do pacote BLAST (ALTSCHUL et al., 1997). Para isso foram selecionadas

sequências de RNAs ribossomais de fungos mutualistas de espécies *Attina* disponíveis na base de dados pública do GenBank/NCBI. O banco de dados criado foi alinhado contra todas as sequências dos transcriptomas e metatranscriptomas obtidos após a montagem com Trinity.

### **Anotação funcional das enzimas CAZy**

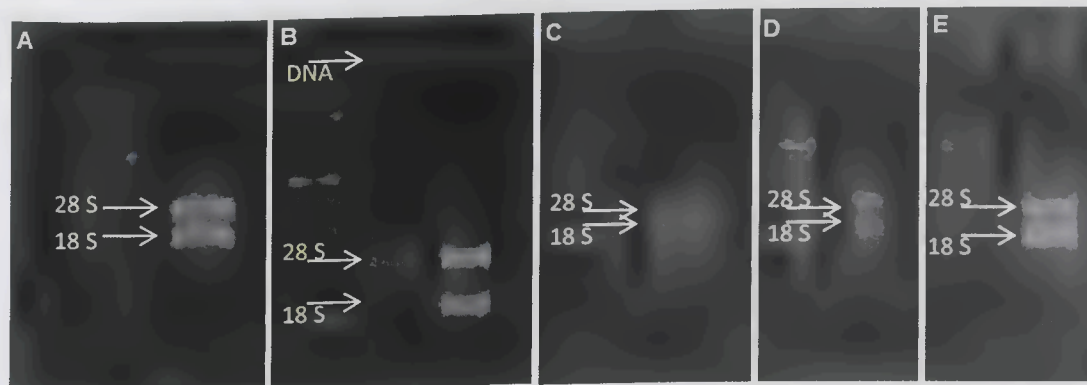
Esse trabalho envolveu a anotação funcional das enzimas CAZy das quatro bibliotecas e para realizar essa anotação foi usado o programa Blast2GO PRO (GÖTZ et al., 2008). Essa ferramenta realiza alinhamento com Blast usando a base de dados do NCBI não redundante (NR), sendo que para essa busca usamos um valor de e-value mínimo de  $1e-03$ . Além disso, realiza busca de domínios de proteínas em todas as bases do InterPro, busca de termos de ontologia gênica (GO) e atribuição de número enzimático (EC number), sendo possível verificar quais sequências correspondem a enzimas e de quais vias metabólicas participam.

As enzimas CAZy foram anotadas, visando identificar as enzimas responsáveis pela degradação do amido, celulose, hemicelulose e pectina.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

As extrações do RNA total dos fungos e dos jardins de fungos renderam RNA de boa qualidade e com integridade dos rRNAs 18S e 28S (Figura 9).

**Figura 9.** Géis de agarose evidenciando a integridade das amostras de RNA total.



A) *Leucoagaricus gongylophorus*; B) fungos isolados dos ninhos de *Mycocephurus goeldii*, C) fungo isolado do ninho de *Mycocephurus goeldii*, após tratamento com *DNase I*, *RNase-free* (Thermo Fisher Scientific); D) ninho de *Acromyrmex subterraneus* e E) ninho de *Apterostigma* sp. As bandas de RNAr (28S e 18S) estão destacadas pelas setas.

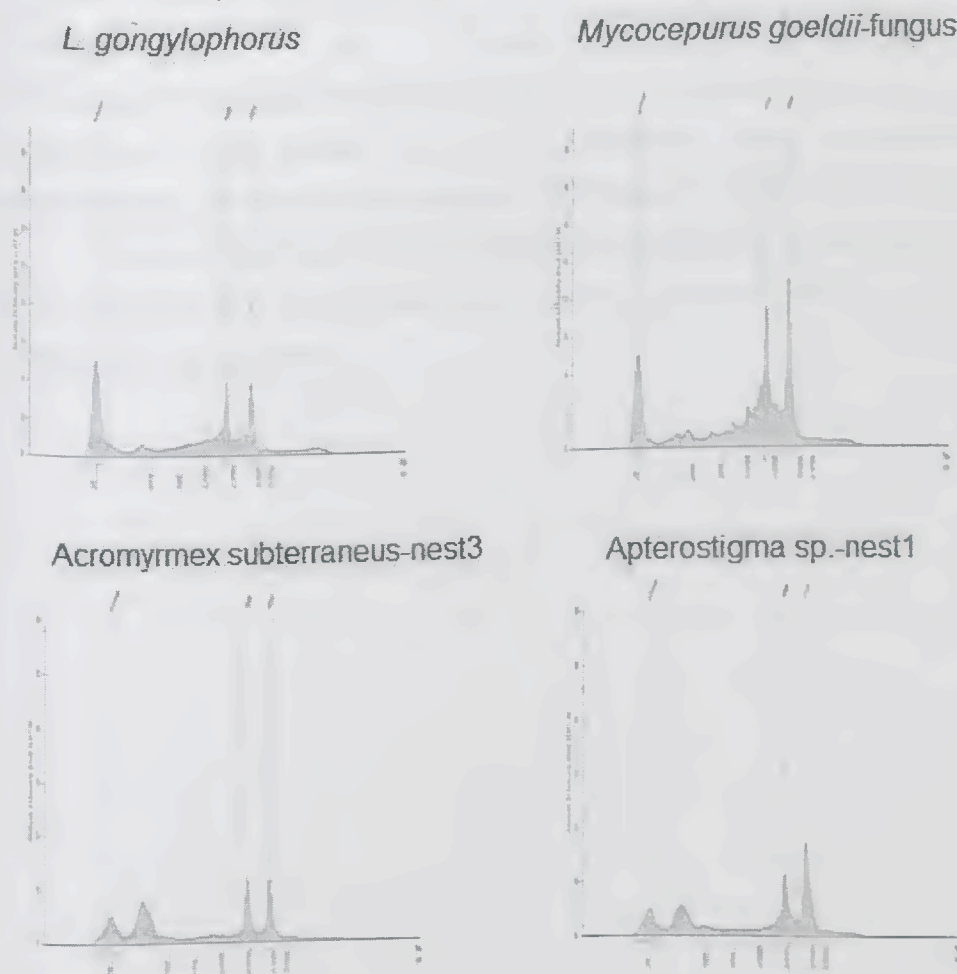
### Análise de qualidade do RNA

O resultado do controle de qualidade utilizando o equipamento 2100 *BioAnalyzer* (Agilent) demonstrou valores de integridade (RIN) superiores a 7 e quantidades de RNA total acima de 3  $\mu\text{g}$  (Tabela 1), indicando que as amostras estavam viáveis para o sequenciamento. Os eletroferogramas produzidos no aparelho *BioAnalyzer* (Agilent) demonstraram picos bem definidos, correspondentes aos RNAr 18S e 28S, evidenciando a integridade de todas as amostras (Figura 10).

**Tabela 1.** Análise da qualidade e pureza do RNA total.

Amostra	Conc. (ng/ $\mu\text{l}$ )	Volume ( $\mu\text{l}$ )	Quantidade total ( $\mu\text{g}$ )	RIN
<i>Acromyrmex subterraneus</i> -nest3	127,949	24	3,071	8,3
<i>Apterostigma</i> sp.-nest1	197,134	24	4,731	7,6
<i>L. gongylophorus</i>	808,329	24	19,400	7,4
<i>Mycocephurus goeldii</i> -fungus	166,555	24	3,997	7,2

**Figura 10.** Eletroferogramas representando a qualidade do RNA total das amostras estudadas no aparelho Bioanalyzer 2100 (Agilent).



### Sequenciamento de transcriptomas

Foram construídas bibliotecas e sequenciados os transcriptomas de *Leucoagaricus gongylophorus* e do fungo isolado do ninho de *Mycocephurus goeldii* e metatranscriptomas dos ninhos de *Acromyrmex subterraneus* e *Apterostigma sp.*

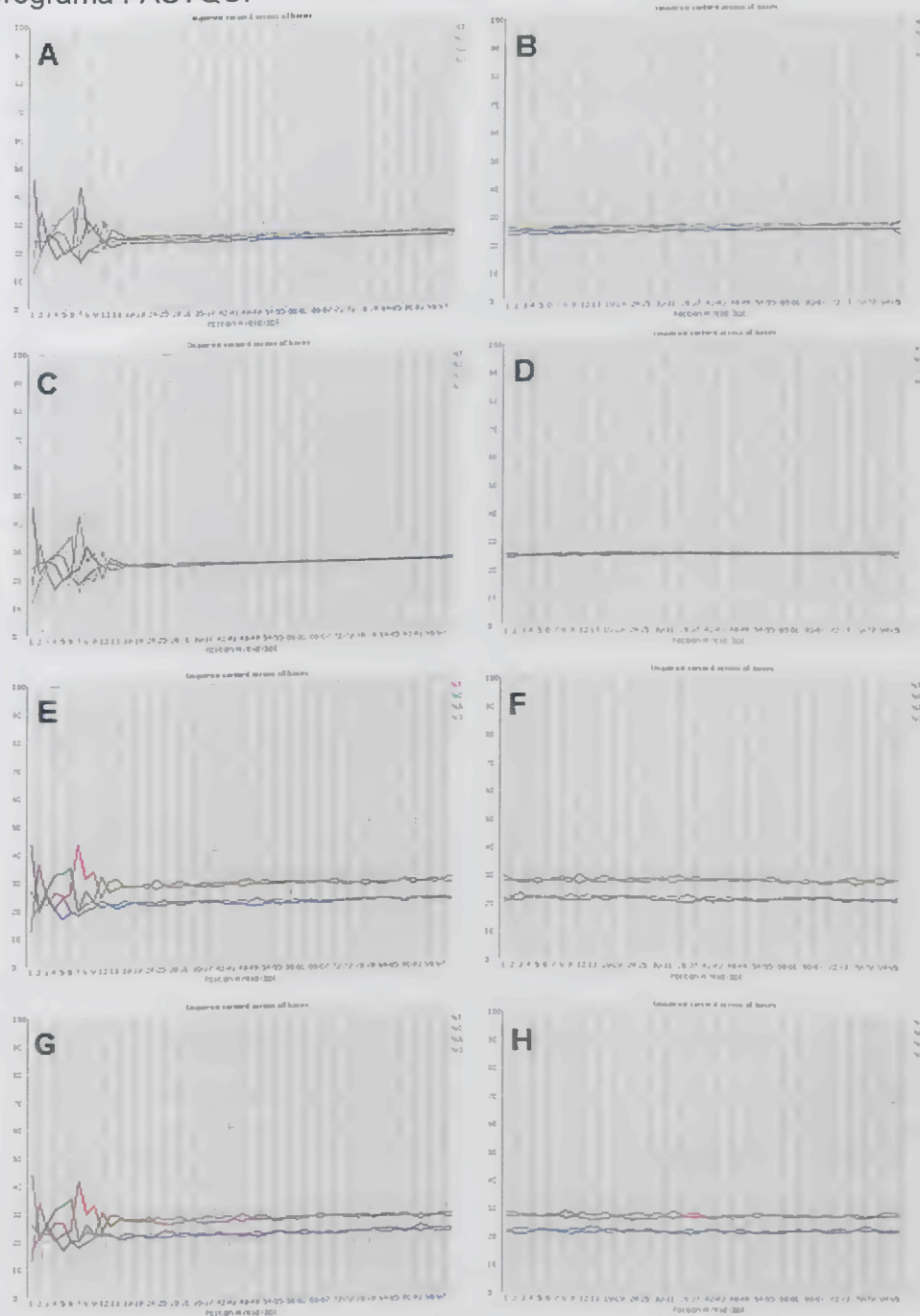
### Pré-processamento das sequências

Em geral foi observado que no início das *reads* havia um desvio no conteúdo GC, sendo que esse fenômeno é um problema conhecido que ocorre com os sequenciamentos na plataforma Illumina (HANSEN et al., 2010). Para resolver isso,

os primeiros nucleotídeos de todas as *reads* foram removidos usando o pacote FASTX Toolkit ([http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit/index.html](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/index.html)) (Figura 11). Posteriormente, foi usado o programa SeqyClean (<https://github.com/ibest/seqyclean>) que remove bases com valor de Phred < 30 e sequências com menos de 30 nucleotídeos. Esse procedimento reduz a probabilidade de erro para um a cada 1000 bases (EWING et al., 1998) (Figura 12).

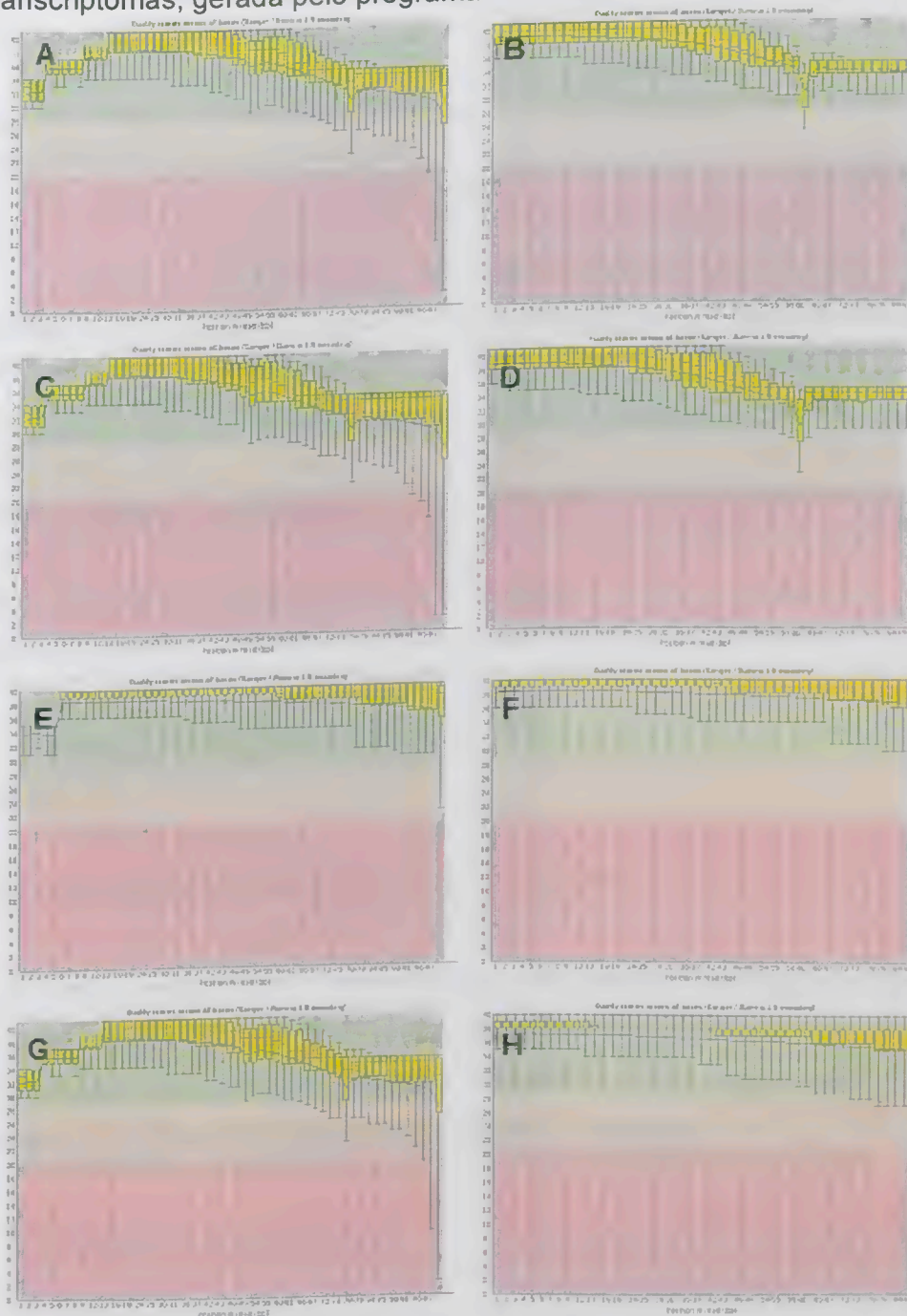
Os *reads* com alta qualidade foram submetidos à montagem *de novo*, feita com o programa p Trinity, para *reads* curtos (GRABHERR et al., 2011), e geraram *contigs* de boa qualidade.

**Figura 11.** Frequência de cada base ao longo da sequência nucleotídica, gerada pelo programa FASTQC.



À esquerda, análise de qualidade de cada base. À direita, análise mostrando frequência de cada base ao longo da leitura. A, C, E ou G: transcriptoma de *L. gongylophorus*, do fungo mutualista de *M. goeldii*, metatranscriptoma do jardim de fungo de *Acromyrmex subterraneus* ou de *Apterostigma* sp., respectivamente, antes do pré-processamento. B, D, F e H, mesmos materiais após o pré-processamento. A correção do desvio de conteúdo GC pode ser observada pela perda dos picos iniciais antes do pré-processamento.

Figura 12. Análise de qualidade de cada base dos transcriptomas e metatranscriptomas, gerada pelo programa FASTQC.



A, C, E e G: transcriptomas de *L. gongylophorus*, do fungo mutualista de *M. goeldii*, metatranscriptomas de *Acromyrmex subterraneus* e *Apterostigma* sp., respectivamente antes do pré-processamento. B, D, F e H: mesmos materiais, após o pré-processamento. A linha vermelha central indica o valor da médiana, a barra amarela representa o intervalo interquartil (25-75%), a linha azul representa a qualidade média. O eixo y mostra os escores de qualidade (Phred), muito boa, acima de 28 (verde), razoável, entre 20 e 28 (laranja) e má qualidade, abaixo de 20

(vermelho). A melhoria na qualidade de cada base após o pré-processamento pode ser evidenciada pelo aumento do valor médio de Phred e diminuição do desvio padrão em praticamente todas as bases.

**Tabela 2.** Dados dos transcriptomas e metatranscriptomas obtidos após sequenciamento e pré-processamento.

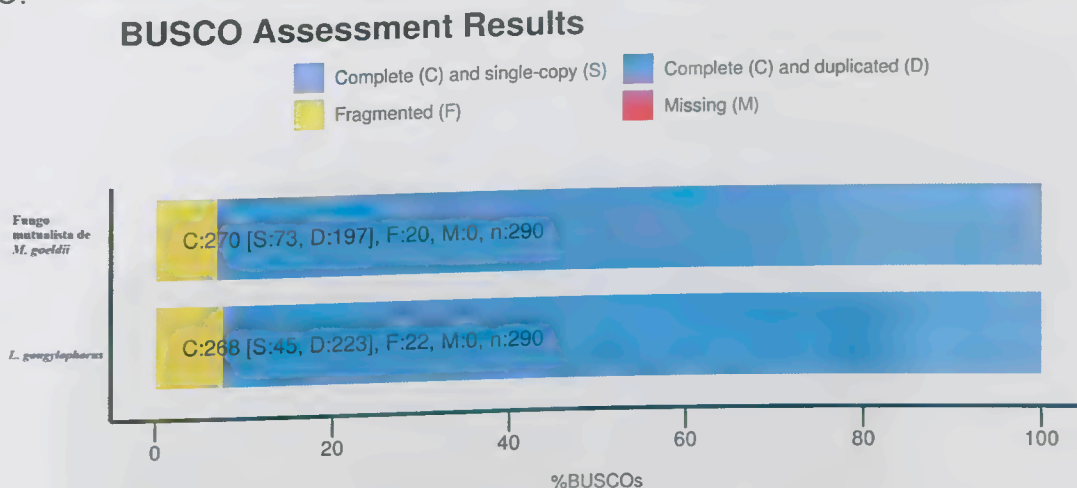
	Fungo isolado		Jardim de fungo	
	<i>Leucoagaricus gongyloporus</i>	Fungo de <i>Mycocetpurus goeldii</i>	<i>Acromyrmex subterraneus</i>	<i>Apterostigma</i> sp.
Bases (bp)	16.661.050.092	15.682.369.384	11.408.279.866	12.518.232.900
Reads	164.960.892	155.270.984	112.953.266	123.942.900
Q30(%)	89,28	88,35	94,34	90,74
Contigs Trinity	56.725	90.451	151.960	230.023
Tamanho médio dos contigs	2062,89	1653,88	1400,18	7229,42
Conteúdo GC (%)	46,87	48,95	44,68	46,94
Contigs ≥ 300 pb	53.718	82.940	81.248	205.376

A tabela 2 mostra dados de cada biblioteca antes e depois da etapa de pré-processamento.

### Análise qualidade da montagem do transcriptoma

No transcriptoma de *L. gongyloporus*, do total de ortólogos de cópia única, 92,4% estavam completos, 7,6% eram fragmentados e nenhum dos ortólogos foi perdido. Para o transcriptoma do fungo mutualista de *M. goeldii*, 93,1% estavam completos, 6,9% eram fragmentados e nenhum foi perdido.

