

ANA CAROLINA MARCHIORI

**DIVERSIDADE E EVOLUÇÃO NA SIMBIOSE ENTRE
BACTÉRIAS E FORMIGAS ATTINI**

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

Orientador: Maurício Bacci Júnior

**Rio Claro - SP
2013**

Aos meus anjinhos encarnados:

Minha amiga e mestre Cynara de Melo Rodovalho,

Meu amor Leonardo Henrique Galdino e

Meu irmão Francisco Marchiori Netto

...por todo o apoio e carinho, e por estarem ao meu lado em todos os momentos!

e

Aos meus pais:

Elaine Cristina Bertazzi Marchiori e Francisco Marchiori Junior

...por sempre me ajudarem a realizar meus sonhos!

Dedico esta tese

*A todos os meus mestres desde a infância até os dias de hoje
Ofereço esta tese*

Nestes anos me tornei uma pessoa melhor; estudei, trabalhei e aprendi muito mais do que cabe escrever numa tese; convivi com pessoas incríveis; fiz amizades para a vida toda; conheci o grande amor da minha vida; realizei o sonho de dar aula de biologia molecular; resgatei minha paixão pela pesquisa, pela ciência. E, entre problemas do doutorado e crises de choro, posso dizer que fica em minha memória e meu coração as lembranças dos momentos felizes de uma fase inesquecível que eu gostaria que fosse eterna. Quero deixar aqui minha gratidão a todas as pessoas que fizeram parte desta etapa de minha vida:

*Prof. Dr. **Maurício Bacci Júnior**, agradeço a oportunidade do doutorado, pela orientação, por ensinar mais que ciência e por ser tão calmo e gentil. Obrigada por contribuir com a minha formação científica e por me fazer vivenciar a mais linda das profissões: professora de biologia molecular.*

***Mãe e pai** agradeço o carinho, apoio, e todo o esforço para a realização dos meus sonhos durante toda minha vida e por acreditarem e investirem tanto no meu futuro. À minha mãe um super obrigada por seus deliciosos quitutes.*

***Irmão** agradeço por tornar meus dias mais alegres com suas brincadeiras, por ser um irmão carinhoso e por sempre estar disposto a me ajudar a resolver qualquer tipo de problema.*

*Meu amor **Léo** agradeço por todo amor, carinho e paciência. Obrigada por ser tão especial e fazer parte da minha vida. Por me apoiar em todas as minhas decisões e principalmente por me incentivar a seguir meus sonhos. Obrigada também pelos finais de semana e noites que me fez companhia no laboratório, e claro por encher minhas caixinhas de ponteiros.*

*Madrinha **Cida Girardi** e padrinho **Ângelo Girardi**, meus segundos pais, agradeço por sempre torcerem por mim e por tanto amor e carinho. Obrigada por me encaminharem nessa vida acadêmica.*

***Vó Ada** agradeço seu amor, carinho, conversas, os bolos deliciosos e por sempre desejar o melhor pra mim.*

*Amigas **Cíntia Henrique (Rio)**, **Cynara Rodovalho** e **Milene Ferro** agradeço pela amizade, por todos os momentos que passamos juntas, pelas viagens, passeios, festas e*

conversas. Um agradecimento mais que especial para a Cynara e Milene pelas ideias, análises e sugestões para este trabalho.

Amigos e colegas do Laboratório de Evolução Molecular (LEM) e colaboradores do LEM: Alexandre Somera, Shao (Alexandre Takara), André Rodrigues, Cíntia Bezerra, Cynara, Dayane Pires, Diego Negretto, Franco Dani, Joaquim Martins, Milene, Miagui (Sérgio Kakazu), Joana Mantovani, Tássio Brito, Welinton de Souza, Paula Martins, Rodrigo Esposti, Carlos Sponton e Mariana Lira, agradeço pelas conversas, ajudas, aprendizado, diversão e tantas experiências compartilhadas.

Tássio agradeço por toda sua ajuda e por ser tão especialmente divertido. Obrigada por toda paciência quando me ensinou a dissecar os intestinos das formigas.

Miagui agradeço por ser sempre prestativo, por me ensinar a usar o sequenciador e por toda ajuda no sequenciamento de DNA.

Alexandre Somera agradeço sua ajuda e ensinamentos científicos. O Alexandre é o Oráculo da UNESP, e tem boa vontade de ajudar todo mundo.

Gabriela Pessenda, Júlia Marinho e Antônio Faria, que foram meus estagiários e alunos, agradeço pela agradável convivência, conversas e brincadeiras. Gabi, obrigada por sua ajuda como monitora da disciplina de Biologia Molecular.

Amigos Juliana e André Rodrigues, Paula Martins e João Caldeirelli, Milene Ferro e Eric Antônio, Cynara, Cíntia Rio, Tássio, Miagui e meu amor Léo agradeço por tantas reuniões, festinhas, conversas, e jogadas de imagem e ação nas quais o grupo das meninas foi sempre vitorioso.

Professores, funcionários, amigos e colegas do CEIS, especialmente Necis Miranda, Lucilene Amaro, Ita Reis, Sandra Verza, Bibiana Souza e Mara Chiarelli agradeço as conversas, festinhas e pepinos resolvidos. Ao Prof. Vanderlei Martins um agradecimento especial por salvar minha vida sempre que o sequenciador parava de funcionar.