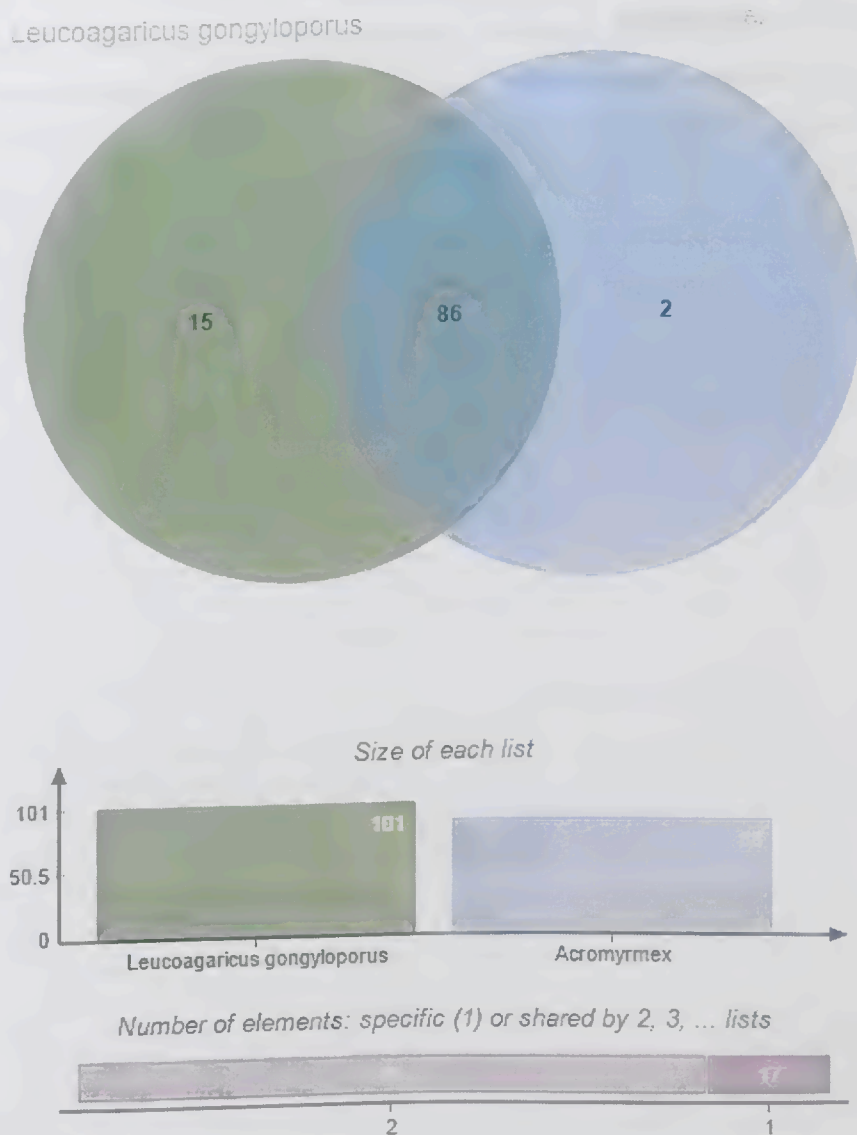
**Figura 13.** Porcentagem de ortólogos em categorias de qualidade de grupos BUSCO.



Gene completo (C), cópia única (S), completo duplicado (D), fragmentado (F) e não recuperado (M) para *L. gongyloporus* e para o fungo mutualista de *M. goeldii*. Um total de 209 de genes eucarióticos BUSCO foi usado.

Se analisarmos a figura acima, pode-se observar que há uma pequena quantidade de sequências fragmentadas, que representam parte de um gene, porque nem todas as sequências se montaram completamente. Podemos notar também que a maior parte dos genes está completa, no entanto completos e duplicados, o que se explica pela grande quantidade de isoformas geradas pelo *Trinity* na etapa de montagem de transcritos. A Figura 13 mostra a alta qualidade da montagem, pois a grande maioria dos genes está completa em relação à base de dados de fungos disponível no *OrthoDB*.

**Figura 14.** Diagrama de Venn representando os agrupamentos de genes ortólogos contendo domínios CAZy e identificados no fungo *L. gongylophorus* isolado e no jardim de *Acromyrmex subterraneus*.



A análise de genes ortólogos foi realizada para comparar as sequências contendo domínios CAZy entre o fungo isolado *L. gongylophorus* e o jardins de *Acromyrmex subterraneus*. No total, 229 sequências foram agrupadas em 101 grupos ortólogos para o fungo isolado *L. gongylophorus*. No jardim de *Acromyrmex subterraneus*, 166 sequências foram agrupadas em 88 grupos ortólogos (Figura 14). Desse total, 86 grupos foram compartilhados entre esses dois materiais. *L.*

*gongylophorus* apresentou o maior número de grupos exclusivos (15), entre os quais estão glicosil hidrolases das famílias 2, 5, 16, 18, 27 ( $\alpha$ -1,4-galactosidase), 23 ( $\beta$ -1,4-glicosidase), glicosil transferases das famílias 2, 20, 33, 65, enzimas auxiliares das famílias 3, 4, 7 e um módulo de ligação ao carboidrato da família 13. Os jardins de *Acromyrmex subterraneus* apresentaram apenas dois grupos exclusivos, duas glicosil transferases das famílias 1 e 2. Esse resultado mostra que o fungo *L. gongylophorus* isolado expressou uma variedade maior de enzimas CAZy quando comparado com o *L. gongylophorus* nos jardins de *Acromyrmex subterraneus*. Além disso, tal resultado sugere que o fungo *L. gongylophorus* é o principal responsável pela produção de enzimas CAZy no jardim de *A. subterraneus*.

## Identificação molecular *in silico* dos fungos mutualistas

Tabela 3. Resultados dos melhores hits do BlastN após alinhamento de sequências de fungos mutualistas de espécies de Attina do GenBank contra os materiais analisados (transcriptomas e metatranscriptomas).

Material Analisado	Código da		Identificação Molecular	Número de acesso	Região	Score (Bits)	E-value	Identidade (%)	Gap (%)
	séqüencia	1							
<i>L. gongylophorus</i>	TR1586 c0_g1_i2	1	<i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	KY234303	ITS	1249	0	99	0
Fungo mutualista de <i>M. goeldii</i>	TR11871 c3_g1_i2	1	<i>Mycocyclus goeldii</i> symbiont	KF033129	ITS parcial	1074	0	99	0
Jardim de <i>A. subterraneus</i>	TR26286 c0_g1_i1	1	<i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	AF076380	18S	2968	0	98	0
Jardim de <i>Apterosstigma</i> sp.	comp379787_c0_seq	1	<i>Apterosstigma collare</i> symbiont	U11905	28S	1683	0	99	0
Jardim de <i>Apterosstigma</i> sp.	comp379787_c0_seq	1	<i>Apterosstigma dentigerum</i>	AY367625	25S parcial	1600	0	99	0
Jardim de <i>Apterosstigma</i> sp.	comp379787_c0_seq	1	<i>Apterosstigma pilosum</i> symbiont	AY367623	25S parcial	1600	0	99	0
Jardim de <i>Apterosstigma</i> sp.	comp379787_c0_seq	1	<i>Apterosstigma dorotheae</i>	AY367616	25S parcial	1605	0	99	0
Jardim de <i>Apterosstigma</i> sp.	comp379787_c0_seq	1	<i>Apterosstigma urichii</i> symbiont	AY367615	25S parcial	1600	0	99	0
Jardim de <i>Apterosstigma</i> sp.	comp373410_c0_seq	1	<i>Apterosstigma collare</i> symbiont	U09535	18S	3288	0	99	0

A Tabela 3 apresenta os resultados dos melhores *hits* obtidos após a comparação das sequências dos transcriptomas e metatranscriptomas com RNAs ribossomais de fungos mutualistas de espécies de attina disponíveis na base de dados pública do GenBank/NCBI.

Todas as sequências alinhadas apresentaram identidade variando de 98% a 99% e *e-value* de 0,0 e os valores de score variaram de 1042 a 3288 bits. Entre os resultados obtidos podemos considerar os melhores os apresentados pelos fungos isolados, *L. gongylophorus* e o fungo mutualista de *M. goeldii* que tiveram as suas identidades confirmadas pelo alinhamento com a região ITS (*Internal transcribed spacer*), um marcador amplamente usado na identificação de fungos e que apresenta um grande número de sequências disponíveis em banco de dados (ANDERSON et al., 2003). A sequência TR26286|c0\_g1\_i1, dos jardins de *A. subterraneus*, alinhou com a região 18S de *L. gongylophorus* presente no GenBank, embora a região 18S seja amplamente usada para a identificação de bactérias (LOUWS et al., 1999). Esse resultado sugere que o fungo predominante do jardim de *A. subterraneus* seja o *L. gongylophorus*. Embora os alinhamentos das sequências do jardim de *Apterostigma* sp. não tenham permitido a identificação do fungo mutualista, há um forte indício de que o fungo pertença ao tipo de agricultura do tipo “coral”, uma vez que os melhores *hits* obtidos para esse material são todos representantes desse tipo de agricultura.

Após o processo de agrupamento, foram obtidos 26.531 e 41.295 *contigs* para *L. gongylophorus* e para o isolado *Mycocephurus goeldii*, respectivamente, e 39.383 e 59.225 para os jardins de *Acromyrmex subterraneus* e *Apterostigma* sp., respectivamente. Foram identificados 229, 345, 166 e 121 domínios CAZy para *L. gongylophorus*, o isolado *Mycocephurus goeldii*, jardins de *Acromyrmex subterraneus* e *Apterostigma* sp., respectivamente (Tabela 4).

**Tabela 4:** *Contigs*, número e porcentagem de ORFs de domínios CAZy nos diferentes materiais analisados.

Material Analisado	<i>Contigs</i>	Domínios CAZy	% CAZy
<i>L. gongylophorus</i>	26531	229	0,86
Fungo mutualista de <i>M. goeldii</i>	41295	345	0,84
Jardim de <i>A. subterraneus</i>	39383	166	0,42
Jardim de <i>Apterostigma</i> sp.	59225	121	0,20

A porcentagem de *contigs* codificando para domínios CAZY praticamente dobrou em *L. gongylophorus* cultivado em amido quando comparada à encontrada no jardim de *A. subterraneus* (Tabela 4). Portanto, o potencial de metabolizar carboidratos é maior em *L. gongylophorus* em culturas isoladas do que crescendo nos jardins de fungo. Este maior potencial é representado por um aumento no número de enzimas em quase todas as famílias CAZY, notadamente o de enzimas auxiliares ao metabolismo de carboidratos, que são oxidorreduções; e glicosil hidrolases, que são enzimas que hidrolisam ligações glicosídicas; somente enzimas da família das glicosil transferases estavam em menor número no isolado cultivado em amido do que no jardim de fungo (Tabela 5). No entanto, a diversidade de famílias CAZY representadas permanece praticamente a mesma nessas duas condições. Portanto, o potencial biotecnológico de *L. gongylophorus* pode ser aumentado quando o fungo é isolado dos jardins e cultivado em laboratório. Estes resultados estão de acordo com os trabalhos de Silva et al., (2006), feitos com culturas isoladas de *L. gongylophorus*, que foram cultivadas em diferentes fontes de carbono, indicando o amido como um bom indutor de enzimas CAZY contra uma variedade de polissacarídeos constituintes da parede vegetal.

Comparando as culturas isoladas, o fungo mutualista de *M. goeldii* apresentou praticamente a mesma porcentagem de *contigs* codificando para enzimas CAZY, porém um número de *contigs* bem maior quando comparado com *L. gongylophorus* (Tabela 4). A maior quantidade de enzimas CAZY foi acompanhada por uma maior diversidade em quase todos os grupos destas enzimas, com exceção nas famílias dos polissacarídeos liases e dos módulos de ligação a carboidratos (Tabela 5). Nossos resultados estão de acordo com os resultados obtidos por Nygaard et al. (2016), que analisaram dados genômicos e transcritômicos de diferentes representantes da agricultura *Attina* e encontraram um repertório mais diversificado

de enzimas CAZy em representantes das formas de agriculturas basal, quando comparados com representantes da agricultura derivada. Nygaard et al. (2016) atribuíram esse resultado ao fato dos decompositores das formas mais basais de agriculturas *Attina* necessitarem de um repertório de enzimas mais versátil para a conversão da parede celular vegetal em alimento, uma vez que eles se utilizam de material vegetal morto, ao contrário dos representantes das formas mais derivadas de agriculturas *Attina* que utilizam como substrato um material mais fresco e, portanto, rico em material menos recalcitrante ao ataque enzimático.

Nos jardins de fungo, o número de *contigs* identificados foi menor em *A. subterraneus* do que em *Apterostigma* sp. (Tabela 4). No entanto, a quantidade e a porcentagem de *contigs* codificando para enzimas CAZy foram maiores no jardim de *A. subterraneus*. Estes jardins também apresentaram a maior diversidade enzimas em todos os grupos de enzimas CAZy (Tabela 5), quando comparados aos jardins de *Apterostigma* sp.

**Tabela 5:** Número de famílias e domínios CAZy nos diferentes materiais estudados.

Grupos CAZy	L. <i>gongylophorus</i>	Fungo mutualista de <i>M. goeldii</i>	Jardim de <i>A.</i> <i>subterraneus</i>	Jardim de <i>Apterostigma</i> sp.
Enzimas auxiliares	7 (26)	10 (63)	6 (13)	5 (13)
Módulos de ligação a carboidratos	9 (23)	9 (36)	12 (19)	10 (12)
Esterases de carboidratos	7 (35)	9 (57)	9 (27)	6 (14)
Glicosil hidrolases	39 (102)	49 (142)	33 (64)	32 (53)
Glicosil transferases	19 (33)	23 (39)	22 (36)	15 (24)
Polissacarídeo liases	6 (10)	5 (8)	5 (7)	4 (5)
<b>Total</b>	<b>87 (229)</b>	<b>105 (345)</b>	<b>87 (166)</b>	<b>72 (121)</b>

Total de famílias CAZy e total de domínios CAZy, entre parênteses, encontrados nos diferentes materiais estudados.

O maior número de enzimas CAZy, presente nos jardins de *A. subterraneus*, comparado ao de *Apterostigma* sp. (Tabela 5) não era esperado, com base nos dados genômicos de fungos mutualistas de formigas *Attina* (NYGAARD et al., 2016), que apontam para um menor número de enzimas CAZy nos fungos mutualistas das derivadas, quando comparado às basais. É importante enfatizar que os resultados encontrados por Nygaard et al. (2016) são baseados em sua grande parte em dados genômicos e o genoma representa o potencial total da célula e não a sua

capacidade de degradação real (MEDIE et al., 2012). A expressão de genes depende de diversos fatores, como temperatura, tipo de nutriente, o grau de maturação da célula, além de outros fatores (PROSDOCIMI, 2007). Lopez-Mondejar et al. (2016) estudaram uma nova cepa de bactérias *Paenibacillus* e observaram que somente cerca de 30% das celulases e hemicelulases preditos pelo sequenciamento do genoma dessa bactéria estavam sendo de fato expressas. Além disso, Nygaard et al. (2016) também encontraram uma menor quantidade de domínios CAZy no transcriptoma do fungo mutualista isolado da formiga *Cyphomyrmex costatus*, quando comparado ao genoma deste mesmo fungo. Tomados em conjunto, os dados de literatura sobre as *Attina* basais e nossos dados aqui apresentados indicam que, apesar dos representantes da agricultura basal apresentarem uma maior variedade de genes codificadores de enzimas CAZy, eles expressam uma quantidade menor dessas enzimas quando comparados com os representantes da agricultura das cortadeiras.

**Figura 15.** Distribuição dos *top-hits* encontrados em diferentes espécies no transcriptoma de *L. gongylophorus*

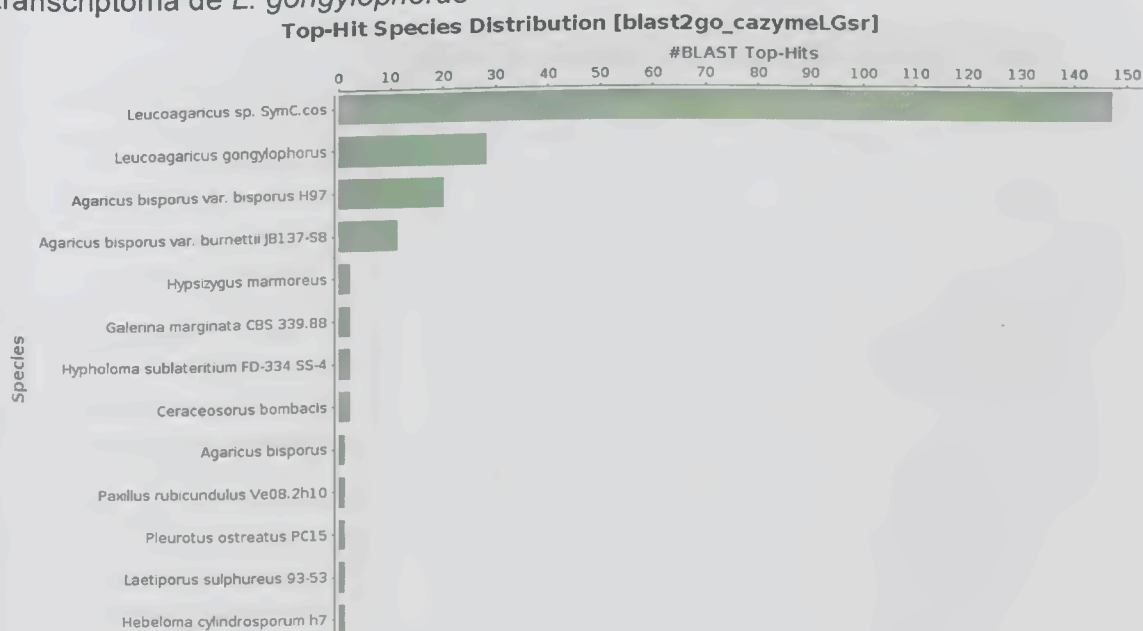


Figura 16. Distribuição dos *top-hits* encontrados em diferentes espécies biológicas no metatranscriptoma do jardim de *A. subterraneus*.

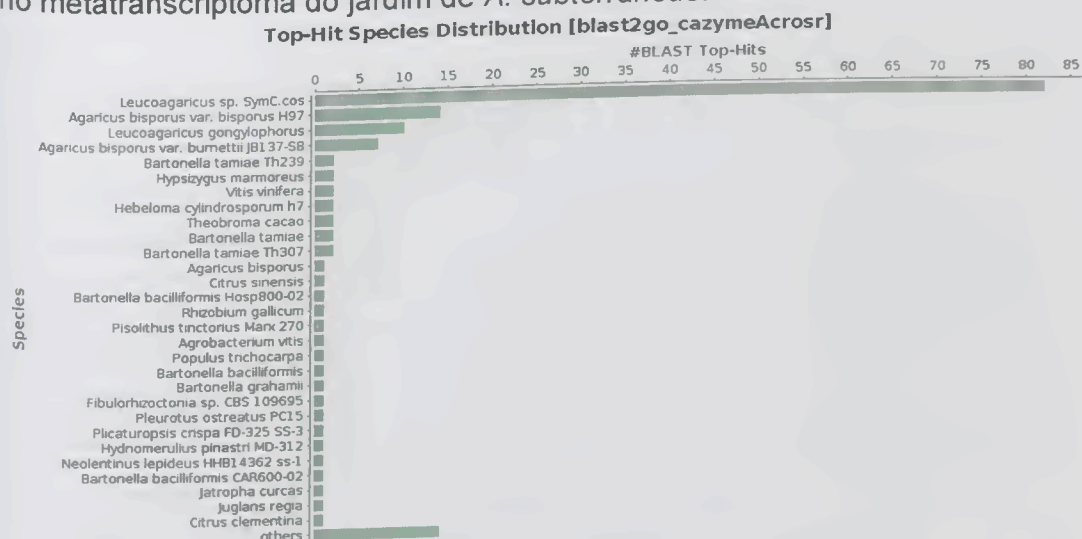


Figura 17. Distribuição dos *top-hits* encontrados em diferentes espécies biológicas no transcriptoma do fungo mutualista de *M. goeldii*.

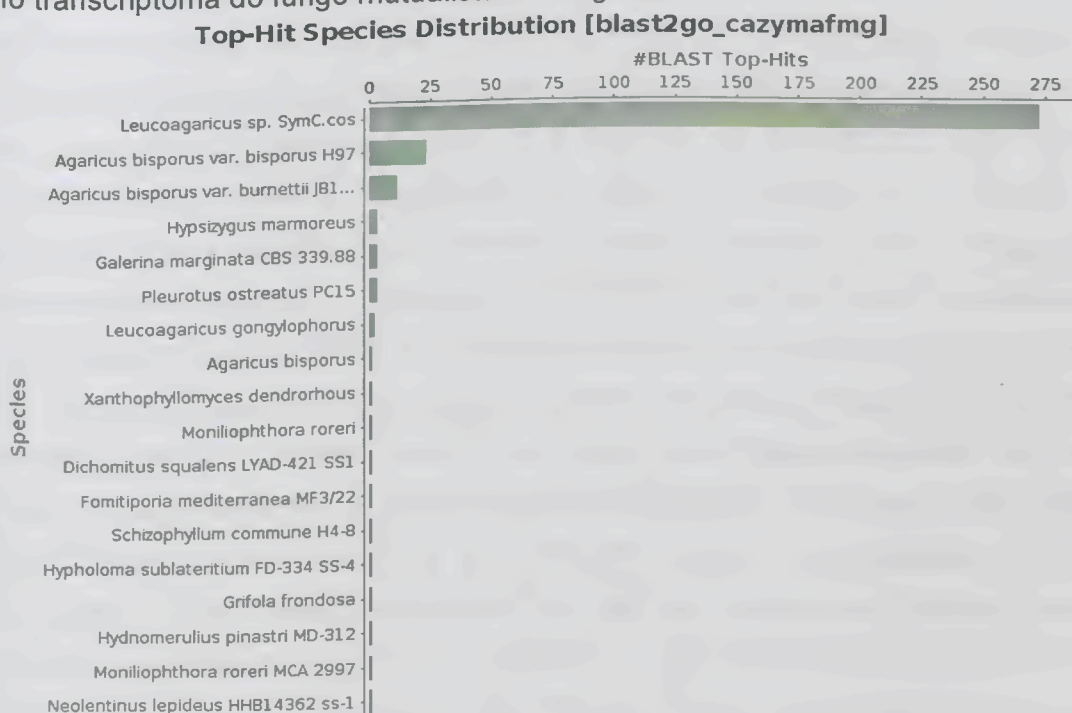
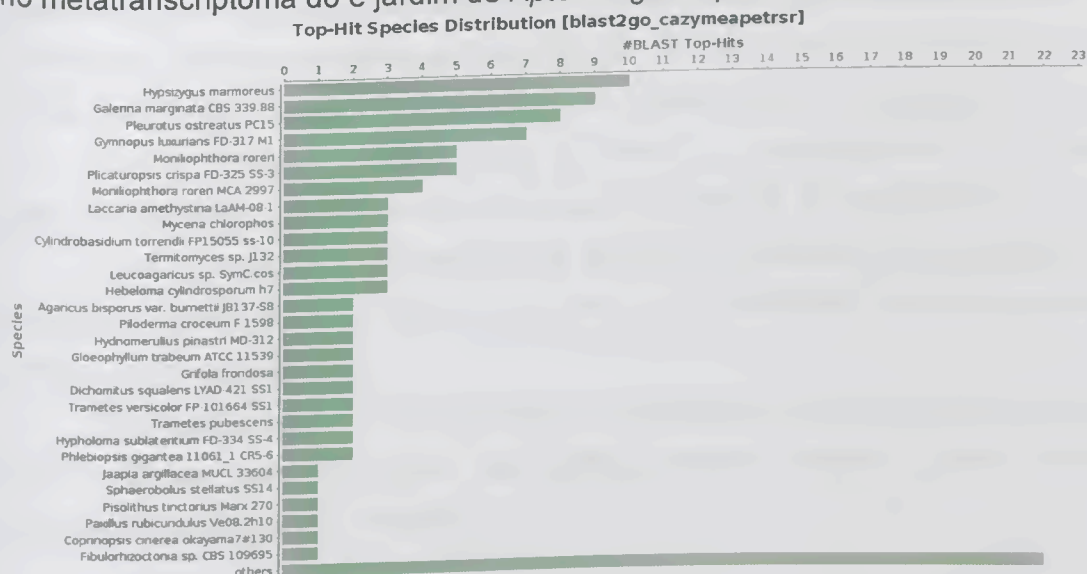


Figura 18. Distribuição dos *top-hits* encontrados em diferentes espécies biológicas no metatranscriptoma do e jardim de *Apterostigma* sp.



A distribuição de espécies entre as sequências de maior similaridade com o transcriptoma de *L. gongylophorus* mostrou que *Leucoagaricus* sp. foi a espécie que apresentou maior parte dos melhores *hits* obtidos, seguidos de *L. gongylophorus*, *Agaricus bisporus* var. *bisporus*, *Agaricus bisporus* var. *burnettii* (champignon) e *Hypsizygus marmoreus* (shimeji) (Figura 15). Para o metatranscriptoma do jardim de *A. subterraneus*, *Leucoagaricus* sp. foi a espécie que apresentou maior parte dos melhores *hits* obtidos, seguidos de *Agaricus bisporus* var. *bisporus*, *L. gongylophorus* e *Agaricus bisporus* var. *burnettii* e *Bartonella taniae* (Figura 16). O transcriptoma do fungo mutualista de *M. goeldii* apresentou como os melhores *hits* *Leucoagaricus* sp., seguidos de *Agaricus bisporus* var. *bisporus*, *Agaricus bisporus* var. *burnettii*, *Hypsizygus marmoreus* e *Galerina marginata* (Figura 17). No jardim de *Apterostigma* sp. a grande maioria das sequências não apresentaram *top-hits*, ou seja, não eram similares a qualquer sequência presente no banco nr do Genbank-NCBI, entre as espécies que apresentaram *blast-hits* *Hypsizygus marmoreus* apresentou maior parte dos melhores *hits* obtidos, seguido de *Galerina marginata*, *Pleurotus ostreatus*, *Gymnopus luxurians* e *Moniliophthora roreri* (Figura 18). Considerando as 10 espécies mais representativas nas listas do *top-hits*, *L. gongylophorus*, o jardim de *A. subterraneus* e o fungo mutualista de *M. goeldii* apresentaram resultados parecidos. Jardins de *A. subterraneus* e o fungo mutualista de *M. goeldii* compartilharam 5 e 7 espécies com *L. gongylophorus*,

respectivamente. O jardim de *Apterostigma* sp. apresentou o resultado mais diferente entre os materiais analisados, a grande maioria das sequências não foram similares a qualquer sequência presentes no banco nr do Genbank-NCBI e, além disso, este jardim compartilhou apenas duas espécies com *L. gongylophorus*.

Nosso resultado sugere que o fungo *L. gongylophorus* é o principal responsável pela degradação da biomassa em jardins de *A. subterraneus*.

Uma vez que muitas enzimas que degradam polissacarídeos vegetais são de interesse industrial, este tipo de enzima foi identificado entre aquelas que metabolizam carboidratos.

Para cada material estudado, foram identificados os transcritos que codificam para enzimas que degradam os polissacarídeos vegetais, amido, celulose, hemicelulose e pectina (Tabela 6).

#### **Anotação funcional das Carbohidrases**

**Tabela 6:** Enzimas preditas envolvidas na degradação da biomassa vegetal e da quitina encontradas nos diferentes materiais estudados.

Substrato	Função Predita	Famílias CAZy	L. gongylophorus	Fungo mutualista de <i>M. goeldii</i>	Jardim de A. subterraneus	Jardim de <i>Apterstigma</i> sp.	
Pectina	Endo-poligalacturonase	GH28	1	1	2	0	
	Exo-poligalacturonase	GH28	1	2	1	0	
	$\alpha$ -arabinofuranosidase	GH51	1	1	0	0	
	$\alpha$ -arabinofuranosidase	GH43	1	0	0	0	
	$\beta$ -xilosidase	GH5	1	0	1	1	
	$\beta$ -galactosidase	GH35	0	1	0	0	
	Endo-1,4- $\beta$ -galactanase	GH35	1	0	1	0	
	Pectato liase	PL3	1	2	0	0	
	Pectato liase	PL1	1	1	0	0	
	Ramnogalacturonano liase	PL4	1	1	1	0	
	Pectina metilesterase	CE8	3	4	1	0	
	<b>Subtotal</b>			<b>12</b>	<b>13</b>	<b>7</b>	<b>1</b>
	Xilana	$\beta$ -xilanase	GH10/CBM1	1	1	1	0
$\beta$ -xilanase		GH10	1	1	1	1	
$\beta$ -xilanase		GH11	1	1	0	0	
$\beta$ -xilosidase		GH5	1	0	1	1	
$\alpha$ -arabinofuranosidase		GH51	1	1	0	0	
$\alpha$ -arabinofuranosidase		GH43	1	0	0	0	
$\alpha$ -glucuronidase		GH67	0	0	0	1	
$\alpha$ -galactosidase		GH27/CBM35	0	1	0	0	
$\alpha$ -galactosidase		GH27	3	2	0	0	
$\beta$ -galactosidase		GH35	0	1	0	0	
Acetilxilano esterase		CE1/CBM1	1	1	1	0	
<b>Subtotal</b>				<b>10</b>	<b>9</b>	<b>4</b>	<b>3</b>

Tabela 6: (Continuação)

Substrato	Função Predita	Famílias CAZY	L. <i>gongylophorus</i>	Fungo mutualista de <i>M. goeldii</i>	Jardim de A. <i>subterraneus</i>	Jardim de <i>Apterosigma</i> sp.	
Xiloglucana	Xiloglucanase	GH74/CBM1	1	1	1	0	
	Xiloglucanase	GH12	1	1	0	0	
	Xiloglucanase	GH74	0	0	0	1	
	$\alpha$ -arabinofuranosidase	GH51	1	1	0	0	
	$\alpha$ -arabinofuranosidase	GH43	1	0	0	0	
	$\alpha$ -fucosidase	GH95	1	1	1	0	
	$\alpha$ -fucosidase	GH29	0	1	1	0	
	$\alpha$ -galactosidase	GH27/CBM35	0	1	0	0	
	$\alpha$ -galactosidase	GH27	3	2	0	0	
	$\beta$ -galactosidase	GH35	0	1	0	0	
	<b>Subtotal</b>			<b>8</b>	<b>9</b>	<b>3</b>	<b>1</b>
	Celulose	$\beta$ -1,4-glucosidase	GH1	1	1	0	0
		$\beta$ -1,4-glucosidase	GH3	3	3	1	1
$\beta$ -1,4-glucosidase		GH5	0	0	1	0	
Celobiohidrolase		GH6	1	0	0	0	
Celobiohidrolase		GH7/CBM1	1	0	0	0	
Celobiohidrolase		GH6/CBM1	0	1	1	0	
Endoglucanase		GH5	1	1	0	0	
Endoglucanase		GH5/CBM1	1	0	0	0	
Endoglucanase		GH12	1	1	1	1	
<b>Subtotal</b>				<b>9</b>	<b>7</b>	<b>4</b>	<b>2</b>

Tabela 6: (Continuação)

Substrato	Função Predita	Famílias CAZy	L. gongylophorus	Fungo mutualista de <i>M. goefolii</i>	Jardim de <i>A. subterraneus</i>	Jardim de <i>Aptero stigma sp.</i>
Galactomanana	Endo-1,4- $\beta$ -Mananase	GH5/CBM1	1	1	1	0
	$\alpha$ -galactosidase	GH27/CBM35	0	1	0	0
	$\alpha$ -galactosidase	GH27	3	2	0	0
	$\beta$ -galactosidase	GH35	0	1	0	0
<b>Subtotal</b>			<b>4</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
Amido	$\alpha$ -amilase	GH13/CBM20	1	0	1	0
	$\alpha$ -amilase	GH13	0	1	0	0
	Glicoamilase	GH15/CBM20	1	1	0	0
<b>Subtotal</b>			<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
Lignina	Lacase	AA1	3	2	1	0
	Peroxidase versátil	AA2	0	1	0	0
<b>Subtotal</b>			<b>3</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
Quitina	Endoquitinase	GH18	4	5	1	1
	$\beta$ -N-acetilglucosaminidase	GH20	1	1	1	1
<b>Subtotal</b>			<b>5</b>	<b>6</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
Cutina	Cutinase	CE5	2	4	1	0
<b>Total</b>			<b>44</b>	<b>47</b>	<b>23</b>	<b>8</b>

Os fungos isolados e cultivados em amido apresentaram uma maior variedade e quantidade de enzimas envolvidas na degradação dos polissacarídeos vegetais, amido, celulose, hemicelulose e pectina, quando comparado aos jardins de fungo (Tabela 6).

A degradação da celulose envolve a ação sinérgica de três classes de enzimas:  $\beta$ -1,4-endoglucanases, exoglucanases/celobiohidrolases e  $\beta$ -glicosidase (ZHANG; LYND, 2004). Os isolados de *L. gongylophorus* e do fungo mutualista de *M. goeldii*, bem como o jardim de *A. subterraneus* apresentaram todas as enzimas pertencentes ao complexo celulolítico. *L. gongylophorus* expressou três  $\beta$ -1,4-endoglucanases (GH5, GH5/CBM1 e GH12), que clivam ligações internas da fibra de celulose liberando oligossacarídeos menores (celodextrina e celobiose), essa enzima atua na região amorfa da celulose (FENGEL; WEGENER, 1989, CASTRO; PEREIRA Jr., 2010), duas celobiohidrolases (Tipo I e II) (GH7/CBM1 e GH6), as celobiohidrolases atuam sinérgicamente nas extremidades redutora e não redutora, respectivamente, da celulose liberando celobiose (FENGEL; WEGENER, 1989, NUTT et al., 1998), e quatro  $\beta$ -glucosidases (3 GH3 e 1 GH1), que atuam nos resíduos de celodextrina e principalmente celobiose, gerando monômeros de glicose (FENGEL; WEGENER, 1989). O isolado do fungo mutualista de *M. goeldii* expressou quatro  $\beta$ -glucosidases (3 GH3 e 1 GH1), uma celobiohidrolase do tipo II (GH6/CBM1) e duas  $\beta$ -1,4-endoglucanases (GH5 e GH12). O jardim de *A. subterraneus* expressou duas  $\beta$ -glucosidases (GH3 e GH5), uma celobiohidrolase do tipo II (GH6/CBM1) e uma  $\beta$ -1,4-endoglucanase. O jardim de *Apterostigma* sp. expressou somente uma  $\beta$ -glucosidase (GH3) e uma  $\beta$ -1,4-endoglucanases (GH12) (Tabela 6). A ausência da enzima celobiohidrolase não constitui uma barreira para a degradação da celulose. Fungos que apresentam a chamada decomposição do tipo parda, que degradam principalmente os polissacarídeos (celulose e hemicelulose) presentes na madeira (RAYNER; BODDY, 1988, ERIKSSON; BLANCHETTE, 199), em geral apresentam uma deficiência na produção de celobiohidrolase que limita a degradação da celulose cristalina, porém não os impedem de degradar celulose do tipo amorfa (COHEN et al., 2005, YOON et al., 2007). Nossos resultados sugerem que o jardim de *Apterostigma* sp., assim como os fungos de degradação parda, possuem um sistema celulolítico limitado a degradação da celulose do tipo amorfa.

O metabolismo de celulose por *L. gongylophorus* é um assunto muito controverso. Em 1995, Bacci Jr. et al. realizaram cultivos do fungo simbiote de *Atta*

*sexdens* e constataram que ocorria o metabolismo de celulose por *Leucocoprinus gongylophorus* (atualmente denominado *Leucoagaricus gongylophorus*), o que levou à hipótese de que o fungo poderia intermediar a assimilação de celulose do material vegetal pelas formigas. Siqueira et al. (1998) evidenciaram em seu trabalho que a celulose é pouco degradada e assimilada pelo fungo e, portanto, menos importante para a nutrição da formiga, do que outros polissacarídeos vegetais, como o amido e a xilana. Abril e Bucher (2002) evidenciaram em seu trabalho a ausência de metabolismo de celulose por *L. gongylophorus* em estudo com ninhos de *Acromyrmex lundii*, *A. lobicornis*, *A. heyeri* e *Atta vollenweideri*. Estudo da degradação do substrato vegetal em diferentes setores dos jardins de fungo têm apresentado resultados muito parecidos com relação ao metabolismo da celulose. Nagamoto et al. (2010) realizaram um estudo baseado em microscopia e avaliaram a capacidade de degradação da celulose pelo fungo simbiótico de *Atta capiguara* através da análise dos tecidos foliares em diferentes estágios de degradação e encontraram forte indício de uma extensiva degradação da celulose pelo fungo simbiote, principalmente no setor mais basal do jardim de fungo. Grell et al. (2013) estudaram os padrões de expressão de mRNA de genes de enzimas secretadas em diferentes setores do jardim de fungo de *Acromyrmex echinaior* e confirmaram que as celulasas estão ativas principalmente na base do jardim. Os resultados de Grell et al. (2013) estão de acordo com dados metaproteômicos de Aylward et al. (2013), que também encontraram uma abundância das celulasas nos setores inferiores dos jardins de fungo. O setor basal do jardim de fungo é composto por um substrato que já sofreu uma prévia degradação e tal fato levou os autores a sugerir que a produção de celulasas pode ser estimulada quando os polímeros menos recalcitrantes estiverem esgotados.

Nossos resultados demonstram que todos os materiais estudados, exceto o jardim de *Apterostigma* sp., expressaram todas as enzimas necessárias para a completa degradação da celulose. Os fungos isolados expressaram uma maior diversidade de enzimas celulolíticas quando comparado aos jardins de fungos (Tabela 6). *L. gongylophorus* cultivado em amido apresentou praticamente o dobro da diversidade de enzimas do complexo celulolítico quando comparado ao jardim de *A. subterraneus* (Tabela 6), demonstrando o maior potencial celulolítico de *L. gongylophorus* quando isolado e cultivado em laboratório. *L. gongylophorus* expressou uma variedade de enzimas celulolíticas muito parecida com o fungo

mutualista de *M. goeldii* (Tabela 6). O jardim de *Apterostigma* sp., aparentemente, possui um sistema celulolítico limitado a degradação da celulose do tipo amorfa.

A hemicelulose, devido à sua maior complexidade estrutural, requer uma complexidade equivalente de diferentes enzimas para a sua degradação (DODD; CANN, 2009).

Com relação às xilanases, todos os materiais estudados, exceto o fungo mutualista de *M. goeldii*, expressaram as enzimas  $\beta$ -xilanase e  $\beta$ -xilosidase necessárias para degradação da cadeia principal da xilana. As  $\beta$ -xilanases são consideradas enzimas chaves no sistema xilanolítico (BIELY, 1985), que atuam randomicamente hidrolisando ligações  $\beta$ -1,4 no interior da cadeia principal da xilana, diminuindo o grau de polimerização, liberando xilooligômeros e xilobiose. *L. gongylophorus* expressou três  $\beta$ -xilanases (GH10/CBM1, GH10 e GH11) e uma  $\beta$ -xilosidase (GH5), o fungo mutualista de *M. goeldii* expressou três  $\beta$ -xilanases (GH10/CBM1, GH10 e GH11), o jardim de *A. subterraneus* expressou duas  $\beta$ -xilanases (GH10/CBM1 e GH10) e uma  $\beta$ -xilosidase (GH5) e o jardim de *Apterostigma* sp. expressou uma  $\beta$ -xilanase (GH10) e uma  $\beta$ -xilosidase (GH5) (Figura 19 e 20).

A atuação da  $\beta$ -xilanase depende da presença, quantidade e tipo de ramificações, além do seu grau de polimerização (POLIZELI et al., 2005). As  $\beta$ -xilanases da família GH 10, ao contrário das  $\beta$ -xilanases da família GH 11, apresentam uma estrutura denominada barril TIM em seu domínio catalítico (POLLET et al., 2010), essa diferença estrutural confere as  $\beta$ -xilanases da família GH 10 uma ampla especificidade a substratos. Diferente das  $\beta$ -xilanases da família 11, que possuem pontos de clivagem mais específicos, os membros da família 10 possuem ampla especificidade a substratos, essas enzimas degradam não só cadeias lineares ligados D-1,4 com resíduos de xilose, mas também cadeias principais de xilanas com um alto grau de ramificações e pequenos xilooligossacarídeos (POLLET et al., 2010). Portanto,  $\beta$ -xilanases da família GH10 são importantes para a completa degradação de xilanas ramificadas.

A enzima  $\beta$ -xilosidase atua em sinergia com a  $\beta$ -xilanase, hidrolisando xilooligossacarídeos e xilobiose e liberando xilose a partir da extremidade não redutora (SUBRAMANIYAN; PREMA, 2002, ALVES-PRADO et al., 2010).