FAPESP – Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo agradeço a concessão da bolsa de Doutorado. Mãe FAPESP (apelido carinhoso dado pelo pessoal do LEM) muito obrigada por valorizar a ciência em nosso país e por me proporcionar momentos tão incríveis durante esses anos de doutorado.

*Minha prima **Flávia Bertazzi** agradeço pela nossa duradoura amizade, que me dá amparo em tantos momentos.*

*Querida amiga-irmã **Monica Godói** agradeço tudo que passamos juntas, todos os conselhos, colinhos, e carinhos que recebo, e obrigada por torcer tanto por mim.*

*Prima **Roucheli Tavares** e meus tios **Tereza** e **Antônio Carlos Tavares** agradeço pela companhia, pelos almoços e conversas. Tia, obrigada pelas orações.*

*Meus primos **Bruno** e **João Vitor Bertazzi** e **Gabriel Girardi** agradeço por serem tão queridos e fazerem minha vida mais feliz.*

*Sogra **Maria José Galdino** e sogrinho **Ademauro Galdino** agradeço os momentos agradáveis, o apoio e os pães deliciosos.*

***Juliana Romani, Juliana Rodrigues, Laura Moura, Marina Baungartner, Monica e Roucheli**, obrigada por me presentear com esses anjinhos (meus sobrinhos postiços): **Vicente Romani, Vinícius Rodrigues, Mauro Moura, Benício e Olavo Baungartner, Melissa Godoy e Ricardo Tavares**. É um amor tão grande que sinto por estes pequenos...*

***Patrícia Duarte** e toda equipe **Essência do Corpo** agradeço por me ensinar a gostar de exercício físico e tornar isso uma rotina em minha vida.*

*Amigos e colegas do **Centro Espírita Fé e Caridade**, grupo do **José Carlos Custódio** agradeço por todos esses anos de trabalho e estudo que me deram equilíbrio mental e espiritual para a vida.*

***Alunos da disciplina Biologia Molecular** (turmas de 2011 a 2012) agradeço por tudo que aprendi para ensinar a vocês, mas principalmente agradeço o que pude aprender com vocês.*

***Lima e Sérgio** da portaria da **UNESP** agradeço por sempre me receberem com um sorriso e por serem tão agradáveis.*

A todos que contribuíram para a conclusão deste sonho, meus sinceros agradecimentos.

*“Escolha um trabalho que você ame
e não terá que trabalhar um único dia em sua vida”
Confúcio*

RESUMO

As formigas da tribo Attini são conhecidas pelo hábito de cultivar fungos mutualistas (Basidiomycota) em uma variedade de materiais coletados para formar o que é chamado de jardim de fungo. Este hábito teve início há cerca de 50 milhões de anos na América do Sul e deu origem a cinco tipos de agricultura, que diferem no tipo de fungo e material coletado. As attíneas utilizam os jardins de fungos como fonte de nutrientes e enzimas, os quais são produzidos não somente pelo fungo mutualista, mas também por outros microrganismos presentes no ninho. Portanto, para as formigas e fungos terem acesso a nutrientes são necessárias associações com outros microrganismos. Estudos das comunidades microbianas associadas às formigas Attini, na maioria das vezes, estão relacionados aos jardins de fungo e objetivam explorar os mecanismos de degradação da biomassa vegetal. Informações sobre a microbiota associada ao corpo das formigas e sua função ainda são insuficientes. As attíneas dependem dos simbiossomas para sua nutrição e proteção contra parasitas. Mas alguns desses microrganismos são ameaças às formigas e outros parecem ser apenas comensais. No presente trabalho, as bactérias associadas às formigas Attini *Atta laevigata*, *Trachymyrmex urichi* e *Mycocepurus goeldii* foram identificadas por métodos independentes de cultivo e um cenário no qual a evolução das formigas Attini é moldada pela interação com estes microrganismos foi proposto. Além disso, foi desenvolvido um protocolo de lavagem das formigas para eliminar bactérias externas e ser utilizado para amostrar os microrganismos do interior das formigas. Os resultados mostraram diferenças entre as comunidades bacterianas abrigadas pelas formigas Attini estudadas. A discriminação de bactérias internas e externas ao corpo das formigas foi possível devido à padronização e aplicação do protocolo de lavagem desenvolvido. Foi descoberto que nos intestinos da Attini mais basal *M. goeldii* predomina uma única espécie de *Spiroplasma*. No entanto, durante a evolução, esta bactéria foi progressivamente substituída por duas espécies de Rhizobiales no intestino da attínea filogeneticamente intermediária *T. urichi*, e finalmente uma única espécie de Rhizobiales prevaleceu como a espécie bacteriana única nos intestinos da formiga cortadeira mais derivada *A. laevigata*. As cortadeiras também carregam em suas cutículas, quantidades consideráveis de *Acetobacter*. Rhizobiales e *Acetobacter* pertencem a grupos de bactérias fixadoras de nitrogênio. Assim, é concebível que a

especialização em mutualistas fixadores de nitrogênio possa ter desempenhado um papel no aumento do tamanho da população e do tamanho do corpo ao longo da evolução das formigas Attini. O aumento da população pode estar associado com o aumento nas taxas de infecção, mas esta tendência foi aparentemente compensada pela alta complexidade social das cortadeiras e pela manutenção de espécies de Burkholderiales e Actinomycetales, encontradas na sua cutícula. Estas bactérias produtoras de antibióticos podem ter assumido o papel protetor que está atribuído a Pseudonocardiaecae nas demais espécies de Attini. Também foi detectada uma associação com espécies de *Wolbachia* que parecem ser mutualistas e externas ao corpo das attíneas, provavelmente nas cutículas. Esta associação pode ter iniciado na Attini mais basal, se especializado na intermediária, mas foi perdida na mais derivada. As associações mutualistas parecem ser recentes e ter se originado a partir de uma única aquisição das fixadoras de nitrogênio e múltiplas aquisições de bactérias que produzem antibióticos.

ABSTRACT

Ants of the Attini tribe are known for the habit of cultivating mutualistic fungi (Basidiomycota) on a variety of harvested materials to form what is called the fungus garden. This habit originated approximately 50 million years ago in South America and gave rise to five agricultural systems, which differ in the type of fungus and collected material. Attine ants utilize the fungus garden as a source of nutrients and enzymes, which are not only produced by the mutualistic fungus, but also by other microbes present in the garden. Therefore, for ants and fungi have access to these nutrients associations with other microorganisms became necessary. Studies of microbial community associated with attine ants are mostly related to the fungus gardens and aim to explore the mechanisms of plant biomass degradation. Information on the microbiota associated with the body of ants and its function are still lacking. Attine ants rely on microbial symbionts for nutrition and protection against parasites. On the other hand, some microbes threatens these ants and others appear to be only commensals. In this work, the bacteria associated with the attine ants *Atta laevigata*, *Trachymyrmex urichi* and *Mycocepurus goeldii* were identified by culture-independent methods and a scenario in which the evolution of attine ants is shaped by the interaction with these microorganisms has been proposed. In the present study a washing protocol was also developed to remove external bacteria, and used to sample microorganisms living inside the ants and possibly other insects. The results showed differences between the bacterial communities harbored by the attine ants studied. Discrimination of internal and external ants' body bacteria was possible due to the standardization and application of the developed washing protocol. It was observed that the intestines of most basal attine *M. goeldii* are dominated by a single species of *Spiroplasma*. However, during the attine ants' evolution, this bacterium was progressively replaced by two Rhizobiales species in the gut of the phylogenetically intermediate *T. urichi*, and finally a single species of Rhizobiales prevailed as the unique bacterial species in the gut of the most derived leaf-cutter ant *A. laevigata*. Leaf-cutters also harbor on their cuticles considerable amounts of *Acetobacter* sp. Both Rhizobiales and *Acetobacter* sp. species are in the group of nitrogen-fixing bacteria. Thus, it is conceivable that specialization in nitrogen-fixing mutualists may have played a role in increasing population and body size during Attini evolution. A larger population is thought to be

associated with increases in infection rates, but this tendency was apparently counterbalanced by high social complexity of leaf-cutters and by the maintenance of Burkholderiales and Actinomycetales species, which we only found in the cuticle of ants. These antibiotic-producing bacteria may have assumed the protective role that is currently attributed to Pseudonocardiaceae in the remaining Attini species. We also detected an association with cuticular *Wolbachia* mutualists, which may have begun in the more primitive Attini, then specialized in the intermediate ones, and finally being lost in the more derived leaf-cutters. Mutualistic associations appear to be recent and originated from a single acquisition of nitrogen-fixing bacteria and multiple acquisitions of antibiotic producing microbes.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 As formigas Attini e seus jardins de fungo.....	17
1.2 Simbiose	23
1.3 Simbiontes das formigas Attini	25
1.3.1 Simbiontes mutualistas	25
1.3.2 Simbiontes parasitas	27
1.3.3 Simbiontes relacionados à nutrição das formigas	29
1.4 Identificação de microrganismos não cultivados.....	30
1.5 Evolução da simbiose.....	34
2 OBJETIVOS	37
3 MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1 Material biológico.....	38
3.2 Avaliação da sensibilidade da PCR.....	39
3.3 Protocolo de lavagem	40
3.4 Dissecções de intestinos de formiga	40
3.5 Construção de bibliotecas 16S rRNA	41
3.6 Análise das sequências	42
3.7 Atribuição taxonômica das sequências do gene 16S rRNA e funcional aos taxons identificados.....	43
3.8 Análise de Coordenadas Principais (PCoA)	43
3.9 Pesquisa de espécies de bactérias em outras espécies de formigas Attini.....	44
3.10 Análises filogenéticas.....	46
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1 Análise da sensibilidade da PCR	47
4.2 Desenvolvimento do protocolo de lavagem	49
4.3 Análises das comunidades bacterianas das formigas Attini	53
4.4 MOTUs predominantes de bactérias encontradas nas formigas Attini	59