As enzimas  $\beta$ -xilosidases identificadas em *L. gongylophorus*, jardim de *A. subterraneus* e jardim de *Apterostigma* sp. pertencentes a família GH5. Embora as

enzimas  $\beta$ -xilosidases sejam tipicamente pertencentes às famílias GH3 e GH43, a anotação funcional realizada com o programa Blast2go apontou atividade xiloglucanásica (EC 3.2.1.37, GO:0009044) para essas enzimas, além disso essas enzimas apresentaram valores de identidade variando entre 74 e 76% com a enzima  $\beta$ -xilosidase de *Phanerochaete chrysosporium* (GenBank: W8QRE4), inicialmente identificada como uma endoglucanase pertencente a família GH5, porém quando caracterizada apresentou atividade xiloglucanásica (HUY et al., 2005).

Com relação às enzimas que atuam nas cadeias laterais da xilana, *L. gongylophorus* expressou um acetilxilano esterase (CE1/CBM1), responsável pela hidrólise do acetil da xilose preferencialmente em O-2 da cadeia principal da xilana (BIELY et al., 2011), duas  $\alpha$ -arabinofuranosidases (GH43 e GH51) e três  $\alpha$ -galactosidases (GH27), que removem as ramificações de L-arabinose e resíduos de galactosil, respectivamente. O fungo mutualista de *M. goeldii* expressou uma enzima acetilxilano esterase (CE1/CBM1), uma  $\alpha$ -arabinofuranosidase (GH51), três  $\alpha$ -galactosidases (2 GH27, 1 GH27/CBM35), uma  $\beta$ -galactosidase (GH35), que removem as ramificações de L-arabinose, resíduos de galactosil, respectivamente, e uma  $\alpha$ -glucuronidase (GH67) que cliva resíduos de D-galactose oligossacarídeos curtos (CHONG et al., 2011). O jardim de *A. subterraneus* expressou apenas uma acetilxilano esterase (CE1/CBM1), responsável pela desacetilação da cadeia principal. O jardim de *Apterostigma* sp. expressou uma  $\alpha$ -glucuronidase (GH67), que atuam na remoção de ramificações de ácido glucurônico (Figuras 16 e 17).

As  $\alpha$ -arabinofuranosidases fúngicas são principalmente encontradas nas famílias GH51 e 54 (RAVANAL et al., 2010). A  $\alpha$ -arabinofuranosidase da família GH51, conhecido como  $\alpha$ -arabinofuranosidase A, difere da  $\alpha$ -arabinofuranosidase B (GH54) na especificidade do substrato. Ambas as enzimas são capazes de liberar arabinose da arabinana, mas apenas a  $\alpha$ -arabinofuranosidase B é capaz de libertar arabinose do xilano (DE VRIES; VISSER, 2001).

*L. gongylophorus* e o fungo mutualista de *M. goeldii* expressaram a  $\alpha$ -arabinofuranosidase do tipo A, o que habilita esses dois materiais hidrolisarem a arabinose de arabinana, porém somente *L. gongylophorus* expressou a  $\alpha$ -arabinofuranosidase da família GH43, capaz de liberar arabinose, além de clivar a cadeia principal de arabinoxilanas (RAVANAL et al., 2010, MATSUZAWA et al., 2015).

Com relação à xiloglucana, todos os materiais analisados expressaram as enzimas xiloglucanase que atuam quebrando a cadeia principal da xiloglucana liberando xilogluco-oligossacarídeos. *L. gongylophorus* expressou duas xiloglucanases (GH74/CBM1 e GH12), o fungo mutualista de *M. goeldii* expressou duas xiloglucanases (GH74/CBM1 e GH12), o jardim de *A. subterraneus* expressou uma xiloglucanase (GH74/CBM1) e o jardim de *Apterostigma* sp. expressou uma xiloglucanase (GH74).

É importante destacar que a cadeia principal da xiloglucana é idêntica à celulose, ou seja, uma cadeia linear formada por moléculas de glicose ligadas através de ligações do tipo  $\beta$ -1,4 (MCCANN; ROBERTS, 1991, BUCKERIDGE et al., 1992). Devido a essa semelhança, enzimas como endoglucanases e as  $\beta$ -glicosidases também são capazes de atuar na despolimerização da cadeia principal da xiloglucana (DE VRIES; VISSER, 2001).

Com relação às enzimas que atuam nas cadeias laterais de xiloglucana, o fungo mutualista de *M. goeldii*, apresentou uma maior diversidade de enzimas sendo seguido por *L. gongylophorus* e jardim de *A. subterraneus*.

*L. gongylophorus* expressou uma  $\alpha$ -fucosidase (GH95) que realizam a clivagem de glicoconjugados contendo  $\alpha$ -L fucose, duas  $\alpha$ -arabinofuranosidases (GH43 e GH51), que removem as ramificações de L-arabinoses de xilana e arabinana e três  $\alpha$ -galactosidases (GH27), que removem resíduos de galactosil. O fungo mutualista de *M. goeldii* expressou uma  $\alpha$ -arabinofuranosidase (GH51), que remove as ramificações de L-arabinoses de arabinana, duas  $\alpha$ -fucosidases (GH95, GH29), três  $\alpha$ -galactosidases (2 GH27, 1 GH27/CBM35) e uma  $\beta$ -galactosidase (GH35), que realizam a remoção de ramificações de  $\alpha$ -L fucose, D-galactose e galactosil, respectivamente. O jardim de *A. subterraneus* expressou duas  $\alpha$ -fucosidases (GH95, GH29) que removem glicoconjugados contendo  $\alpha$ -L fucose.

Já para a galactomanana, *L. gongylophorus*, o fungo mutualista de *M. goeldii* e o jardim de *A. subterraneus* expressaram uma endo-1,4-  $\beta$ -mananase cada (GH5/CBM1). O jardim de *Apterostigma* sp. não expressou qualquer enzima para a degradação da galactomanana. (Figura 19 e 20).

A degradação da cadeia principal da galactomanana requer a ação sinérgica das enzimas endo-1,4-  $\beta$ -mananase, e  $\beta$ -1,4-mannosidase (DE VRIES; VISSER, 2001). A enzima endo-1,4-  $\beta$ -mananase é responsável pela hidrólise aleatória das

ligações  $\beta$ -1,4-manano da cadeia principal de galactomananas (DE VRIES; VISSER, 2001), liberando cadeias lineares e ramificadas de mananoligossacarídeo de vários comprimentos (KREMICKÝ; BIELY, 1997). A enzima  $\beta$ -1,4-manosidase atua nas extremidades não redutoras dos mananoligossacarídeos liberando manose.

Quanto às enzimas que atuam nas cadeias laterais de galactomanana, *L. gongylophorus* expressou três  $\alpha$ -galactosidases (GH27), que removem resíduos de galactosil. O fungo mutualista de *M. goeldii* expressou três  $\alpha$ -galactosidases (2 GH27, 1 GH27/CBM35) e uma  $\beta$ -galactosidase (GH35), que removem resíduos de D-galactose e galactosil, respectivamente. O jardim de *A. subterraneus* não expressou qualquer enzima para a desramificação da cadeia principal de galactomananas (Figura 19 e 20).

Com relação aos tipos de hemicelulose estudados, os materiais analisados, com exceção do fungo mutualista de *Mycocephurus goeldii*, apresentaram as enzimas necessárias para a despolimerização da cadeia principal de xiloglucana e xilana. Esse resultado, em princípio, confere a esses fungos a habilidade de desconstruir esses polímeros e utilizar a glicose e xilose liberadas como fonte de energia ou disponibilizar para a formiga mutualista. O fungo mutualista de *M. goeldii* apresentou apenas as enzimas necessárias para a despolimerização da cadeia principal de xiloglucana e degradação parcial da xilana, o que pode ser um indicativo de que a xilose não constitui uma fonte de carbono para o fungo mutualista de *M. goeldii*.

Esse resultado é consistente com os dados transcriptômicos de Grell et al. (2013), que reportou as enzimas para a degradação das cadeias principais de xilana e xiloglucana, e proteômicos de Aylward et al. (2013), que reportou as enzimas para a degradação da cadeia principal de xilana.

Grell et al. (2013), também encontraram enzimas para a degradação de hemicelulose, não encontrou a enzima  $\beta$ -xilosidase no transcriptoma de *Acromyrmex echinator*. Nossos resultados mostram que essa enzima foi expressa pelo fungo *L. gongylophorus* isolado e no ninho de *A. subterraneus* e pelo jardim de *Apterostigma* sp. Tal resultado é reforçado por estudos que demonstraram que culturas puras de *L. gongylophorus* podem crescer em meio contendo xilana como única fonte de carboidrato (SILVA et al., 2006, SIQUEIRA et al., 1998). Somera et al. (2015) evidenciaram alta atividade xilanolítica no setor central (mais velho) e acúmulo de xilose no setor periférico em ninhos de *Atta* e *Acromyrmex*. Além disso, Moller et al.

(2011) estudaram a degradação de diferentes polissacarídeos vegetais em diferentes setores do ninho de *Acromyrmex echinator* utilizando a técnica de *microarray* e observaram que a xilana sem ramificações e xiloglucana foram extensamente degradados.

Para a completa degradação da hemicelulose e de pectinas é necessária a remoção de todas as ramificações da cadeia principal, uma vez que as endoenzimas hidrolisam esses polímeros apenas em pontos que estão abertos à hidrólise. Isso requer a ação sinérgica das enzimas auxiliares, que removem as ramificações, tornando a cadeia principal acessível ao ataque enzimático das endoenzimas (VAN DEN BRINK; DE VRIES, 2011). Na presença de ramificações, as endoenzimas hidrolisam a cadeia principal, em pontos abertos à hidrólise, produzindo oligômeros que não são mais suscetíveis ao ataque enzimático, devido à presença dessas ramificações. Dessa forma, as enzimas auxiliares são componentes determinantes na extensão da despolimerização de substratos vegetais, contribuindo para o aumento do rendimento na produção de açúcares redutores durante o processo de hidrólise. A influência das enzimas auxiliares na despolimerização de polissacarídeos vegetais fica bem clara no trabalho de Moller et al. (2011), que mostraram que, no ninho de *Acromyrmex echinator*, somente alguns tipos de xilana foram degradadas. Nesse caso, as xilanas sem ramificações foram substancialmente degradadas, enquanto que as xilanas com muitas ramificações não foram degradadas e permanecem como resíduos no lixo descartado pelas formigas. Dessa forma, as ramificações da cadeia principal da xilana atuaram como uma barreira bloqueando o ataque enzimático.

Vários estudos demonstram que a utilização das enzimas auxiliares na suplementação de coquetéis enzimáticos para a hidrólise da biomassa resulta em melhora no rendimento de obtenção de açúcares redutores (GAO et al., 2011, GOTTSCHALK et al., 2010, KUMAR; WYMAN, 2009, HU et al., 2013). Tais enzimas hemicelulolíticas e pectinolíticas evidenciadas em nosso estudo constituem elementos promissores para produção biotecnológica de açúcares fermentáveis a partir de biomassa vegetal. Dessa forma, os fungos isolados apresentaram uma maior potencial para a degradação de polímeros hemicelulósicos quando comparado aos jardins.

O perfil de expressão das enzimas auxiliares foi muito parecido entre os fungos isolados que expressaram mais que o dobro dessas enzimas quando

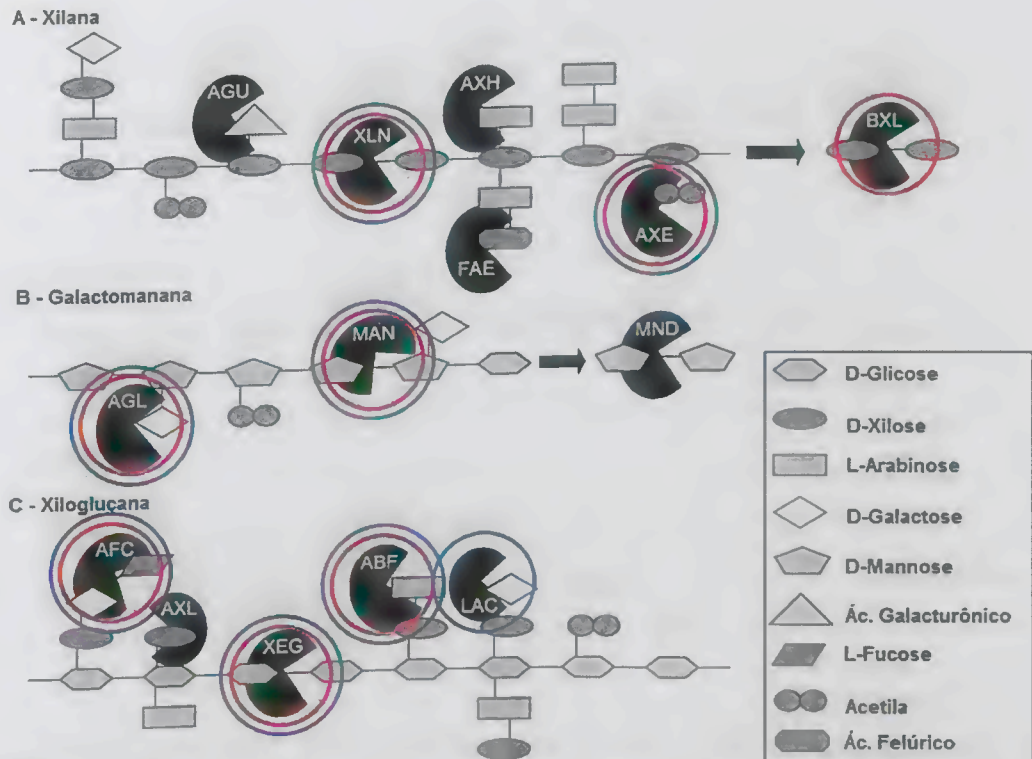
comparado aos jardins de fungo, que expressaram poucas enzimas para a despolimerização da cadeia principal de hemiceluloses (Tabela 6).

A diferença no número de enzimas CAZy observada entre o fungo *L. gongylophorus* isolado e o jardim de *A. subterraneus* evidencia uma flexibilidade metabólica em resposta ao tipo de substrato utilizado. Tal flexibilidade já havia sido relatada por Khadempour et al. (2016), que observaram que ninhos tratados com folhas ou flores (mais recalcitrantes) apresentaram perfis metaproteômicos muito semelhante, porém, muito diferentes dos perfis metaproteômicos de ninhos tratados com aveia ou uma mistura de folhas, flores e aveia, o que levou a conclusão que, em meio a uma mistura de substratos, *L. gongylophorus* preferencialmente degradará o substrato de mais fácil digestão.

Nossos resultados demonstram que essa flexibilidade metabólica observada envolve a expressão de enzimas auxiliares (duas  $\alpha$ -arabinofuranosidases e três  $\alpha$ -galactosidases), que foram expressas pelo fungo *L. gongylophorus* isolado, mas não pelo fungo *L. gongylophorus* no jardim de *A. subterraneus* (Tabela 6). Esse resultado demonstra que o fungo *L. gongylophorus* possui a capacidade de modular a intensidade da despolimerização de componentes da hemicelulose, principalmente xilana e xiloglucana, através da expressão dessas enzimas. Dessa forma, em situações naturais de escassez de recursos, o fungo *L. gongylophorus* pode expressar uma maior variedade de enzimas auxiliares, aumentando assim a desramificação das cadeias principais de xilana e xiloglucana. Com menos ramificações, essas cadeias se tornam mais suscetíveis à despolimerização pelas enzimas xilanases e xiloglucanases, obtendo-se assim xilose e glicose, que o fungo pode utilizar como fonte de carbono ou disponibilizar para a formiga mutualista.

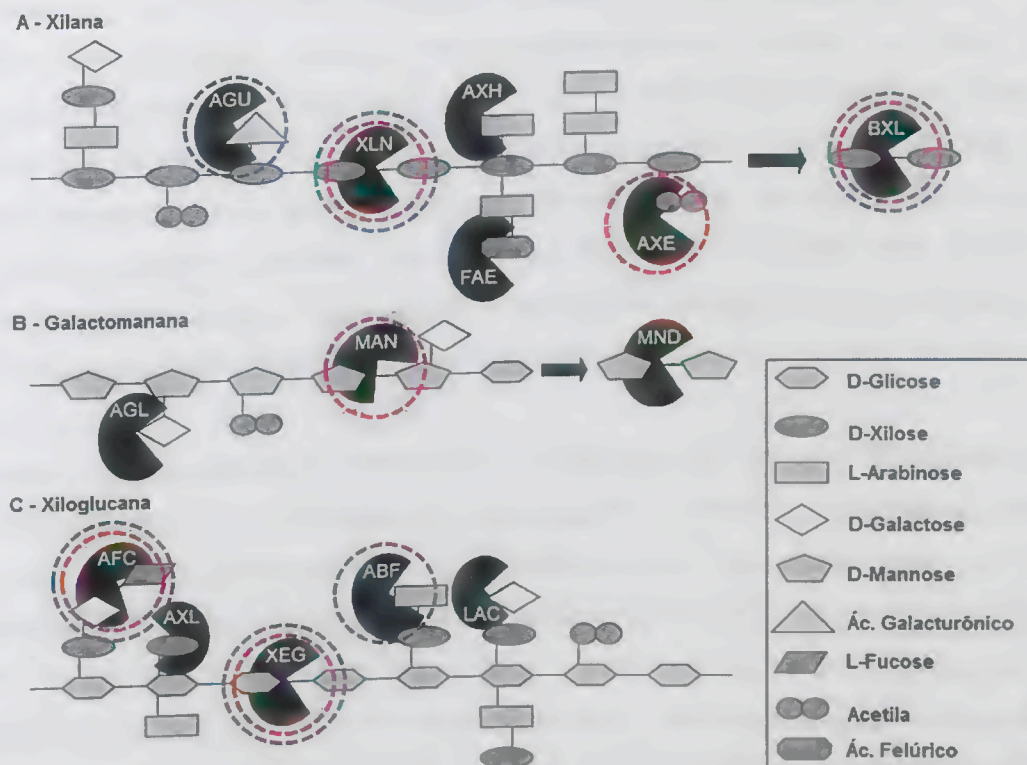
Embora em nenhum dos materiais analisados tenham mostrado a expressão da enzima  $\beta$ -1,4-manosidase, necessária para a hidrólise de mananoligossacarídeos em manose, Grell et al. (2013) evidenciaram a expressão dessa enzima em ninhos de *Acromyrmex echinator*. Além disso, Somera et al. (2015) observaram a produção de manose e sua conversão em manitol em ninhos de *Atta* e *Acromyrmex*, o que indica que a possibilidade de uma completa degradação da cadeia principal de galactomanana pelo fungo *L. gongylophorus* não pode ser descartada.

**Figura 19.** Ação das enzimas do complexo hemicelulolítico encontradas em *L. gongylophorus* (círculos vermelhos) e no fungo mutualista de *M. goeldii* (círculos azuis).



ABF:  $\alpha$ -arabinofuranosidase; AFC:  $\alpha$ -fucosidase; AGL:  $\alpha$ -galactosidase; AGU:  $\alpha$ -glucuronidase; AXE: acetilxilano esterase; AXH:  $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo arabinohidrolase; AXL:  $\alpha$ -xilosidase; BXL:  $\beta$ -xilosidase; FAE: feruloil esterase; LAC:  $\beta$ -galactosidase; MAN: endo-1,4-  $\beta$  -mananase; MND:  $\beta$ -1,4-mannosidase; XEG: xiloglucanase; XLN:  $\beta$ -xilnase (modificado VAN DEN BRINK; DE VRIES, 2011).

**Figura 20.** Ação das enzimas do complexo hemicelulolítico encontradas no jardim de *A. subterraneus* (círculos vermelhos) e no jardim de *Apterostigma* sp (círculos azuis).



ABF:  $\alpha$ -arabinofuranosidase; AFC:  $\alpha$ -fucosidase; AGL:  $\alpha$ -galactosidase; AGU:  $\alpha$ -glucuronidase; AXE: acetilxilano esterase; AXH:  $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo arabinohidrolase; AXL:  $\alpha$ -xilosidase; BXL:  $\beta$ -xilosidase; FAE: feruloil esterase; LAC:  $\beta$ -galactosidase; MAN: endo-1,4-  $\beta$  -mananase; MND:  $\beta$ -1,4-mannosidase; XEG: xiloglucanase; XLN:  $\beta$ -xilase (modificado VAN DEN BRINK; DE VRIES, 2011).

Pectina é um termo designado para uma família de polissacarídeos de estrutura complexa e heterogênea, cuja cadeia principal consiste principalmente em resíduos de ácido D-galacturônico unidos por ligações do tipo  $\alpha$ -1,4 que podem ser metilesterificadas ou acetiladas (MOHNEN, 2008).

O jardim de *Apterostigma* sp. praticamente não expressou enzimas pectinolíticas.