4.5 Espécies bacterianas raras em formigas Attini	64
4.6 Incidência de bactérias selecionadas nas formigas Attini	69
4.7 Especialização da interação bactérias-formigas Attini	70
5 CONCLUSÕES	80
REFERÊNCIAS	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Filogenia das formigas Attini e os cinco tipos de agricultura.	20
Figura 2 Representação esquemática das regiões conservadas (C1-C9) e regiões hipervariadas (V1-V9) do gene 16S rRNA	32
Figura 3 Espécies de formigas Attini utilizadas para o estudo de associações bacterianas.	38
Figura 4 Alinhamento de sequências utilizadas para o desenho do <i>primer</i> Rhiz.	45
Figura 5 Amplificações do inserto em pJET (A) e do gene 16S rRNA (B) nas amostras da diluição seriada do clone de <i>E. coli</i>	47
Figura 6 Amplificações do gene 16S rRNA de cultura de <i>E. coli</i> diluída a 10^{-3} com diferentes concentrações de DNA de formiga.....	48
Figura 7 Amplificações do inserto em pJET, a partir de quantidades diferentes de <i>E. coli</i> (diluição seriada) na quantidade de 10 ng de DNA de formiga	49
Figura 8 Amplificação do inserto de <i>E. coli</i> após realização do procedimento de lavagem das formigas inoculadas com diferentes reagentes.....	50
Figura 9 Origem das sequências mais similares a de bactérias encontradas nas bibliotecas de <i>A. laevigata</i>	51
Figura 10 Análise de rarefação das bibliotecas 16S rRNA de bactérias associadas às formigas Attini obtidas pelo programa MOTHUR	55
Figura 11 Diversidade beta entre as comunidades bacterianas associadas às formigas Attini por PCA.....	55
Figura 12 Afiliação taxonômica das sequências 16S rRNA presentes nas bibliotecas das formigas Attini	57

Figura 13 Diagrama de Venn mostrando sobreposição de MOTUs entre as três comunidades bacterianas Attini	59
Figura 14 Classificação das MOTUs mais abundantes encontradas internamente (em formigas lavadas) ou externamente (em formigas não lavadas) nas formigas Attini.	60
Figura 15 Árvore filogenética de Rhizobiales associados às formigas Attini e sequências estreitamente relacionadas.....	72
Figura 16 Árvore filogenética de Rhodospirillales associados às formigas Attini e sequências estreitamente relacionadas.....	73
Figura 17 Árvore filogenética de Burkholderiales associados às formigas Attini e sequências estreitamente relacionadas.....	75
Figura 18 Árvore filogenética de Actinomycetales associados às formigas Attini e sequências estreitamente relacionadas.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Sumário das características das formigas coletadas para a construção das bibliotecas 16S rRNA.....	38
Tabela 2 Formigas da coleção entomológica do LEM utilizadas para a prospecção de bactérias simbiotes.	44
Tabela 3 <i>Primers</i> utilizados para as PCR de diagnóstico. O gene alvo das ampliações é o 16S rRNA.	45
Tabela 4 Diluição seriada da cultura do clone de <i>E. coli</i> e suas respectivas UFCs. .	48
Tabela 5 Bibliotecas usadas para a validação do protocolo de lavagem.	51
Tabela 6 Sequências das bibliotecas 16S rRNA das formigas Attini, estimativa de riqueza e índices de diversidade.....	54
Tabela 7 Distâncias UniFrac (acima da diagonal) e valores de p corrigidos para múltiplas comparações utilizando a correção de Bonferroni (a partir de testes de significância UniFrac; abaixo da diagonal)	56
Tabela 8 Composição e abundância de espécies bacterianas associadas ao corpo das formigas Attini.	66
Tabela 9 Presença (+) ou ausência (-) das bactérias simbiotes em espécies de formigas Attini.	70

1 INTRODUÇÃO

1.1 As formigas Attini e seus jardins de fungo

As formigas apresentam grande sucesso ecológico, ocupam quase todos os habitats terrestres (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990) e apresentam 12.755 espécies descritas (BOLTON, 2013) (consultado em 23/04/2013). Comportamento extremamente especializado, organização social e sucesso evolutivo, as levam a ser um modelo de estudo em muitas áreas da Biologia (RABELING; BROWN; VERHAAGH, 2008).

As formigas da tribo Attini (attíneas) (Formicidae: Myrmicinae) apresentam distribuição geográfica restrita ao continente americano com a maioria das espécies na região neotropical (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990), são monofiléticas (SCHULTZ; BRADY, 2008; SCHULTZ; MEIER, 1995) e vivem em mutualismo obrigatório com fungos do filo *Basidiomycota* (Ordem *Agaricales*) há, aproximadamente, 50 milhões de anos (MUELLER et al., 2001; SCHULTZ; BRADY, 2008; WEBER, 1972). A origem da cultura de fungos é especulativa e existem duas propostas: (i) os fungos saprofíticos se desenvolveram no substrato no interior dos ninhos e a partir daí as formigas passaram a se alimentar desses fungos e, conseqüentemente, desenvolveram adaptações para seu cultivo; (ii) os fungos utilizavam as formigas como vetores para sua dispersão e somente mais tarde na evolução, as formigas teriam desenvolvido adaptações para o cultivo desses microrganismos (MUELLER et al., 2001).

Fungos da Ordem *Agaricales* são caracterizados pela produção de cogumelos (estrutura reprodutiva). No entanto, os cogumelos raramente ocorrem em ninhos das attíneas, pois as formigas suprimem as frutificações e rompem as conexões das hifas (WEBER, 1972). A maioria das attíneas cultiva fungos pertencentes aos gêneros *Leucoagaricus* e *Leucocoprinus*, da tribo *Leucocoprineae*, e um pequeno grupo cultiva fungos pertencentes à Família *Pterulaceae* (SCHULTZ; BRADY, 2008).