*L. gongylophorus*, o fungo mutualista de *M. goeldii* e o jardim de *A. subterraneus* expressaram enzimas necessárias para a degradação parcial da ramnogalacturonana. Com relação à cadeia principal, esses materiais expressaram a enzima ramnogalacturonana liase (PL4), que faz a quebra de ligações  $\alpha$ -1,4-

glicosídicas formadas entre resíduos de L-raminose e D-ácidos galacturônicos pelo processo de  $\beta$ -eliminação (WONG, 2008) (Figuras 18 e 19).

Para a remoção das cadeias laterais de ramnogalacuronana, *L. gongylophorus* expressou uma endo-1,4- $\beta$ -galactanase (GH53) e duas  $\alpha$ -arabinofuranosidases (GH43 e GH51), que realizam a hidrólise de cadeias laterais da galactana e de resíduos de L-arabinose, respectivamente. O fungo mutualista de *M. goeldii* expressou uma  $\beta$ -galactosidase (GH35) e uma  $\alpha$ -arabinofuranosidase (GH51), que realizam a hidrólise de resíduos terminais de D-galactose e de L-arabinose, respectivamente. O jardim de *A. subterraneus* expressou a enzima uma endo-1,4- $\beta$ -galactanase (GH53), que hidrolisa cadeias laterais da galactana (Figura 21 e 22).

Nossos resultados demonstram que *L. gongylophorus*, o fungo mutualista de *M. goeldii* e o jardim de *A. subterraneus* expressaram as enzimas necessárias para degradação de homogalacuronana. *L. gongylophorus* expressou três pectina metilesterase (CE8), que é considerada a enzima chave para a desestruturação da matriz pectínica (WILLATS et al., 2001), o fungo mutualista de *M. goeldii* expressou quatro pectina metilesterase (CE8) e o jardim de *A. subterraneus* expressou uma pectina metilesterase (CE8). Essa enzima é conhecida como enzima desmetoxilante, pois atua removendo grupos metoxil da homogalacuronana. Uma vez removido os grupos metoxil, o polímero de homogalacturonana tornar-se alvo para as demais enzimas pectinolíticas (PELLOUX et al., 2007). Esses três materiais analisados também expressaram as enzimas que promovem a quebra das ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 entre resíduos de ácidos galacturônicos da cadeia principal pelo processo de hidrólise (poligalacturonases), *L. gongylophorus* expressou uma endo-poligalacturonase (GH28) e uma exo-poligalacturonase (GH28), o fungo mutualista de *M. goeldii* expressou uma endo-poligalacturonase (GH28) e duas exo-poligalacturonase (GH28), o jardim de *A. subterraneus* expressou duas endo-poligalacturonase (GH28) e uma exo-poligalacturonase (GH28). Além disso, *L. gongylophorus* expressou duas pectato liases (PL1 e PL3) e o fungo mutualista de *M. goeldii* expressou três pectato liases (1 PL1 e 2 PL3), que realizam a quebra das ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 entre resíduos de ácidos galacturônicos através do mecanismo de trans-eliminação.

Das três enzimas necessárias para a completa despolimerização da cadeia principal da ramnogalacturonana (exoramnogalacturonase,

endoramnogalacturonase e ramnogalacturonana liase), esses três materiais apresentaram a enzima ramnogalacturonana liase. De acordo com as caracterizações enzimáticas realizada por Mutter et al. (1996 e 1998), essa enzima é capaz de atuar em oligômeros de ramnogalacturonana, contendo um ácido-D-galacturônico na extremidade não redutora e uma L-raminose na extremidade redutora. Dessa forma, esses materiais podem hidrolisar parcialmente a ramnogalacturonana em oligômeros, porém não parecem capazes de degradar completamente a cadeia principal liberando ácido galacturônico e ramnose. Tal fato reforça a hipótese de que as pectinases são produzidas nos jardins de fungo das formigas para desestruturar a parede celular das plantas, dando acesso ao fungo a outros nutrientes do material vegetal (SIQUEIRA et al., 1998, ABRIL; BUCHER, 2002, MOLLER et al., 2011), uma vez que o fungo não cresce bem no produto de hidrólise da pectina.

Essa hipótese é reforçada por estudos prévios que têm mostrado que o ácido galacturônico, produto da degradação da pectina, não é muito bem assimilado pelo fungo *L. gongylophorus* em culturas isoladas (SIQUEIRA et al., 1998, SILVA et al., 2006). Além disso, o ácido galacturônico é tóxico para as formigas, diminuindo o seu tempo de vida (SILVA et al., 2003). SOMERA et al. (2015) observaram uma alta atividade pectinolítica, porém não detectaram acúmulo de ácido galacturônico em ninhos de *Atta bisphaerica*.

Com relação à homogalacturonana, devido a sua estrutura mais simples, ela requer um arsenal enzimático menos robusto para a sua degradação (VAN DEN BRINK; DE VRIES, 2011). A homogalacturonana é o tipo de pectina mais abundante na parede celular vegetal, contabilizando aproximadamente 60% da quantidade total desse polissacarídeo (MOHNEN et al., 2008). Marcus et al. (2008) utilizaram combinações de enzimas de parede celular e anticorpos para mostrar que as homogalacturonanas são capazes de mascarar extensivamente os polímeros de xiloglucana, tornando-as inacessíveis a anticorpos e muito provavelmente também a ataques enzimáticos. Por tudo isso a homogalacturonana se torna um importante alvo de ataques enzimáticos, pois requer um relativo baixo investimento enzimático para a sua degradação e exerce um papel muito importante na manutenção da estrutura da parede celular.

Novamente nossos resultados são compatíveis com os resultados obtidos por Moller et al. (2011), que observaram uma substancial degradação de pectina,

particularmente da homogalacturonana na camada superior do jardim de fungo de *Acromyrmex echinator*.

Grell et al. (2013) e Aylward et al. (2013) em seus estudos transcriptômicos e proteômicos também encontraram os mesmos transcritoqs para a degradação parcial da cadeia principal da ramnogalacturonana e as enzimas para a degradação do homogalacturonana.

A pectina é um dos mais abundantes componentes estruturais da parede vegetal. Ela forma uma matriz em forma de gel, presente em abundância na parede celular primária e na região da lamela média das folhas, onde está envolvida no controle da porosidade da parede celular e com a adesão intercelular (WILLATS et al., 2001).

Diversos estudos têm mostrado uma associação, através de ligações covalentes, entre polímeros pécticos e a xiloglucana na parede vegetal (THOMPSON; FRY, 2000, POPPER; FRY, 2005, 2008, ABASOLO et al., 2009, VIDAL et al., 2003). Essa associação de pectina e xiloglucana forma uma fase de polímeros não celulolíticos que circundam e embebem a celulose (CAPITA; GIBEAUT, 1993, BROWNLEADER et al., 1999). A desestruturação da matriz de pectina induz alterações nas propriedades fisiológicas das células vegetais e separação das células vegetais umas das outras, que as torna susceptíveis a ataques microbianos (ESQUERRÉ-TUGAYÉ et al., 1999, 2000, DAHER; BRAYBROOK, 2015). Dessa forma, podemos concluir que o potencial enzimático para a degradação da xilogalacturonana, da ramnogalacturonana e da homogalacturonana, observados nos fungos *L. gongylophorus*, e no mutualista de *M. goeldii* e no jardim de *A. subterraneus*, têm como principal finalidade a desestruturação da parede celular vegetal.

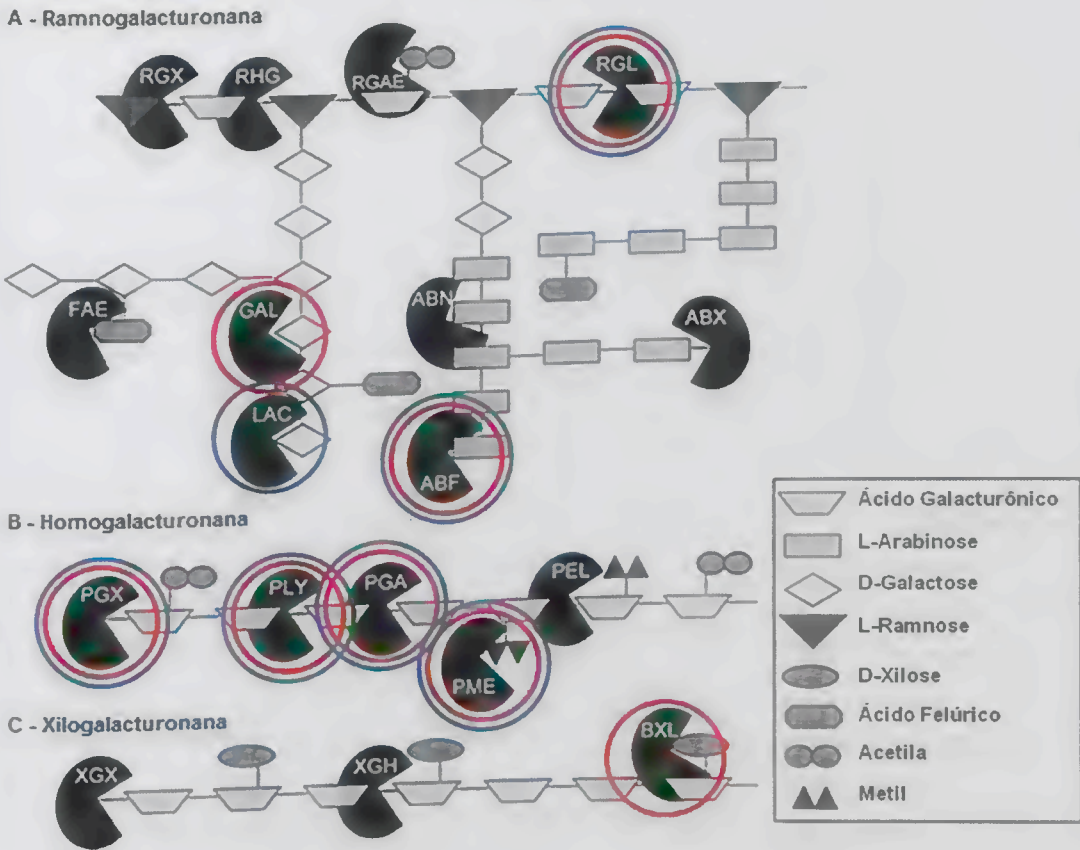
*L. gongylophorus* isolado expressou as enzimas pectato liase,  $\alpha$ -arabinofuranosidase e  $\alpha$ -galactosidase, que não foram expressas pelo jardim de *A. subterraneus*. A expressão da pectato liase pelo fungo isolado *L. gongylophorus* pode intensificar a degradação na cadeia principal de homogalacturonana, auxiliando as enzimas poligalacturonases. A expressão das enzimas auxiliares  $\alpha$ -arabinofuranosidase e  $\alpha$ -galactosidase pelo fungo isolado *L. gongylophorus* auxiliam a hidrólise de polímeros contendo muitas substituições do tipo L-arabinose e D-galactose. Dessa forma, a expressão da  $\alpha$ -arabinofuranosidase irá favorecer a degradação de polímeros do tipo arabinoxilana, glucoarabinoxilana e

arabinogalactana, enquanto que a  $\alpha$ -galactosidase irá favorecer a degradação de galactomananas.

Diferentes estudos têm relacionado à ação das enzimas pectato liase,  $\alpha$ -arabinofuranosidase e  $\alpha$ -galactosidase com o processo de maturação de frutas (TATEISHI et al., 1996, YOSHIOKA et al., 1995, DOMÓÂNGUEZ-PUIGJANER et al., 1997, MEDINA-SUAÂREZ et al., 1997, KANG; LEE, 2001, PILATZKE-WUNDERLICH; NESSLER, 2001, XU et al., 2003, OWINO et al., 2005, SOH et al., 2006). O amolecimento de frutas durante o processo de maturação está associado à degradação da parede celular (SEYMOUR; GROSS, 1996) e durante esse processo alguns polímeros pécticos e hemicelulósicos tornam-se cada vez mais solúveis e despolimerizados pela ação da liberação de cadeias laterais (HUBER; O'DONOGHUE, 1993, BRUMMELL et al., 2001). Esses estudos mostram que a presença dessas enzimas é capaz de acelerar a despolimerização das substâncias pécticas e hemicelulósicas durante o processo de maturação de frutas. Esse resultado reforça a nossa hipótese de que o fungo *L. gongylophorus* possui a capacidade de modular a intensidade da despolimerização de componentes da parede celular através do controle da expressão de enzimas auxiliares.

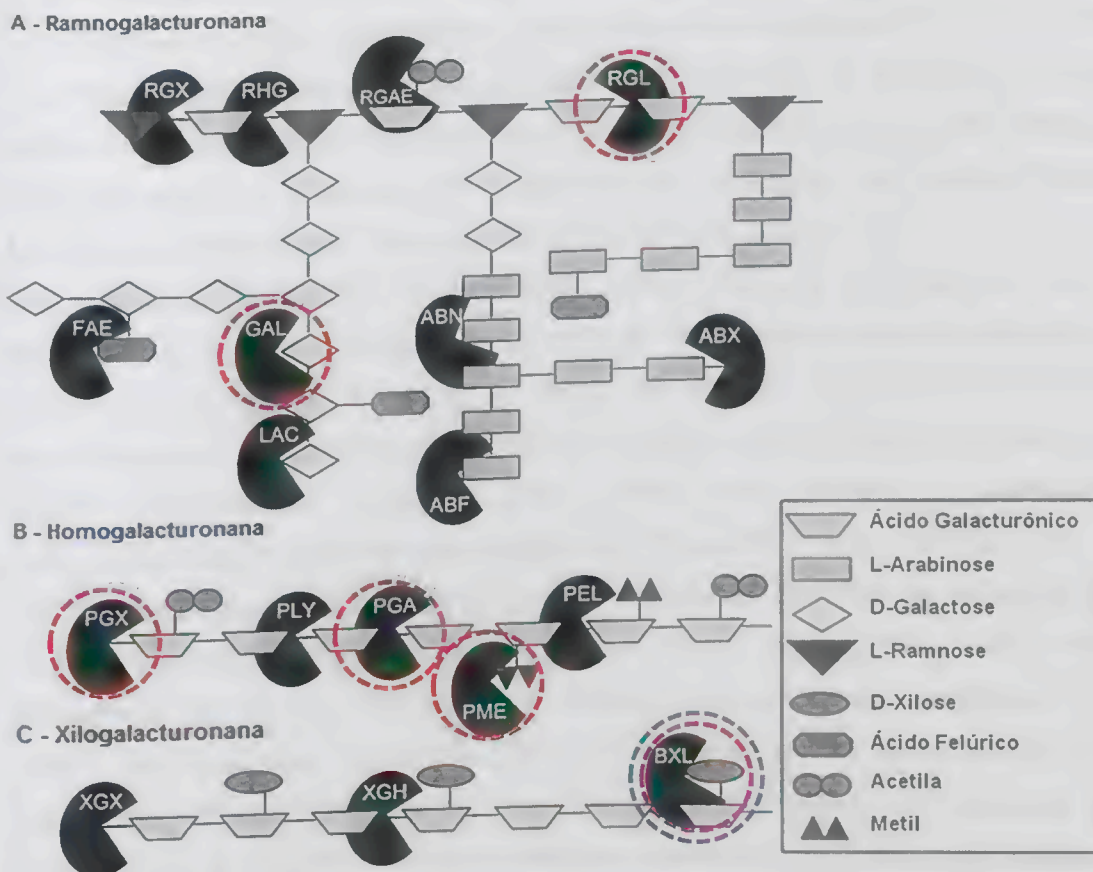
A degradação de hemiceluloses e pectinas pelo fungo simbionte é quase um consenso entre os pesquisadores. No entanto, a extensão desse metabolismo e a capacidade do fungo de assimilar ou disponibilizar o produto desse metabolismo (açúcar fermentáveis) para as suas formigas mutualistas e outros micro-organismos é um aspecto que ainda gera muita controvérsia. Nossos resultados mostram não só que a degradação desses polímeros pode ser modulada pelo fungo em resposta a diferentes substratos utilizados, como também mostram que a expressão das enzimas auxiliares desempenha um importante papel nessa regulação.

**Figura 21.** Ação das enzimas do complexo pectinolítico encontrados em *L. gongylophorus* (círculos vermelhos) e no fungo mutualista de *M. goeldii* (círculos azuis).



ABF:  $\alpha$ -arabinofuranosidase; ABN: endoarabinanase; ABX: exoarabinanase; BXL:  $\beta$ -1,4-xilosidase; FAE: feruloil esterase; GAL: endo-1,4- $\beta$ -galactanase; LAC:  $\beta$ -galactosidase; PEL: pectina liase; PLY: pectato liase; PGA: endo-poligalacturonase; PGX: exo-poligalacturonase; PME: pectina metilesterase; RGAE: ramnogalacturonana acetilesterase; RGL: ramnogalacturonana liase; RHG: endoramnogalacturonase; RGX: exoramnogalacturonase; XGH: endo-xilogalacturonase; XGX: exo-xilogalacturonase (modificado VAN DEN BRINK; DE VRIES, 2011).

**Figura 22.** Ação das enzimas do complexo pectinolítico encontrados no jardim de *A. subterraneus* (círculos vermelhos) e no jardim de *Apterostigma* sp. (círculos azuis).



ABF:  $\alpha$ -arabinofuranosidase, ABN: endoarabinanase; ABX: exoarabinanase; BXL:  $\beta$ -1,4-xilosidase; FAE: feruloil esterase; GAL: endo-1,4- $\beta$ -galactanase; LAC:  $\beta$ -galactosidase; PEL: pectina liase; PLY: pectato liase; PGA: endo-poligalacturonase; PGX: exo-poligalacturonase; PME: pectina metilesterase; RGAE: ramnogalacturonana acetilesterase; RGL: ramnogalacturonana liase; RHG: endoramnogalacturonase; RGX: exoramnogalacturonase; XGH: endo-xilogalacturonase; XGX: exo-xilogalacturonase (modificado VAN DEN BRINK; DE VRIES, 2011).

Com relação ao amido, *L. gongylophorus* expressou uma  $\alpha$ -amilase, que hidrolisa aleatoriamente as ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -1,4 presentes no interior da cadeia de amido, liberando unidades de glicose, maltose e dextrinas (GUPTA et al., 2003) e uma glicoamilase que é responsável pela hidrólise das ligações  $\alpha$ -1,4 a partir de uma extremidade não redutora da molécula de amido, liberando D-glicose (GUPTA et al., 2003). O isolado do fungo mutualista de *M. goeldii* expressou duas  $\alpha$ -amilases e uma glicoamilase. O jardim de *A. subterraneus* expressou apenas uma  $\alpha$ -

amilase. O jardim de *Apterostigma* sp. não expressou qualquer enzima para a degradação do amido.

A ação sinérgica das enzimas  $\alpha$ -amilase e glicoamilase é capaz de conduzir a uma hidrólise completa da molécula de amido sem a necessidade da  $\alpha$ -glicosidase. A primeira etapa desse processo de hidrólise é chamada de liquefação, catalisada pela  $\alpha$ -amilase liberando dextrinas solúveis com diferentes graus de polimerização; a segunda etapa é chamada de sacarificação catalisada pela glicoamilase que hidrolisa as dextrinas em maltose e glicose (LIM et al., 2003).

Estudos anteriores têm mostrado que, entre as enzimas do complexo amilolítico, a  $\alpha$ -glicosidase de *L. gongylophorus* está sujeita a uma severa repressão catabólica pela glicose (SILVA et al., 2005). No entanto, estudos sobre a dinâmica do metabolismo do amido em ninhos de formigas cortadeiras evidenciaram que a enzima  $\alpha$ -glicosidase, produzida pela formiga *Atta sexdens*, é positivamente selecionada pelo intestino das formigas, permanecendo intacta no fluido fecal. Esse fluido é então depositado sobre os pedaços de folhas contidas no jardim de fungo, onde irão promover a degradação do amido (BACCI et al., 2013). Esse resultado encontrado por Bacci et al. (2013) é reforçado pelos estudos de Richard et al., (2005) que avaliaram a contribuição das formigas e seu fungo mutualista na degradação de material vegetal em sete espécies de *Attina* nos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, e encontraram nas formigas operárias enzimas que atuaram em pequenas moléculas da parede vegetal, especialmente a maltose.

Estudos anteriores mostraram que o fluido fecal de formigas *Attina* é rico em enzimas relevantes para a conversão de biomassa (MARTIN et al., 1973, MARTIN et al., 1975, RHONHEDE; BOOMSMA; ROSENDAHL, 2004, SCHIOTT et al., 2010, KOOIJ et al. 2016). Todos estes resultados, conjuntamente, podem explicar a ausência da enzima  $\alpha$ -glicosidase nos diferentes materiais estudados, uma vez que ela está sujeita a uma repressão catabólica severa e por isso pode estar sendo substituída pela enzima  $\alpha$ -glicosidase da sua formiga mutualista.