As attíneas utilizam os jardins de fungos como fonte de nutrientes e enzimas (DE SIQUEIRA et al., 1998; SILVA et al., 2003; WEBER, 1972). Em associações mutualísticas entre insetos e fungos, ocorrem adaptações que facilitam a perpetuação desta associação e promovem relações de interdependência. Se os

insetos se beneficiam pela aquisição de alimento (micofagia) e enzimas digestivas, os fungos recebem um ambiente adequado para o seu desenvolvimento, com recursos disponíveis, umidade e redução de competidores, além de deixarem sua propagação a cargo dos insetos (MARTIN, 1992).

As formigas Attini ocorrem em 15 gêneros (*Acromyrmex*, *Apterostigma*, *Atta*, *Cyphomyrmex*, *Kalathomyrmex*, *Mycetagroicus*, *Mycetarotes*, *Mycetophylax*, *Mycetosoritis*, *Mycocepurus*, *Myrmicocrypta*, *Paramyctophylax*, *Pseudoatta*, *Sericomyrmex* e *Trachymyrmex*) e 253 espécies válidas (BOLTON, 2013) (consultado em 23/04/2013).

Estas formigas cultivadoras de fungos foram anteriormente classificadas em dois grandes grupos filogenéticos (Attini basais e Attini derivadas) definidos segundo características do DNA mitocondrial e da morfologia das larvas (SCHULTZ; MEIER, 1995). Mais tarde, a história evolutiva das attíneas foi reconstruída com dados de sequenciamento de quatro genes nucleares e fósseis preservados em âmbar demonstrando que as formigas Attini divergiram em duas principais linhagens que formam os dois maiores clados das Attini: Paleoattini e Neoattini (SCHULTZ; BRADY, 2008). Cinco novos grupos foram definidos representando cinco diferentes sistemas de agricultura (ou fungicultura) (SCHULTZ; BRADY, 2008) entre as duas principais linhagens da tribo Attini (Figura 1). A seguir os tipos de agricultura:

(1) Agricultura basal - praticada pela maioria das espécies de Attini, dentro dos gêneros *Myrmicocrypta*, *Mycocepurus*, *Apterostigma* (que estão no grupo monofilético das Paleoattini), *Kalathomyrmex*, *Paramyctophylax*, *Mycetophylax*, *Mycetarotes*, *Cyphomyrmex*, *Mycetosoritis* e *Mycetagroicus* (que estão no grupo monofilético das Neoattini). Cultivam fungos filogeneticamente relacionados na tribo Leucocoprineae (Basidiomycota: Agaricales) que são capazes de vida livre, fora da simbiose com as attíneas. Estas formigas utilizam como substrato para o crescimento do fungo pedaços de flores, polpa de frutas, sementes, fezes de insetos, folhas e cadáveres de insetos (LEAL; OLIVEIRA, 2000).

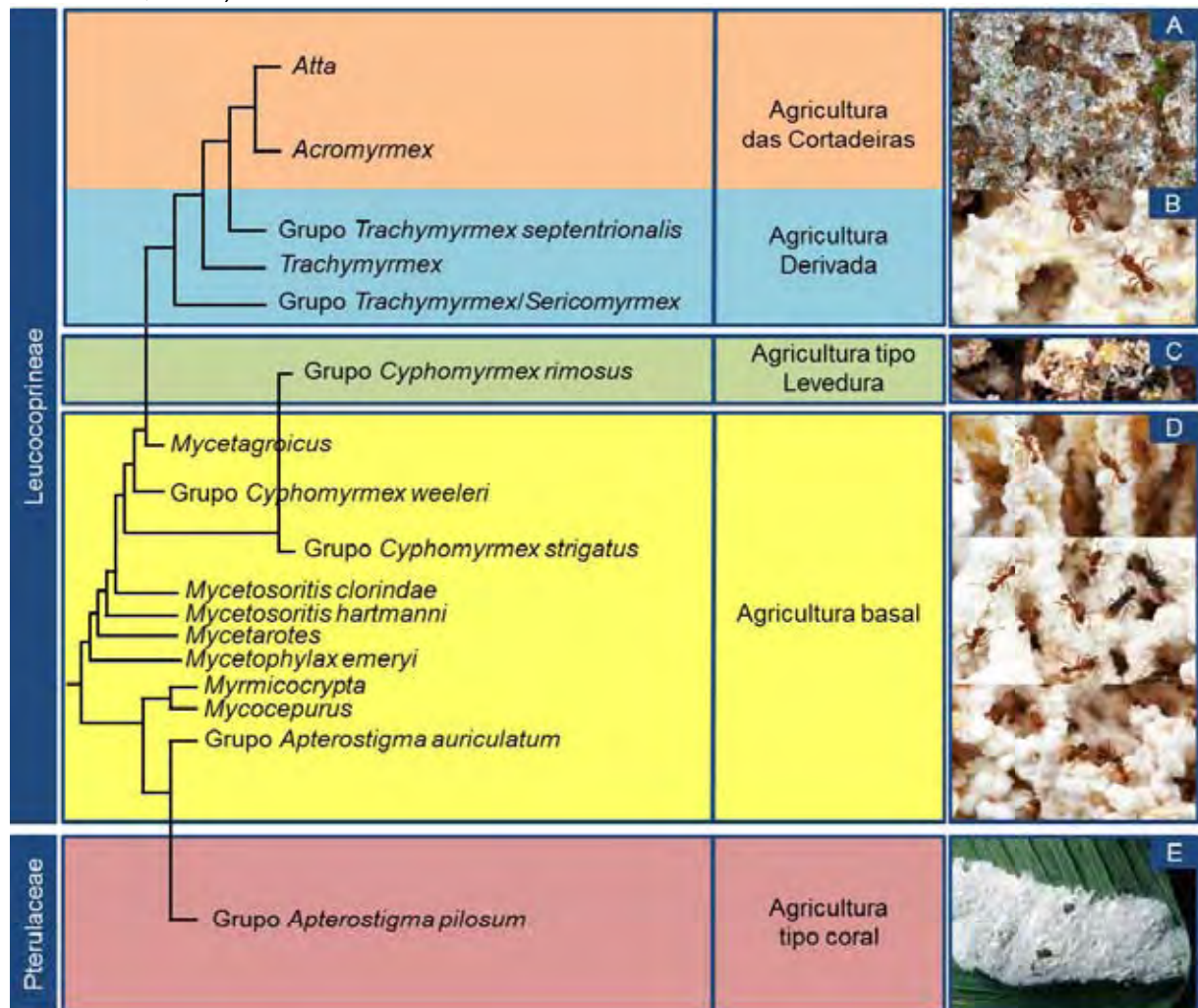
(2) Agricultura fungos *Pterulaceae* - cultivo de fungos *Pterulaceae* por algumas espécies do “grupo *Apterostigma pilosum* (Mayr 1865)” (LATTKE, 1997), um clado derivado dentro do gênero *Apterostigma*.

(3) Agricultura tipo Levedura - cultivo de fungos da tribo Leucocoprineae por espécies do “grupo *Cyphomyrmex rimosus* (Spinola 1851)”, um clado derivado dentro do gênero *Cyphomyrmex*. Esses fungos crescem em forma de levedura quando associado às attíneas, mas são também capazes de vida livre, fora da simbiose com as formigas Attini.

(4) Agricultura Derivada - cultivo de outras espécies fúngicas na tribo Leucocoprineae com cultivares semelhantes aos da Agricultura basal, mas que não são capazes de vida livre. Este tipo de agricultura praticada por dois gêneros de formigas, *Sericomyrmex* e *Trachymyrmex*, utiliza como substrato para o crescimento do fungo, vegetação fresca, folhas, flores, polpa de frutos e sementes (LEAL; OLIVEIRA, 2000).

(5) Agricultura das Cortadeiras - grupo especializado que faz parte da Agricultura Derivada, com origem há entre oito e 12 milhões de anos. Apresenta o cultivo de uma única espécie fúngica, *Leucoagaricus gongylophorus*, que é incapaz de viver fora do mutualismo com as attíneas. Esta agricultura é praticada pelas formigas *Atta* e *Acromyrmex*, conhecidas como cortadeiras por terem adquirido a habilidade de cortar e processar folhas e flores frescas para o cultivo do fungo (SCHULTZ; BRADY, 2008)

Figura 1 Filogenia das formigas Attini e os cinco tipos de agricultura. Os tipos de agricultura estão separados por retângulos coloridos e são definidos por grupos filogeneticamente distintos dos cultivares de fungos associados às attíneas. (A) Agricultura das cortadeiras: jardim de fungo de *Atta* (WILD, 2001); (B) Agricultura derivada: jardim de fungo de *Trachymyrmex* (WILD, 2001); (C) Agricultura tipo levedura: jardim de fungo de *Cyphomyrmex* (WILD, 2001); (D) Agricultura basal: jardins de fungo de *Mycocepurus*, *Mycetarotes* e *Cyphomyrmex* (WILD, 2001); (E) Agricultura fungos *Pterulaceae*: jardim de fungo de *Apterostigma* (SCHULTZ; BRADY, 2008). Figura adaptada (MEHDIABADI; SCHULTZ, 2010).



O fungo cultivado pelas attíneas derivadas exibe um alto grau de “domesticação”, ou seja, uma série de adaptações para a vida conjunta com as formigas Attini que o tornaram incapaz de levar vida livre. O fungo mutualista dessas formigas produz gongilídeos, hifas com estruturas especializadas que acumulam nutrientes e são preferencialmente consumidas pelas formigas (CHAPELA et al., 1994).

O sequenciamento do genoma de *Atta cephalotes*, revelou características que refletem sua dependência nutricional sobre o fungo mutualista, como a diminuição

de genes relacionados com a aquisição de nutrientes (SUEN et al., 2011). O fungo mutualista cultivado pelas formigas cortadeiras, *Leucoagaricus gongylophorus*, também possui adaptações evolutivas em seu genoma que auxiliam na nutrição das formigas atíneas (DE FINE LICHT et al., 2013).

A relação das formigas Attini com o fungo mutualista é imprescindível. As rainhas virgens deixam os ninhos carregando uma pequena amostra do fungo, são fecundadas durante o “voo nupcial” e então utilizam a amostra de fungo para iniciar um novo ninho (WEBER, 1972). Sendo assim, a transmissão do fungo mutualista é realizada de forma vertical (CHAPELA et al., 1994; HINKLE et al., 1994). Este comportamento ainda não foi observado nas Paleoattini, mas supõe-se que seja genérico na tribo (WEBER, 1972). Outra evidência de transmissão vertical é a congruência entre as árvores filogenéticas de formigas e fungos simbiotes (CHAPELA et al., 1994; HINKLE et al., 1994; MUELLER; REHNER; SCHULTZ, 1998) reforçando a hipótese de que o fungo cultivado coevoluiu com as formigas cultivadoras (WEBER, 1972). A transmissão horizontal do fungo mutualista, ou seja, entre ninhos não parentais, também já foi identificada entre as Attini (MUELLER et al., 1998; SILVA-PINHATI et al., 2004).