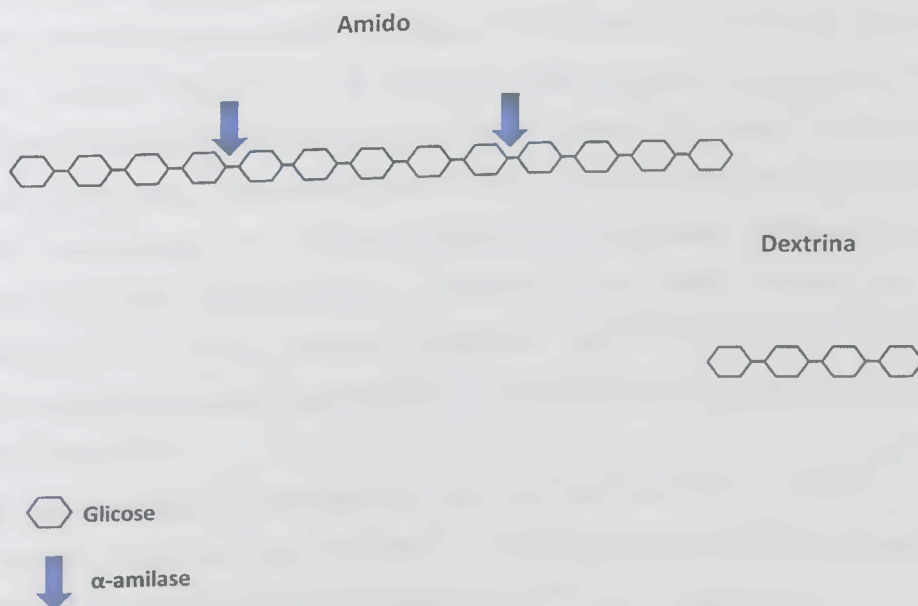
Numerosos ensaios têm mostrado que culturas puras *L. gongylophorus* são capazes de degradar e crescer em meio que contenha amido (SIQUEIRA et al., 1998, SILVA et al., 2006). Somera et al. (2015) observaram uma grande atividade amilolítica e acúmulo de glicose no setor periférico em jardins de fungo de *Atta bisphaerica* proveniente da degradação do amido.

Dessa forma, nossos dados aqui apresentados indicam que *L. gongylophorus*, o fungo mutualista de *M. goeldii* e o jardim de *A. subterraneus* apresentaram um potencial para a degradação do amido, potencial este não encontrado no jardim de *Apterostigma* sp.

**Figura 23.** Ação das enzimas do complexo amilolítico encontrados em *L. gongylophorus* e no fungo mutualista de *M. goeldii*.



**Figura 24.** Ação das enzimas do complexo amilolítico encontrados no jardim de *Apterostigma* sp.



Nossos resultados mostram que os fungos isolados expressaram uma maior diversidade de enzimas celulolíticas, hemicelulolíticas, pectinolíticas e amilolíticas quando comparado aos jardins de fungos (Tabela 6). Esses resultados estão de acordo com os resultados de Silva et al. (2005 e 2006), que demonstraram que em culturas isoladas de *L. gongylophorus* o amido é um bom indutor de enzimas CAZy ativas contra uma variedade de polissacarídeos constituintes da parede vegetal.

*L. gongylophorus* apresentou uma variedade muito parecida com a do fungo mutualista de *M. goeldii* com relação às enzimas do complexo celulolítico, hemicelulolítico, pectinolítico e amilolítico. Esse resultado sugere que *L. gongylophorus* não sofreu nenhuma perda na capacidade de degradar polissacarídeos recalcitrantes de parede celular ao longo da sua história evolutiva. Pelo contrário, nossos dados sugerem que *L. gongylophorus* apresentou uma melhora na degradação da xilana, quando comparado ao fungo mutualista de *M. goeldii*, representante da forma de agricultura basal.

O fungo *L. gongylophorus* isolado expressou um maior número de enzimas celulolíticas, hemicelulolíticas, pectinolíticas e amilolíticas quando comparado ao

jardim de *A. subterraneus*. Essa variação no perfil enzimático evidencia uma plasticidade dos jardins de fungo já observado por Khadempour et al. (2016) que estudaram a plasticidade metabólica em ninhos de *Atta cephalotes* e demonstraram que o jardim de fungo possui a capacidade de alterar seu perfil enzimático em resposta a diferentes substratos vegetais, dando preferência para a digestão de um substrato menos recalcitrante e de mais fácil digestão. Diferentes estudos de degradação da parede vegetal em diferentes setores do jardim de fungo apontam para uma plasticidade enzimática dentro do próprio ninho, uma vez que para cada etapa de degradação do substrato vegetal um conjunto distinto de enzimas é expresso (MOLLER et al., 2011, SCHIØTT et al., 2008, GRELL et al., 2013, AYLWARD et al., 2013). Nossos resultados demonstram que *L. gongylophorus* apresentou perfil enzimático generalista e versátil capaz de se adaptar a diferentes tipos de substratos.

Esse resultado é consistente com achado de Schultz et al. (2015), que descreveram o primeiro caso do fungo *L. gongylophorus* sendo cultivado por uma população de attineas basais da espécie *Apterostigma megacephala*.

Seal e Tschinkel (2007) realizaram um experimento de troca de cultivares, no qual colônias de *Trachymyrmex septentrionalis* tiveram seus cultivares substituídos por cultivares de *Atta texana* (*L. gongylophorus*). Seal e Tschinkel (2007) observaram que o *L. gongylophorus* se adaptou muito bem e não alterou o desempenho das colônias de *Trachymyrmex septentrionalis*, apesar do tipo de substrato disponibilizado pelas formigas (fezes de insetos e estames de flores invés de folhas frescas e flores). Além disso, quando disponibilizados diferentes tipos de substratos para os cultivares, *L. gongylophorus* se mostrou um fungo generalista, crescendo em diferentes tipos de substratos, ao contrário do cultivar de *T. septentrionalis*, que apresentou um melhor crescimento quando provido dos substratos geralmente fornecidos pela sua respectiva formiga mutualista, não crescendo bem quando providos de pedaços de flores e folhas frescas.

## CONCLUSÕES

Nossos resultados demonstram que:

1. O fungo *Leucoagaricus gongylophorus*, mutualista das formigas cortadeiras, quando isolado em laboratório expressou uma diversidade de enzimas CAZy bem maior do que os jardins de fungos.
2. A análise dos transcritos CAZy sugere que todos os materiais estudados, exceto o jardim de *Apterostigma* sp., expressaram as enzimas necessárias para a degradação de celulose. O jardim de *Apterostigma* sp., aparentemente, possui um sistema celulolítico limitado a degradação da celulose do tipo amorfa.
3. Todos os materiais analisados, com exceção do jardim de *Apterostigma* sp. apresentaram um potencial enzimático para a degradação de polímeros pécticos. O jardim de *Apterostigma* sp. praticamente não expressou enzimas para a degradação de pectina.
4. *L. gongylophorus* e o fungo mutualista de *Mycocepurus goeldii* apresentaram um potencial enzimático para a degradação do amido; o jardim de *Acromyrmex subterraneus* apresentou uma deficiência no metabolismo do amido; o jardim de *Apterostigma* sp. não expressou qualquer enzima amilolítica.
5. Nossos resultados sugerem que *L. gongylophorus* não sofreu perda na capacidade de degradar polissacarídeos recalcitrantes de parede celular ao longo da sua história evolutiva. Pelo contrário, *L. gongylophorus* apresentou um melhor potencial para a degradação da xilana e xiloglucana quando comparado ao fungo mutualista de *M. goeldii*, representante da forma de agricultura basal.
6. A diferença no número de enzimas CAZy observadas entre o fungo *L. gongylophorus* isolado e o jardim de *A. subterraneus* evidencia uma flexibilidade metabólica em resposta ao tipo de substrato utilizado pelo fungo.
7. A comparação dos perfis enzimáticos dos três grupos atíneos apontou uma evolução metabólica relacionada com a desconstrução da parede vegetal que parte de um sistema pleiomórfico limitado à degradação parcial de xilana, xiloglucana e celulose, no jardim de *Apterostigma* sp., passando por um sistema menos derivado, voltado para completa degradação da celulose e degradação parcial dos polímeros pécticos hemicelulósicos e do amido, no fungo mutualista de *M. goeldii* e culminando num sistema derivado semelhante ao sistema basal,

porém com uma melhora na degradação dos polímeros xilana e xilogalacturonana.

8. Entre todos os materiais analisados o fungo *L. gongylophorus* isolado apresentou um sistema enzimático mais completo para a degradação da biomassa vegetal, sendo portanto o microrganismo mais promissor para a produção biotecnológica de açúcares fermentáveis.

## REFERÊNCIAS

- ABASOLO, W.; EDER, M.; YAMAUCHI, K.; OBEL, N.; REINECKE, A.; NEUMETZLER, L.; DUNLOP, J. W.; MOUILLE, G.; PAULY, M.; HÖFTE, H.; BURGERT, I. Pectin may hinder the unfolding of xyloglucan chains during cell deformation: implications of the mechanical performance of *Arabidopsis* hypocotyls with pectin alterations. **Mol Plant**, v. 2, p. 990-999, 2009.
- ABRIL, A. B.; BUCHER, E. H. Evidence that the fungus cultured by leaf-cutting ants does not metabolize cellulose. **Ecology Letters**, v. 5, p. 325-328, 2002.
- ADEMARK, P.; VARGA, A.; MEDVE, J.; HARJUNPÄÄ, V.; DRAKENBERG, T.; TJERNELD, F.; STÅLBRAND, H. Softwood hemicellulose-degrading enzymes from *Aspergillus niger*. Purification and properties of a  $\beta$ -mannanase. **Journal of Biotechnology**, v. 63, p. 199-210, 1998.
- AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. **Quim. Nova.**, v. 34, p. 1729-1738, 2011.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D.J. Basic Local Alignment Search Tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- ALVES-PRADO, H. F.; PAVEZZI, F. C.; LEITE, R. S. R.; OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L. D.; DASILVA, R. Screening and Production Study of Microbial Xylanase Producers from Brazilian Cerrado. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, p. 333-346, 2010.
- ANDERSON, I. C.; CAMPBELL, C. D.; POSSER, J. I. Potential bias of fungal 18S rDNA and internal transcribed spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil. **Environmental Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 36-47, 2003b.
- ANTRANIKIAN, G.; RUDIGER, A.; CANGANELLA, F.; KLINGEBERG, M.; SUNNA, A. Biodegradation of polymers at temperatures up 130-degrees-C. **J. Macromol. Sc. Pure and Appl. Chem.** V. 32, p. 661-669, 1995.
- ARAKANE, Y.; MUTHUKRISHNAN, S. Insect chitinase and chitinase-like proteins. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 2, p. 201-216, 2010.
- AYLWARD, F. O.; BURNUM-JOHNSON, K. E.; TRINGE, S. G.; TEILING, C.; TREMMEL, D. M.; MOELLER, J. A.; SCOTT, J. J.; BERRY, K. W.; PIEHOWSKI, P. D.; NICORA, C. D.; MALFATTI, S. A.; MONROE, M. E.; PURVINE, S. O.; GOODWIN, L. A.; SMITH, R. D.; WEINSTOCK, G. M.; GERARDO, N. M.; SUEN, G.; LIPTON, M. S.; CURRIE, C. C. *Leucoagaricus gongylophorus* produces diverse enzymes for the degradation of recalcitrant plant polymers in leaf-cutter ant fungus gardens. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 79, n. 12, p. 3770-3778, 2013.

BACCI, M. JR.; 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.

BACCI, M. JR.; 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**, v. 67, p. 383-386, 1995.

BACCI, M. JR.; 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**, v. 67, p. 383-386, 1995.

BACCI, M. JR. Formigas como modelo de estudo em biologia molecular. **Biológico**, v. 69, p. 173- 176, 2007.

BACCI, M. JR.; BUENO, O. C.; RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F. C.; SOMERA, A. F.; SILVA, A. A metabolic pathway assembled by enzyme selection may support herbivory of leaf-cutter ants on plant starch. **Journal of Insect Physiology**. Oxford, v. 59, p. 525-531, 2013.

BALDRIAN P. Fungal laccases occurrence and properties. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, p. 215-242, 2006.

BATTAGLIA, E., BENOIT, I., VAN DEN BRINK, J., WIEBENGA, A., COUTINHO, P. M., HENRISSAT, B., DE VRIES, R. P. Carbohydrate-active enzymes from the zygomycete fungus *Rhizopus oryzae*: a highly specialized approach to carbohydrate degradation depicted at genome level. **BMC Genomics**, V. 12, p. 38. 2011.

BAYER, E. A.; LAMED, R. The cellulose paradox: pollutant par excellence and/or a reclaimable natural resource? **Biodegradation**, v. 3, n. 2-3, p. 171-188, 1992.

BENOIT, I.; COUTINHO, P.M.; SCHOLS, H.A.; GERLACH, J.P.; HENRISSAT, B.; DE VRIES, R.P. Degradation of different pectins by fungi: correlations and contrasts between the pectinolytic enzyme sets identified in genomes and the growth on pectins of different origin. **BMC Genomics**, v.13. p.321-332, 2012.

BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. **Trends Biotechnol**, v. 3, p. 286-290, 1985.

BIELY, P.; MASTIHUBOVA, M.; TENKANEN, M.; EYZAGUIRRE, J.; LI, X. L.; VRSANSKA, M. Action of xylan deacetylating enzymes on monoacetyl derivatives of 4-nitrophenyl glycosides of beta-D-xylopyranose and alpha-L-arabinofuranose. **J Biotechnol**, v. 151, n. 1, p. 137-142, 2011.

BOLTON, B. An online catalog of the ants of the world. Disponível em: <http://antcat.org>. Acesso em: 10 jun. 2017.

BOMAR, L.; MALTZ, M.; COLSTON, S.; GRAF, J. Directed culturing of microorganisms using metatranscriptomics. **mBio**, v. 2, p.11-12, 2011.

BOUCK, A.; VISION, T. The molecular ecologist's guide to expressed sequence tags. **Mol Ecol**, v. 16, n. 5, p. 907-24, 2007.

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.

BRETT, C.; WALDRON, K. **Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls**. 2<sup>a</sup> ed. Cambridge: Chapman & Hall Books, 255 p, 1996.

BROWN, C. T.; HOWE, A.; ZHANG, Q.; PYRKOSZ, A. B.; BROM, T. H. A ReferenceFree Algorithm for Computational Normalization of Shotgun Sequencing Data. **arXiv: 1203.4802 [q-bio.GN]**. 2012.

BROWNLEADER, M. D.; JACKSON, P.; MOBASHERI, A.; PANTELIDES, A. T.; SUMAR, S.; TREVAN, M.; DEY, P. M. Molecular aspects of cell wall modifications during fruit ripening. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 39, p. 149-164, 1999.

BRUMMELL, D. A.; HARPSTER, M. Cell wall metabolism in fruit softening and quality members during growth and ripening of tomato fruit. **Plant Molecular Biology**, New York, v. 39, p. 311-340, 2001.

BUCKERIDGE, M. S.; ROCHA, D. C.; REID, J. S. G.; DIETRICH, S. M. C. Xyloglucan structure and post-germinative metabolism in seeds of *Copaifera langsdorffii* from savanna and forest populations. **Physiologia Plantarum**, v.86, p.145-151, 1992.

BUCKERIDGE, M. S.; PANEGASSI, V. R.; DIETRICH, S. M. C. Storage carbohydrate mobilization in seeds of *Dimorphandra mollis* Benth. (Leguminosae) following germination. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 18, p. 171-175, 1995

BUCKERIDGE, M. S.; TINÉ, M. A. S.; SANTOS, H. P.; LIMA, D. U. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes. Estrutura, metabolismo, funções e aspectos. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, v.12 (Edição Especial), p.137-162, 2000.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, W. D. dos; SOUZA, A. P. As rotas para o etanol celulósico no brasil. In: CORTEZ, L. A. B. (Coord.). **Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade**. São Paulo: Editora Blucher, 2010. p. 365-380.

CAFFALL, K. H.; MOHNEN, D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 344, p. 1879-1900, 2009.

CAMARERO, S.; BOCKLE, B.; MARTINEZ, M. J.; MARTINEZ, A. T. Manganese-mediated lignin-degradation by *Pleurotus pulmonarius*. **Appl Environ Microbiol**, v. 62, p. 1070-1072, 1996.

CANTAREL, B. L.; COUTINHO, P. M.; RANCUREL, C.; BERNARD, T.; LOMBARD, V.; HENRISSAT, B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert

resource for glycogenomics. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 37, p. D233–D238, 2009.

CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **The Plant Journal**, Oxford, v. 3, p.1-30, 1993.

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

CARREIRO, S. C.; PAGNOCCA, F. C.; BACCI, M. JR; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; MIDDELHOVEN, W. J. Occurrence of killer yeasts in leaf-cutting ant nests. **Folia Microbiologica**, Praga, v. 47, n. 3, p. 259-262, 2002.

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**, London, v. 54, n. 5, p. 1891-1894, 2004.

CARVALHO, C. M. L.; AIRES-BARROS, M. R.; CABRAL, J. M. S. Cutinase: from molecular level to bioprocess development. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 66, p. 17–34, 1999.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2191–2195, 2009.

CARVALHO, M. C. D. G.; SILVA, D. C. G. Next generation DNA sequencing and its applications in plant genomics. **Ciência Rural**, v. 40, n. 3, p. 735-744, 2010.

CASSAB, G.I.; VARNER, J.E. Cell wall proteins. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.39, p.321-353, 1988.

CASTRO, A. M. DE; PEREIRA JÚNIOR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v.33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CAUFRIER, F.; MERTINOU, A.; DUPONT, C.; BOURIOTIS, V. Carbohydrate esterase family 4 enzymes:substrate specificity. **Carbohydrate Research**, v.338, p. 687-692, 2003.

CHAVEZ MONTES, R.A.; RANOCHA, P.; MARTINEZ, Y.; MINIC, Z.; JOUANIN, L.; MARQUIS, M.; SAULNIER, L.; FULTON, L.M.; COBBETT, C.S.; BITTON, F.; RENOU, J.P.; JAUNEAU, A.; GOFFNER, D. Cell wall modifications in Arabidopsis plants with altered  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase activity. **Plant Physiol**, v. 147, p. 63-77, 2008.

CHERRETT, J. M. History of the leaf-cutting ant problems. In: LOFGREN, C.S.; VANDER MEER, R. K. editors. **Fire ants and leaf-cutting ants: biology and management**. Boulder: West View Press, 1986. p. 10-17.

CHERRETT, N. D.; POWELL, R. J.; STRADLING, D. J. The mutualism between leaf-cutting ants and their fungus. In: WILDIND, N.; COLLINS, N. M.; HAMMOUND, P. M.; WEBBER, J. F. (Eds.). **Insect fungus interactions**. Londres: Academic Press. 1989. p.93-120.

CHONG, S. L.; BATTAGLIA, E.; COUTINHO, P. M.; HENRISSAT, B.; TENKANEN, M.; DE VRIES, R. P. The alpha-glucuronidase Agu1 from *Schizophyllum commune* is a member of a novel glycoside hydrolase family (GH115). **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 90, n. 4, p. 1323–1332, 2011.

COHEN, R.; SUZUKI, M. R.; HAMMEL, K. E. Processive endoglucanase active in crystalline cellulose hydrolysis by the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. **Appl Environ Microbiol**, v. 71, p. 2412–7, 2005.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 3–23, 2005.

COUTINHO, P.M., ANDERSEN, M.R., KOLENOVA, K., VANKUYK, P.A., BENOIT, I., GRUBEN, B.S., TREJO-AGUILAR, B., VISSER, H., VAN SOLINGEN, P., PAKULA, T., SEIBOTH, B., BATTAGLIA, E., AGUILAR-OSORIO, G., DE JONG, J.F., OHM, R.A., AGUILAR, M., HENRISSAT, B., NIELSEN, J., STALBRAND, H., DE VRIES, R.P. Postgenomic insights into the plant polysaccharide degradation potential of *Aspergillus nidulans* and comparison to *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*. **Fungal genetics and biology**, v. 46, p. S161–S169, 2009.

CRESTINI, C.; MELONE, F.; SALADINO, R. Novel multienzyme oxidative biocatalyst for lignin bioprocessing. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 5071-5078, 2011.

CROUCHER, N. J.; THOMSON, N. R. Studying bacterial transcriptomes using RNA-seq. **Curr Opin Microbiol**, v. 13, n. 5, p. 619-24, 2010.

CURRIE, C. R.; SCOTT, J. A.; SUMMBERBELL, R. C.; MALLOCH, D. Fungus-growing ants use antibiotics-producing bacteria to control garden parasites. **Nature**, v. 398, p. 701-704, 1999.