As formigas Attini não são somente heterogêneas quanto às associações simbióticas com os cultivares de fungos ou quanto ao material coletado que utilizam para o cultivo destes, diferem também quanto ao tamanho da colônia, formas das castas, comportamento de nidificação e de acasalamento (MEHDIABADI; SCHULTZ, 2010). As colônias das formigas Attini podem ser pequenas, com poucas câmaras de fungos, ter apenas algumas dezenas de indivíduos com operárias monomórficas nos gêneros mais basais, ou apresentar colônias com várias câmaras subterrâneas de fungos, chegando a ter até oito milhões de indivíduos polimórficos e com funções específicas, como nas colônias das formigas cortadeiras (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; WEBER, 1972).

As formigas cortadeiras apresentam alta complexidade social, colônias populosas, sendo algumas espécies altamente polimórficas, o que permite forrageamento eficiente de grande volume de material vegetal. 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. Estes insetos consomem entre 13 a 17% da vegetação da floresta amazônica e são considerados herbívoros dominantes da Região

Neotropical (COSTA et al., 2008; HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Estes recursos também são adquiridos de cultivos agrícolas, motivo pelo qual algumas espécies de cortadeiras são consideradas pragas para a agricultura (DELLA-LUCIA, 2011). Estima-se que no Estado de São Paulo existam 100 milhões de saueiros, totalizando 180 milhões de toneladas de matéria vegetal cortada e 200 milhões de metros cúbicos de terra movimentados, o que dá uma ideia das perdas impostas à agricultura (VINHA, 2007).

O material vegetal coletado não é de fato consumido diretamente pelas formigas, e sim usado como substrato para o desenvolvimento do fungo mutualista. O fungo é o alimento exclusivo de rainhas, larvas e adultos alados (machos e fêmeas virgens) e complementa a dieta das operárias (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Nas formigas cortadeiras, a glicose contida no jardim de fungo é provavelmente responsável por cerca de 50% das necessidades nutricionais das operárias (SILVA et al., 2003). O material coletado, além de fonte de nutrientes para o fungo mutualista, é uma grande fonte de microrganismos que podem ser vetorizados para dentro dos ninhos e estabelecerem relações comensais (benéfica a uma espécie sem causar prejuízo para a outra), parasíticas (prejudiciais à sobrevivência e reprodução do hospedeiro) ou mutualistas (benéfica a ambos simbioses) com as formigas.

Para manter uma cultura saudável do jardim de fungo, as formigas *Attini* evoluíram estratégias complexas para reduzir a exposição de seu jardim a possíveis microrganismos parasitas. A primeira delas envolve a manutenção das condições ótimas de crescimento do fungo mutualista, como temperatura e umidade, dando, assim, condições para que este leve vantagem na competição com outros microrganismos (WEBER, 1972). Elas realizam também remoção mecânica de contaminantes que chegam aos ninhos junto com o material coletado: as formigas limpam o fungo mutualista meticulosamente removendo restos do jardim ou seções infectadas, filtrando esporos de outros fungos (através de bolsos localizados na cavidade infra bucal) (CURRIE; STUART, 2001) ou aplicando gotas de fezes que contêm substâncias que contribuem tanto para a degradação da biomassa vegetal quanto para a remoção de pragas (RODRIGUES et al., 2008a). Além destes comportamentos, as formigas também possuem mecanismos químicos para evitar a contaminação de seus jardins de fungo: as secreções de substâncias com caráter antibiótico por glândulas metapleurais (FERNANDEZ-MARIN et al., 2013;

POULSEN; CURRIE, 2006) e mandibulares (RODRIGUES et al., 2008b); a produção de compostos antimicrobianos pelo fungo mutualista pode ajudar na higiene do jardim de fungo (AYLWARD et al., 2012). As cortadeiras ainda possuem mais um processo que ajuda a eliminar microrganismos que poderiam parasitar ou competir com o fungo mutualista: elas cortam e mastigam os fragmentos de folhas até os deixarem com 1 a 2 mm² (QUINLAN; CHERRETT, 1977).

A conversão da biomassa vegetal do material coletado em nutrientes (energia utilizável) envolve o fungo mutualista, que produz enzimas necessárias para a degradação do tecido vegetal (ERTHAL et al., 2009), e também toda a comunidade microbiana ali existente (AYLWARD et al., 2012); ou seja, para as formigas e fungos terem acesso aos nutrientes são necessárias associações com outros microrganismos.

1.2 Simbiose

O termo "simbiose" foi cunhado pela primeira vez em meados do século XIX por Anton de Bary como "a convivência de diferentes espécies" (*the living together of different species*). Os simbioses microbianos podem desempenhar um papel importante tanto na adaptação quanto na evolução de organismos superiores. Visando entender a importância destas associações o "Projeto Microbiano Humano" foi criado, onde é analisado o metagenoma de microrganismos em cinco regiões do corpo humano: fossas nasais, cavidade oral, pele, trato gastrointestinal e trato urogenital (PETERSON et al., 2009). Portanto, não é surpreendente que as superfícies de animais e plantas contenham uma grande abundância e variedade de microrganismos. O número de células microbianas é muitas vezes superior a de seus hospedeiros. No corpo humano, por exemplo, existem pelo menos dez vezes mais bactérias que células (WENNER, 2007).