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

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

DAHER, F. B.; BRAYBROOK, S. A. How to let go: pectin and plant cell adhesion. **Front Plant Sci**, v. 6 p. 523, 2015.

- DAHIYA, N.; TEWARI, R.; HOONDAL, G. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, n. 6, p. 773-782, 2006.
- DAMON, C.; LEHEMBRE, F.; OGER-DESFEUX, C.; LUIS, P.; RANGER, J.; FRAISSINET-TACHET, L.; MARMEISSE, R. Metatranscriptomics Reveals the Diversity of Genes Expressed by Eukaryotes in Forest Soils. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, p. e28967, 2012.
- DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; SYED, T. A.; QIN, W. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. **International Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 1, n. 1, p. 36-50, 2010.
- DE FINE LICHT, H.; BOOMSMA, J. J.; TUNLID, A. Symbiotic adaptations in the fungal cultivar of leaf-cutting ants. **Nature Communications**, New York, v. 5, n. 5675, 2014.
- DE MORAES, L. M. P. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Editora: Legis Summa, Ribeirão Preto, cap.13, p. 223-241, 2004.
- DE VRIES, R. P.; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, p. 497- 522, 2001.
- DELLA LUCIA, T.M.C. **As formigas cortadeiras**. Viçosa: Folha de Viçosa, 1993. 262p.
- DELLA LUCIA, T. M. C. **Formigas-cortadeiras: Da bioecologia ao manejo**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2011. 421 p.
- DIENES, D.; EGYHÁZI, A.; RÉCZEY, K. Treatment of recycled fiber with *Trichoderma* cellulases. **Industrial Crops and Products**, v. 20, p. 11-21, 2004.
- DODD, D.; CANN, I. O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **GCB Bioenergy**, v. 1, p. 2-17, 2009.
- DOMINGUEZ-PUIGJANER, E.; LLOP, I.; VENDRELL, M.; PRAT, S. A cDNA clone highly expressed in ripe banana fruit shows homology to pectate lyases. **Plant Physiology**, v. 114, p. 1071-1076, 1997.
- DUNKEL, M. P. H.; AMADO, R. Analysis of endo-(1->5)-alpha-L-arabinanase degradation patterns of linear (1->5)-alpha-L-arabino-oligosaccharides by highperformance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. **Carbohydr. Res**, v. 268 n. 1, p. 151-158, 1995.
- EGMOND, M. R.; VLIEG, J. *Fusarium solani* pisi cutinase. **Biochimie**, v.82, p. 1015-1021, 2000.

ERIKSSON, K. E. L.; BLANCHETTE, R. A.; ANDER, P. Biodegradation of lignin. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components, **Springer-Verlag**, Berlin, 407p, 1990.

ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M. T.; CAMPARGUE, C.; MAZAU, D. The response of plant cell wall hydroxyprolin-rich glycoproteins to microbial pathogens and their elicitors. In: DATTA, S. K.; MUTHUKRISHNAN, S. **Pathogenesis-Related Proteins in Plants**. CRC Press, Dordrecht, The Netherlands. 1999. p. 157-170.

ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M. T.; BOUDART, G.; DUMAS, B. Cell-wall-degrading enzymes, inhibitory proteins, and oligosaccharides participate in the molecular dialogue between plants and pathogens. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 157–163, 2000.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome research**, v. 8, n. 3, p. 175–185, 1998.

FARINAS, C. S. A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação. **Embrapa Instrumentação Agropecuária**, p.13, 2011.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 613 p, 1989.

FLEURI, L. F.; SATO, H. H. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 871, 2005.

FRESHOUR, G.; CLAY, R. P.; FULLER, M. S.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. G.; HAHN, M. G. Developmental and tissue-specific structural alterations of the cellwall polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* roots. **Plant Physiology**, v. 110, p. 1413–1429, 1996.

FRY, S. C.; MILLER, J. G. Toward a working model of the growing plant cell-wall: Phenolic cross-linking reactions in the primary cell-walls of dicotyledons. In: LEWIS, N. G. I.; PAICE, M. G. (Ed.). **Plant cell-wall polymers: biogenesis and biodegradation**. Washington, D. C: American Chemical Society, 1989. p. 33-46.

FRY, S.C. Polysaccharide: modifying enzymes in the plant cell wall. **Annual Review of Plant Physiological and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.46, p.497-520, 1995.

FU, L.; NIU, B.; ZHU, Z.; WU, S.; LI, W. CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. **Bioinformatics** (Oxford, England), v. 28, n. 23, p. 3150–3152, 2012.

GAMAUF, C.; MARCHETTI, M.; KALLIO, J.; PURANEN, T.; VEHEMAANPERÄ, J.; ALLMAIER, G.; KUBICEK, C. P.; SEIBOTH, B. Characterization of the bga1-encoded glycoside hydrolase family 35  $\beta$ - galactosidase of *Hypocrea jecorina* with galacto- $\beta$ -d-galactanase activity. **FEBS Journal**, v. 274, n. 7, p. 1691-1700, 2007.

- GAO, D. H.; UPPUGUNDLA, N.; CHUNDAWAT, S. P. S.; YU, X. R.; HERMANSON, S.; GOWDA, K. Hemicellulases and auxiliary enzymes for improved conversion of lignocellulosic biomass to monosaccharides. **Biotechnol. Biofuels**, v. 4, p. 11, 2011.
- GARG, G. A. S.; KAUR, A. R.; KAUR, J.; MAHAJAN, R. Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. **Biotechnology**, v. 6, n.1, p. 47, 2016.
- GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-ŁUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4775-4800, 2010.
- GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTINS, N.; DA SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. *Química Nova*, v. 30, n. 1, p. 136-145, 2007.
- GOSALBES M. Metatranscriptomic approach to analyze the functional human gut microbiota. **PLoS One**, v. 6, p. e17447, 2011.
- GOTTSCHALK, L. M. F.; OLIVEIRA, R. A.; BON, E. P. D. S. Cellulases, xylanases,  $\beta$ -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. **Biochemical Engineering Journal**, v. 51, p. 72-78, 2010.
- GÖTZ, S.; GARCÍA-GÓMEZ, J. M.; TEROL, J.; WILLIAMS, T. D.; NAGARAJ, S. H.; NUEDA, M. J.; ROBLES, M.; TALÓN, M.; DOPAZO, J.; CONESA, A. Highthroughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. **Nucleic acids research**, v. 36, n. 10, p. 3420-3435, 2008.
- GRABHERR, M. G.; HAAS, B. J.; YASSOUR, M.; LEVIN, J. Z.; THOMPSON, D. A.; AMIT, I.; ADICONIS, X.; FAN, L.; RAYCHOWDHURY, R.; ZENG, Q.; CHEN, Z.; MAUCELI, E.; HACOEN, N.; GNIRKE, A. RHIND, N.; DI PALMA, F.; BIRREN, B. W.; NUSBAUM, C.; LINDBLAD-TOH, K.; FRIEDMAN, N.; REGEV, A. Full-length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, v. 29, n. 7, p. 644-652, 2011.
- GRELL, M. N.; LINDE, T.; NYGAARD, S.; NIELSEN, K. L.; BOOMSMA, J. J.; LANGE, L. The fungal symbiont of *Acromyrmex* leaf-cutting ants expresses the full spectrum of genes to degrade cellulose and other plant cell wall polysaccharides. **BMC Genomics**, v. 14, p. 928, 2013.
- GUMMADI, S. N.; PANDA, T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases – a review. **Process Biochemistry**, v.38, p.987-996, 2003.
- GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1599-1616, 2003.
- GUZMÁN-MALDONADO, H.; PAREDES-LÓPEZ, O. Amylolytic enzymes and products derived from starch: a review. **Critical Reviews Food Science Nutrition**, v. 35, p. 373-403, 1995.

HASHIMOTO H. Recent structural studies of carbohydrate-binding modules. **Cell Mol Life Sci**, v. 63, n. 24, p. 2954-67, 2006.

HANSEN, K. D.; BRENNER, S. E.; DUDOIT, S. Biases in Illumina transcriptome sequencing caused by random hexamer priming. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 12, p. e131–e131, 2010.

HENRISSAT, B.; DAVIES, G. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. **Curr Opin Struct Biol**, v. 7, n. 5, p. 637–644, 1997.

HOFRICHTER, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme Microbiol Technology**, v. 30, p. 454 – 466, 2002.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The Ants**. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press, 1990. 732 p.

HORN, S. J. et al. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnol Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 45, 2012.

HU, J.; ARANTES, V.; PRIBOWO, A.; SADDLER, J. N. The synergistic action of accessory enzymes enhances the hydrolytic potential of a “cellulase mixture” but is highly substrate specific. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 112, 2013.

HUBER, D. J. The role of cell wall hydrolases in fruit softening. **Horticultural reviews**, v.5, p.169-219, 1983.

HUBER, D. J.; O'DONOGHUE, E. M. Polyuronides in avocado (*Persea americana* L.) and tomato fruits exhibit markedly different patterns of molecular weight downshifts during ripening. **Plant Physiology**, v. 102, p. 473-488, 1993.

HUY, N. D.; NGUYEN, C. L.; SEO, J. W.; KIM, D. H.; PARK, S. M. Putative endoglucanase PcGH5 from *Phanerochaete chrysosporium* is a  $\beta$ -xylosidase that cleaves xylans in synergistic action with endo-xylanase. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 119, p. 416-20, 2014.

Illumina. **An Introduction to Next Generation Sequencing Technology**. Disponível em  
<[http://www.illumina.com/Documents/products/Illumina\\_Sequencing\\_Introduction.pdf](http://www.illumina.com/Documents/products/Illumina_Sequencing_Introduction.pdf)>

IKEHATA, K.; BUCHANAN, I. D.; SMITH, D. W. Recent Developments in the Production of Extracellular Fungal Peroxidases and Laccases for Waste Treatment, **Journal of Environmental Engineering and Science**, v. 03, p. 1-19, 2004.

JANUSZ, G.; KUCHARZYK, K. H.; PAWLIK, A.; STASZCZAK, M.; PASZCZYNSKI, A. J. Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: Gene expression and regulation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, p. 1– 12, 2013.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2931-2944, 2005.

JEŠOVNIK, A.; GONZÁLEZ, V. L.; SCHULTZ, T. R. Phylogenomics and divergence dating of fungus-farming ants (Hymenoptera: Formicidae) of the genera *Sericomyrmex* and *Apterostigma*. *PLoS One*, São Francisco, v. 11, n 7, p. e0151059, 2016.

JOVANOVIĆ, I.; MAGNUSON, K. J.; COLLART, F.; ROBERTSE, B.; ADNEY, S. W.; HIMMEL, E. M.; BAKER, E. S. Fungal glycoside hydrolases for saccharification of lignocellulose: outlook for new discoveries fueled by genomics and functional studies. **Cellulose**, v.16, p.687–697, 2009.

KANG, H. C.; LEE, S. H. Characteristics of an alpha-galactosidase associated with grape flesh. **Phytochemistry**, v. 58, p. 213–219, 2001.

KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 215-227, 2001.

KELLNER, H.; LUIS, P.; PORTETELLE, D.; VANDENBOL, M. Screening of a soil metatranscriptomic library by functional complementation of *Saccharomyces cerevisiae* mutants. **Microbiol Res**, v. 166, n. 5, p. 360-8, 2011.

KHADEMPOUR, L.; BURNUM-JOHNSON, K. E.; BAKER, E. S.; NICORA, C. D.; WEBB-ROBERTSON, B. M.; WHITE, III. R. A.; MONROE, M. E.; HUANG, E. L.; SMITH, R. D.; CURRIE, C. R. The fungal cultivar of leaf-cutter ants produces specific enzymes in response to different plant substrates. **Molecular Ecology**, v. 25, n. 22, p. 5795-5805, 2016.

KIRK, T. K.; CHANG, H. Potential applications of bio-lignolytic systems. **Enzyme Microbial. Technology**, v. 3, p. 189-196, 1981.

KIRK, T. K.; CULLEN, D. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. In: YOUNG, R.; AKHTAR, M. **Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry**. New York: John Wiley and Sons, 1998. p. 273 – 308.

KNOX, J. P. Revealing the structural and functional diversity of plant cell walls. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, p. 308–313, 2008.

KOOIJ, P. W.; PULLENS, J. W. M.; BOOMSMA, J. J.; SCHIØTT, M. Ant mediated redistribution of a xyloglucanase enzyme in fungus gardens of *Acromyrmex echinator*. **BMC Microbiology**, v. 16, p. 81, 2016.

KOSSMANN, J.; LLOYD, J. Understanding and influencing starch biochemistry. **Crit Rev Plant Sci**, v.19, n. 3, p.171–226, 2000.

- KOST, C.; LAKATOS, T.; BÖTTCHER, I.; ARENDHOLZ, W. R.; REDENBACH, M.; WIRTH, R. Non-specific association between filamentous bacteria and fungus-growing ants. **Naturwissenschaften**, v. 94, p. 821–8, 2007.
- KREMnický, L.; BIELY, P.  $\beta$ -Mannanolytic system of *Aureobasidium pullulans*. **Arch Microbiol**, v. 167, p. 350-355. 1997.
- KUHAD, R.C.; SINGH, A.; ERIKSSON, K. E.L. Microorganism and enzyme involved in the degradation of plant Fiber cell walls. In: ERIKSSON, K. E. L. (Ed.), **Biotechnology in the Pulp and Paper Industry**. Advance. Bioch. Eg. Biotech., 1997, p.45-125.
- KUMAR, R.; WYMAN, C. E. Effect of xylanase supplementation of cellulase on digestion of corn stover solids prepared by leading pretreatment technologies. **Bioresour. Technol**, v. 100, p. 4203–4213, 2009.
- LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods**, v. 9, p. 357-359, 2012.
- LASZLO, H.; BASSO, L. M.; COELHO, C. M. L. **Química de Alimentos**, Nobel, São Paulo, p.98, 1986.
- LATTKE, J. E. Revisión del género *Apterostigma* Mayr (Hymenoptera: Formicidae). **Arquivos de Zoologia**, v. 34, n. 5, p. 121-221, 1997.
- LEAL, I. R.; OLIVEIRA, P. S. Foraging ecology of attine ants in a Neotropical savanna: seasonal use of fungal substrate in the cerrado vegetation of Brazil. **Insectes Sociaux**, v. 47, p. 376–382, 2000.
- LEONEL, M.; CEREDA, M. P. Caracterização físico-química de algumas tuberosas amiláceas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, p. 65-69, 2002.
- LEVASSEUR, A.; DRULA, E.; LOMBARD, V.; COUTINHO, P. M.; HENRISSAT, B. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. **Biotechnol Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 41, 2013.
- LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 449-467, 2012.
- LIM, L. H.; MACDONALD, D. G.; HILL, G. A. Hydrolysis of starch particles using immobilized barley  $\alpha$ -amylase. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, n.1 p.53-62. 2003.
- LIN, N.; DUFRESNE, A. Nanocellulose in biomedicine: current status and future prospect. **European Polymer Journal**, v. 59, p.302–325, 2014.

LITTLE, A. E. F.; CURRIE, C. R. Symbiotic complexity: discovery of a fifth symbiont in the attine ant-microbe symbiosis. **Biol Lett**, v. 22, p. 501-504, 2007.

LIU, Y. S.; BAKER, J. O.; ZENG, Y.; HIMMEL, M. E.; HAAS, T.; DING, S. Y. Cellobiohydrolase hydrolyzes crystalline cellulose on hydrophobic faces. **J Biol Chem**, v. 286, n. 1, p. 11195-11201, 2011.

LIU, D.; ZHANG, R.; YANG, X.; ZHANG, Z.; SONG, S.; MIAO, Y.; SHEN, Q. Characterization of a thermostable  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus fumigatus* Z5, and its functional expression in *Pichia pastoris* X33. **Microbial Cell Factories**, v. 11, p. 25, 2012.

LOMBARD, V. et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 42, p. 490-495, 2014.

LOPEZ-MONDÉJAR, R.; ZÜHLKE, D.; VĚTROVSKÝ, T.; BECHER, D.; RIEDEL, K.; BALDRIAN, P. Decoding the complete arsenal for cellulose and hemicellulose deconstruction in the highly efficient cellulose decomposer *Paenibacillus* O199. **Biotechnol Biofuel**, v. 9 n. 104, p. 1-12, 2016.

LOUWS, F. J.; RADEMAKER, J. L. W.; DE BRUIJN, F. J. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: Diversity, Detection, and Disease Diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, v. 37, p. 81-125, 1999.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

MACIEL, M. J. M.; CASTRO E SILVA, A.; RIBEIRO, H. C. T. Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: A review. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 13p. 1-12, 2010.

MARCUS, S. E.; VERHERTBRUGGEN, Y.; HERVÉ, C.; ORDAZ-ORTIZ, J. J.; FARKAS, V.; PEDERSEN, H. L.; WILLATS, W. G. T.; KNOX, J. P. Pectic homogalacturonan masks abundant sets of xyloglucan epitopes in plant cell walls. **BMC Plant Biol**, v. 8, p. 60. 2008.

MARTIN, M. M.; WEBER, N. A. The cellulose-utilizing capability of the fungus cultured by the attini ant *Atta colombica* tonsipes. **Ann Entomol Soc Am**. Lanham, MD, v. 62, n. 6, p. 1386-7, 1969.

MARTIN, M. M. The Biochemical Bases of the Fungus-Attini Ants Symbiosis. **Science**, Washington, v.169, p. 16-20, 1970.

MARTIN, M. M.; GIESELMANN, M. J.; MARTIN, J. S. Rectal Enzymes of Attine Ants. Alfa- Amilase and Chitinase. **J Insect Physiol**, Great Britain, UK, v. 19, p. 1409-1416, 1973.

MARTIN, M. M.; BOYD, N. D.; GIESELMANN, M. J.; SILVER, R. G. Activity of faecal fluid of leaf-cutting ant towards plant cell wall polysaccharides. **J Insect Physiol**, Great Britain, UK, v. 21, p.1887-92, 1975.

MARTÍNEZ, A.T. Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 425-444, 2002.

MASTER, E. R.; ZHENG, Y.; STORMS, R.; TSANG, A.; POWLOWSKI, J. A xyloglucanspecific family 12 glycosyl hydrolase from *Aspergillus niger*: Recombinant expression, purification and characterization. **Biochem J**, v. 411, p. 161–170, 2008.

MATHEWSON, P. R. **Enzymes**. St. Paul: Eagan Press, 1998.

MATSUZAWA, T.; KANEKO, S.; YAOI, K. Screening, identification, and characterization of a GH43 family  $\beta$ -xylosidase/ $\alpha$ -arabinofuranosidase from a compost microbial metagenome. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 21, p. 8943-8954, 2015.

MBA MEDIE, F.; DAVIES, G. J.; DRANCOURT, M.; HENRISSAT, B. Genome analyses highlight the different biological roles of cellulases. **Nat Rev Microbiol**, v. 10, p. 227–34, 2012.

MCCANN, M. C.; ROBERTS, K. Architecture of the primary cell wall. In: Lloyd, C. W. (ed.). **The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form**. Academic Press, London, 1991, p. 109-129.

MEDINA-SUÁREZ, R.; MANNING, K.; FLETCHER, J.; AKED, J.; BIRD, C.R.; SEYMOUR, G. B. Gene expression in the pulp of ripening bananas. **Plant Physiology**, v. 115, p. 453-461, 1997.

MEHDIABADI, N. J.; SCHULTZ, T. R. Natural history and phylogeny of the fungus-farming ants (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae: Attini). **Myrmecological News**, v. 13, p. 37-55, 2009.

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, 2012.

MENDES, T. D. **Atividade antimicrobiana de actinobactérias isoladas de formigas Attini (Hymenoptera: Formicidae)**. 2010. 94 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho - UNESP, Rio Claro, 2010.

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

MIKHEYEV, A. S.; MUELLER, U. G.; ABBOT, P. Comparative dating of attine ant and lepiotaceous cultivar phylogenies reveals coevolutionary synchrony and discord. **Am Nat**, v. 175, p. E126–E133, 2010.

- MIN, X. J.; BUTLER, G.; STORMS, R.; TSANG, A. OrfPredictor: predicting protein-coding regions in EST-derived sequences. **Nucleic Acids Res**, v. 1, p. 33, (2005).
- MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 3, p. 266-277, 2008.
- MÖLLER, A. Die Pilzgärten einiger südamerikanischer Ameisen. **Botanische Mitteilungen aus den Tropen**, Jena, v.6, p. 1–127, 1893
- MOREIRA, P. R.; DUEZ, C.; DEHARENG, D.; ANTUNES, A.; ALMEIDA-VARA, E.; FRERE, J. M.; MALCATA, F. X.; DUARTE, J.C. Molecular characterisation of a versatile peroxidase from a *Bjerkandera* strain. **Journal of Biotechnology**, v. 118, p. 339–352, 2005.
- MOREIRA NETO, S. L. **Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno**. 2006. Dissertação (Mestrado) Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2006.
- MORTIMER, J. C.; MILES, G. P.; BROWN, D. M.; ZHANG, Z.; SEGURA, M. P.; WEIMAR, T.; YU, X.; SEFFEN, K. A.; STEPHENS, E.; TURNER, S. R. et al. Absence of branches from xylan in *Arabidopsis* gux mutants reveals potential for simplification of lignocellulosic biomass. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, p. 17409–17414, 2010.
- 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, 2011.
- MUELLER, U. G. ; REHNER, S. A. ; SCHULTZ, T. R. The evolution of agriculture in ants. **Science**, v. 281, p. 2034-2038, 1998.
- MUELLER, U. G.; SCHULTZ, T. R.; CURRIE, C. R.; ADAMS, R. M. M.; MALLOCH D. The origin of the attine ant-fungus mutualism. **Q Rev Biol**, v. 76, n. 2, p. 169-97, 2001.
- MUELLER, U. G. et al. Coevolution between attine ants and actinomycete bacteria: A reevaluation. **Evolution**. Malden, USA, v. 62, n. 11, p. 2894 –912, 2008
- MUELLER, U. G.; RABELING, C. A breakthrough innovation in evolution. **Proc Natl Acad Sci**, v. 105, n. 14, p. 5287-5288, 2008.
- MUTTER, M.; COLQUHOUN, I. J.; SCHOLS, H. A.; BELDMAN, G., VORAGEN, A. G. J. Rhamnogalacturonase B from *Aspergillus aculeatus* is a rhamnogalacturonan  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1→4)- $\alpha$ -D-galactopyranosyluronide lyase. **Plant Physiology**, v. 110, p. 73-77, 1996.
- MUTTER, M.; RENARD, C. M. G. C.; BELDMAN, G.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J. Mode of action of RG-hydrolase and RG-lyase toward rhamnogalacturonan

oligomers: characterization of degradation products using RG-rhamnohydrolase and RG-galacturonohydrolase. **Carbohydrate Research**, v. 311, p. 155-164, 1998.

NAGAMOTO N. S. Microscopic evidence supports the hypothesis of high cellulose degradation capacity by the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. **J Biol Res**, v. 16, p. 308–12, 2011.

NAJAFI, M. F.; DEOBAGKAR, D.; DEOBAGKAR, D. Purification and characterization of an extracellular  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* AX20. **Protein Expression and Purification**, v. 41, p. 349–354, 2005.

NUTT, A.; SILD, V.; PETTERSSON, G.; JOHANSSON, G. Progress curves—a mean for functional classification of cellulases. **Eur J Biochem**, v. 258, n. 1, p. 200–206, 1998.

NYGAARD, S.; ZHANG, G.; SCHIØTT, M.; LI, C.; WURM, Y.; HU, H.; ZHOU, J.; JI, L.; QIU, F.; RASMUSSEN, M.; PAN, H.; HAUSER, F.; KROGH, A.; GRIMMELIKHUIJZEN, C. J. P.; WANG, J.; BOOMSMA, J. J. The genome of the leaf-cutting ant *Acromyrmex echinator* suggests key adaptations to advanced social life and fungus farming. **Genome Res**, v. 8, p. 1339–1348, 2011.

NYGAARD, S.; HU, H.; LI, C.; SCHIØTT, M.; CHEN, Z.; YANG, Z. et al. Reciprocal genomic evolution in the ant–fungus agricultural symbiosis. **Nat. Commun**, v. 7, p. 12233, 2016.

OWINO, W.; AMBUKO, J.; MATHOOKO, F. Molecular basis of cell wall degradation during fruit ripening and senescence. **Stewart Post-Harvest Rev**, v. 3, n. 3, p. 1–10, 2005.

PÄÄKKÖ, M. et al. Enzymatic hydrolysis combined with mechanical shearing and high pressure homogenization for nanoscale cellulose fibrils and strong gels. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 6, p. 1934–1941, 2007

PAGNOCCA, F.C.; SILVA, O. A; HEBLING-BERALDO, M. J.; BUENO, O. C.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C. Toxicity of sesame extracts to the symbiotic fungus of leaf cutting ants. **Bulletin of Entomological Research**, v. 80, p. 349-352, 1990.

PAGNOCCA, F. C.; CARREIRO, S. C.; BUENO, O. C.; SANT'ANNA, A.; CAPELARI, M. RAPD analysis of the sexual state and sterile mycelium of the fungus cultivated by the leafcutting ant *Aromyrmex hispidus fallax*. **Mycological Research**, Oxford, v. 105, n. 2, p. 173-176, 2001.

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

PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. **Enzyme Technology**. Editora: Springer, New Delhi , 742 p. 2006.

PAPINUTTI, V. L.; FORCHIASSIN, F. Modification of Malachite Green by Fomes sclerodermeus and reduction of toxicity to Phanerochaete chrysosporium. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 231, p. 205-209, 2004.

PATIL, R. S.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M. V. Chitinolytic enzymes: an exploration. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 7, p. 473-483, 2000.

PEDROLI, D. B.; MONTEIRO, A. C.; GOMES, E.; CARMONA, E. C. Pectin and pectinases: production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes. **The Open Biotechnology Journal**, v.3, p.9-18, 2009.

PELLOUX, J.; RUSTERUCCI, C.; MELLEROWICZ, E. J. New insights into pectin methylesterase 17 structure and function. **Trends in Plant Science**, v.12, n. 6, p. 267-277, 2007.

PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; DE LA RUBIA, T.; MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology**, v. 5, p. 53-63, 2002.

PILATZKE-WUNDERLICH, I.; NESSLER, C. L. Expression and activity of cell-walldegrading enzymes in the latex of opium poppy, *Papaver somniferum* L. **Plant Mol Biol**, v. 45, n. 5, p. 567-576, 2001.

PILNIK, W.; ROMBOUITS, F. M. Pectic enzymes. In: BIRCH, G. C.; BLAKEBROUGH, N.; PARKER, K. J. (Ed.). **Enzymes and food processing**. London: Applied Science Publishers, 1981, p.105-128.

POLIZELI, M. L.; RIZZATTI, A. C.; MONTI, R.; TERENCEI, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 67, n. 5, p. 577-91, 2005.

POLLET, A.; DELCOUR, J. A.; COURTIN, C. M. Structural determinants of the substrate specificities of xylanases from different glycoside hydrolase families. **Crit Rev Biotechnol**, v. 30, n. 3, p. 176-191, 2010.

POMPEU, G. B. **Comportamento enzimático de quatro fungos lignocelulóticos crescidos em bagaço e palha de cana-de-açúcar e exposto a duas concentrações de nitrogênio, visando a obtenção de etanol**. 2010. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2010.

POPPER, Z. A.; FREY, S. C. Widespread occurrence of a covalent linkage between xyloglucan and acidic polysaccharides in suspension-cultured angiosperm cells. **Annals of Botany**, v. 96, p. 91-99, 2005.

POPPER, Z. A.; FRY, S. C. Xyloglucan-pectin linkages are formed intraprotoplasmically, contribute to wall-assembly, and remain stable in the cell wall. **Planta**, v. 227, p. 781-794, 2008.

POPPER, Z. A. Evolution and diversity of green plant cell walls. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, p. 286–292, 2008.

PROSDOCIMI, F. **Introdução à Bioinformática** (2007). Disponível In: [http://www2.bioqmed.ufrj.br/prosdocimi/FProsdocimi07\\_CursoBioinfo.pdf](http://www2.bioqmed.ufrj.br/prosdocimi/FProsdocimi07_CursoBioinfo.pdf)

RABELING, C.; BROWN, J. M.; VERHAAGH, M. Newly discovered sister lineage sheds light on early ant evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 105, n. 39, p. 14913–14917, 2008.

RAVANAL, M. C.; CALLEGARI, E.; EYZAGUIRRE, J. Novel bifunctional alpha-Larabinofuranosidase/xylobiohydrolase (ABF3) from *Penicilium purpurogenum*. **Appl Environ Microbiol**, v. 76, n. 15, p. 5247–53, 2010.

RAYNER, A. D. M.; BODDY, L. **Fungal decomposition of wood: its biology and ecology**. Chichester: John Wiley & Sons, 1995. 587p.

REID, J. S. G.; BEWLEY, J. D. A dual role for the endosperm and its galactomannan reserves in the germinative physiology of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.), an endospermic leguminous seed. **Planta**, v. 147, p. 145–150, 1979.

REMM, M.; STORM, C. E.; SONNHAMMER, E. L. Automatic clustering of orthologs and inparalogs from pairwise species comparisons. **J Mol Biol**, v. 314, p. 1041–1052, 2001.

RICHARD, F. J.; MORA, P.; ERRARD, C.; ROULAND, C. Digestive capacities of leafcutting ants and the contribution of their fungal cultivar to the degradation of plant material. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 175, p. 297–303, 2005.

ROBERTS, P.; EVANS, S. **The Book of Fungi**, Ivy Press, Lewes, UK, 2013. 471 p.

RODOVALHO, C. M.; LYRA, M. L.; FERRO, M.; BACCI, M. JR. The mitochondrial genome of the leaf-cutter ant *Atta laevigata*: a mitogenome with a large number of intergenic spacers. **PLoS One**. v. 9, n. 5, e. 97117, 2014.

RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; PFENNING, L. H.; BACCI, M. JR. Assessment of microfungi in fungus gardens free of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 46, n. 2, p. 329–334, 2005.

RODRIGUES, A.; BACCI, M. JR.; MUELLER, U. G.; ORITZ, A.; PAGNOCCA, F. C. Microfungal “weeds” in the leafcutter ant symbiosis. **Microbial Ecology**, v. 56, p. 604–14, 2008.

RONHEDE, S.; BOOMSMA, J. J.; ROSENDAHL, S. Fungal enzymes transferred by leafcutting ants in their fungus gardens. **Mycological Research**, Cambridge, v. 108, n. 1, p. 101–106, 2004.

ROWELL, R. M. **Handbook of wood chemistry and wood composites**. Boca Raton: CRC, 487 p, 2005.

RUDD, S. Expressed sequence tags: alternative or complement to whole genome sequence? *Trends in Plant Science*, v. 8, n. 7, p. 321–329, 2003.

SAKAI, T.; SAKAMOTO, T.; HALLAERT, J.; VANDAMME, E. Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. *Advances Applied Microbiology*, v. 39, p. 213-294, 1993.

SANTOS, V. A.; DILLON, R. J.; DILLON, V. M.; REYNOLDS, S. E.; SAMUELS, R. I. Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *FEMS Microbial Letters*, v. 239, p. 319-323, 2004.

SANTOS, F. A.; DE QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L. Potencial da Palha de Cana-de-açúcar para Produção de Etanol. *Química Nova*, Viçosa, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. *Annual Reviews in Plant Biology*, v. 61, p. 263-289, 2010.

SEAL, J. N.; TSCHINKEL, W. R. Co-evolution and the superorganism: switching cultivars does not alter the performance of fungus-gardening ant colonies. *Functional Ecology*, v. 21, n. 5, p. 988–997, 2007.

SEYMOUR, G. B.; GROSS, K. C. Cell wall disassembly and fruit softening. *Postharvest News and Information*, Wallingford, v. 7, p. 45-52, 1996.

SHEN, Z.; MANNING, G.; REESE, J. C.; REECK, G. R. Pectin methylesterase from the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae): purification and characterization. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 29, p. 209-214, 1999

SCHIOTT, M.; DE FINE LICHT, H. H.; LANGE, L.; BOOMSMA, J. J. Towards a molecular understanding of symbiont function: identification of a fungal gene for degradation of xylan in the fungus gardens of leaf-cutting ants. *BMC Microbiology*, v. 8, n. 1, p. 40, 2008.

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, 2010.

SCHOLS, H.; GERAEDS, C.; SEARLE-VAN-LEEUVEN, M.; KOMELINK, F.; VORAGEN, A. Rhamnogalacturonase: A novel enzyme that degrades the hairy region of pectins. *Carbohydrate Research*, v. 206, p. 105-115, 1990.

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, 2008.

- SCHULTZ, T. R.; SOSA-CALVO, J.; LOPES, C. T.; MUELLER, U. G.; BACCI, M. JR.; VASCONCELOS, H. L. The most relictual fungus-farming ant species cultivates the most recently evolved and highly domesticated fungal symbiont species. **The American Naturalist**, Chicago, v.185, n.5, p.693-703, 2015.
- SHI, Y.; TYSON, G. W.; DE LONG, E. F. Metatranscriptomics reveals unique microbial small RNAs in the ocean's water column. **Nature**, v. 459, n. 7244, p. 266-269, 2009.
- SILVEIRA, R. L.; STOYANOV, S. R.; GUSAROV, S.; SKAF, M. S.; KOVALENKO, A. Plant biomass recalcitrance: effect of hemicellulose composition on nanoscale forces that control cell wall strength. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, p. 19048–19051, 2013.
- SILVA A.; BACCI M. JR.; BUENO O. C.; PAGNOCCA F. C.; HEBLING M. J. A. Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. **Journal of Insect Physiology**, v. 49, p. 307-313, 2003.
- SILVA, A.; RODRIGUES, A.; BACCI, M. JR.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C. Susceptibility of the ant-cultivated fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Agaricales: Basidiomycota) towards microfungi. **Mycopathologia**, v. 162, p. 115-119, 2006.
- SILVA, A.; BACCI, M.; PAGNOCCA, F.C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A. Production of Polysaccharidases in Different Carbon Sources by *Leucoagaricus gongylophorus* Müller (Singer), the Symbiotic Fungus of the Leaf-Cutting Ant *Atta sexdens* Linnaeus. **Current Microbiology**, v. 53, p. 68-71, 2006.
- 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, 2004.
- SIMÃO, F. A.; WATERHOUSE, R. M.; IOANNIDIS, P.; KRIVENTSEVA, E. V.; ZDOBNOV, E. M. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. **Bioinformatics**, v. 31 n. 19, p. 3210-3212, 2015.
- SIQUEIRA, C. G. S., BACCI Jr., 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, 1998.
- SMITH, L. G. Plant cell division: building walls in the right places. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 2, n. 1, p. 33-39, 2001.
- SOH, C. P.; ALI, Z. M.; LAZAN, H. Characterization of an alfa-galactosidase with potential relevance to ripening related texture changes. **Phytochemistry**, Oxford, v. 67, p. 242-254, 2006.

- SOMERA, A. F.; LIMA, A. M.; DOS SANTOS-NETO, A. J.; LANÇAS, F. M.; BACCI, M. JR. Leaf-cutter ant fungus gardens are biphasic mixed microbial bioreactors that convert plant biomass to polyols with biotechnological applications. **Appl Environ Microbiol**, v. 81, p. 4525– 4535, 2015.
- SOSA-CALVO, J.; SCHULTZ, T. R.; BRANDÃO, C. R. F.; KLINGENBERG, C.; FEITOSA, R. M.; RABELING, C.; BACCI, M. JR.; LOPES, C. T.; VASCONCELOS, H. L. *Cyatta abscondita*: Taxonomy, Evolution, and Natural History of a New Fungus-Farming Ant Genus from Brazil. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 11, p. e80498, 2013.
- SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology of microbial xilanases: enzymology, molecular biology and application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, p. 33-46, 2002.
- SUEN, G.; SCOTT, J. J.; AYLWARD, F. O.; ADAMS, S. M.; TRINGE, S. G.; PINTOTOMÁS, 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. C. An insect herbivore microbiome with high plant biomass-degrading capacity. **PLoS Genetics**, [S.l.], v.6, n. 9, e1001129, 2010.
- TATEISHI, A.; KANAYAMA, Y.; YAMAKI, S.  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase from cell walls of Japanese pear fruits. **Phytochemistry**, v.42, n. 2, p. 295-299. 1996.
- THARANATHAN, N. R.; KITTER, F. S. Chitin: the undisputed biomolecule of great potential. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 43, n. 1, p. 61-87, 2003.
- THOMPSON, J. E.; FRY, S. C. Evidence for covalente linkage between xyloglucan and acidic pectins in suspension-cultured rose cells. **Planta**, v. 211, p. 275-286, 2000.
- TULIN, S.; AGUIAR, D.; ISTRAIL, S.; SMITH, J. A quantitative reference transcriptome for *Nematostella vectensis* early embryonic development: a pipeline for *de novo* assembly in emerging model systems. **EvoDevo**, v. 4, p. 16, 2013.
- UKAN, D. **Análise dos resíduos produzidos por formigueiros de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) em laboratório e em condições de campo.** 2011. 116f. Tese (Doutorado em Ciências Florestais). Faculdade de Engenharia Florestal, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- VAN DEN BRINK, J.; DE VRIES, R. P. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 91, n. 6, p. 1477– 1492, 2011.
- VAN DER VLUGT-BERGMANS, C. J.; MEEUWSEN, P. J.; VORAGEN, A. G.; VAN OUYEN, A. J. Endo-xylogalacturonan hydrolase, a novel pectinolytic enzyme. **Appl Environ Microbiol**, v. 66, n. 1, p. 36–41, 2000.

- VIEIRA, I. G. P.; MENDES, F. N. P.; GALLÃO, M. I.; BRITO, E. S. NMR study of galactomannans from the seeds of mesquite tree (*Prosopis juliflora* (Sw) DC). **Food Chemistry**, v. 101, p. 70-73, 2007.
- VIHINEN M.; MANTSALA, P. Microbial amylolytic enzymes. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 24, p. 329-418, 1989.
- VORAGEN, A. G. J.; COENEN, G.; VERHOEF, R. P.; SCHOLS, H. A. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. **Structural Chemistry**, v. 20, p. 263-275, 2009.
- WANG, Y.; COLEMAN-DERR, D.; CHEN, G.; GU, Y. Q. OrthoVenn: a web server for genome wide comparison and annotation of orthologous clusters across multiple species. **Nucleic Acids Res**, v. 43, p. W78–W84, 2015.
- WARD, P. S.; BRADY, S. G.; FISHER, B. L.; SCHULTZ, T. R. The evolution of myrmicine ants: phylogeny and biogeography of a hyperdiverse ant clade (Hymenoptera: Formicidae). **Systematic Entomology**, Oxford, v. 40, n. 1, p. 61-81, 2015.
- WILLATS, W. G.; MCCARTNEY, L.; MACKIE, W.; KNOX, J. P. Pectin: Cell biology and prospects for functional analysis. **Plant Molecular Biology**, v. 47, p. 9-27, 2001.
- WILLATS, W. G. T.; KNOX, J. P.; MIKKELSEN, J. D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 97-104, 2006.
- WIRTH, R.; HERZ, H.; RYEL, R. J.; BEYSCHLAG, W.; HÖLLDOBLER, B. **The herbivory of leaf-cutting ants. A case study on *Atta colombica* in the tropical rainforest of Panama**. Accepted by Ecological Studies, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York. 2003. 230 p.
- WONG, D. Enzymatic deconstruction of backbone structures of the ramified regions in pectins. **Protein J**, v. 27, n. 1, p. 30–42, 2008.
- WONG, D. W. S. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 157, n. 2, p. 174–209, 2009.
- XU, C. G.; NAKATSUKA, A.; KANO, H.; ITAMURA, H. Changes in ethylene production and activities of cell wall degrading enzymes during rapid fruit softening of Japanese persimmon 'Saijo'. **J Jpn Soc Hortic Sci**, v. 72, p. 460–462, 2003.
- YADAV, S.; YADAV, P. K.; YADAV, D.; YADAV, K. D. S. Pectin lyase: A review. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 1-10, 2009.
- YIN, Y.; MAO, X.; YANG, J. C.; CHEN, X.; MAO, F.; XU, Y. dbCAN: a web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation, **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. W 1, p. W445-W451, 2012.

YIP, V. L.; WITHERS, S. G. Breakdown of oligosaccharides by the process of elimination. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, p. 147–155, 2006.

YOON, J. J.; CHA, C. J.; KIM, Y. S.; SON, D. W.; KIM, Y. K. The brown-rot basidiomycete *Fomitopsis palustris* has the endo-glucanases capable of degrading microcrystalline cellulose. **J Microbiol Biotechnol**, v. 17, p. 800–805, 2007.

YOSHIOKA, H.; KASHIMURA, Y.; KANEKO, K.  $\beta$ -D-galactosidase and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase activities during the softening of apples. **Journal of Japanese Society of Horticultural Science**, Kyoto, v. 63, n. 4, p. 871- 878, 1995.

ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulose systems. **Biotechnology Bioenergy**, v. 88, p. 797-824, 2004.