Com relação aos insetos, os simbioses podem associar-se à superfície externa do hospedeiro aderindo à sua cutícula, ou internamente na hemolinfa, no intestino, ou dentro de células ou estruturas especializadas, denominadas bacteriócitos (endossimbiontes) (FELDHAAR; GROSS, 2009; KIKUCHI, 2009). Os bacteriócitos estão localizados no intestino mediano ou nos tecidos reprodutivos das fêmeas (BOURSAUX-EUDE; GROSS, 2000).

Relações simbióticas entre insetos e bactérias intestinais têm sido extensivamente estudadas em muitos sistemas. A diversidade de microrganismos que habitam o intestino desses artrópodes é ampla, devido à grande variedade de grupos de insetos, resultando em diferentes estruturas e funções do intestino. No intestino ocorre grande incidência de parceiros simbiotes, provavelmente por ser um ambiente rico em nutrientes, e possibilitar a ocupação e colonização por diversos grupos de microrganismos (RAJAGOPAL, 2009). Estas bactérias podem estar presentes dentro de células especializadas, aderidas à parede intestinal, livres no lúmen ou associadas à superfície de outros membros da comunidade microbiana. A diversidade bacteriana desses ambientes está relacionada, entre outros fatores, com o pH, potencial redox, enzimas digestivas presentes no intestino e o tipo de alimento ingerido (DILLON; DILLON, 2004).

Dentre os principais benefícios apresentados, o fator nutricional tem sido a principal função atribuída a estas bactérias simbiotes, produzindo os compostos que são deficientes na dieta do hospedeiro, principalmente em insetos que apresentam uma dieta restrita como, por exemplo, seiva de plantas ou madeira, e pobres em alguns compostos, como os nitrogenados. Esta suplementação alimentar pode ocorrer através da síntese de aminoácidos essenciais ao hospedeiro (LATORRE et al., 2005), fixação de nitrogênio (ZIENTZ et al., 2005), biossíntese de cofatores e vitaminas (AKMAN et al., 2002) e produção de enzimas que auxiliam na digestão do alimento ingerido (DILLON; DILLON, 2004; JANSON et al., 2008).

A bactéria endossimbionte *Blochmannia*, detectada em formigas carpinteiras (*Camponotus*) (DEGNAN et al., 2004; SAUER et al., 2000) contribui para o ciclo de vida e adaptação na colônia de seus hospedeiros (WERNEGREN et al., 2003), participa da síntese de aminoácidos essenciais (GIL et al., 2002), e da manutenção e desenvolvimento da ninhada destas formigas (ZIENTZ et al., 2006).

A microbiota intestinal de insetos pragas agrícolas da Ordem Lepidoptera produzem enzimas digestivas que auxiliam na digestão proteica e na desintoxicação de metabólitos secundários das plantas (DOUGLAS, 2009). Microrganismos no intestino de insetos da Ordem Coleoptera estão envolvidos em atividades proteolíticas e amilolíticas, e também possuem a habilidade de digerir açúcar (FEMIOLA; BABALOLA, 2012).

As bactérias simbiotes podem também estar envolvidas na defesa dos hospedeiros, através da produção de compostos com ação antimicrobiana. A

bactéria *Pantoea agglomerans* presente no intestino de gafanhoto produz compostos fenólicos que inibem outras bactérias e fungos entomopatogênicos, tais como *Beauveria* sp. e *Metarhizium* sp. (DILLON; CHARNLEY, 1995). Os simbioses também atuam na competição por nutrientes com microrganismos patogênicos (SANCHEZ-CONTRERAS; VLISIDOU, 2008) e também podem ocupar o epitélio intestinal e reduzir as chances de colonização por patógenos, processo conhecido como resistência à colonização (DE SOUZA et al., 2009).

Simbioses parasitas também são comuns entre os insetos. A bactéria *Wolbachia* é considerada um parasita reprodutivo por induzir uma série de alterações na reprodução dos seus hospedeiros, tais como a morte de machos, feminização de machos, partenogênese telítoca e, o mais comum, incompatibilidade citoplasmática (WERREN; BALDO; CLARK, 2008).

1.3 Simbioses das formigas Attini

As formigas Attini e seus jardins de fungo tornaram-se modelo de estudo da simbiose. Além do fungo mutualista já foram identificados outros microrganismos associados às attíneas e aos jardins de fungo.

1.3.1 Simbioses mutualistas

Vários microrganismos devem agir para a proteção das Attini. Alguns simbioses isolados das formigas e seus jardins de fungo foram identificados como supressores de patógenos.

(1) As Actinobactérias presentes nas formigas Attini formam uma camada esbranquiçada sobre o tegumento (cutícula), inicialmente pensada como uma camada de cera (WEBER, 1972), e são tidas como supressoras de patógenos dos jardins de fungo.

Pseudonocardia sp. (CURRIE et al., 2003), foi inicialmente identificada como *Streptomyces* sp. e descrita como produtora de composto antifúngico que teria coevoluído com as formigas para especificamente controlar o fungo parasita *Escovopsis* sp., um micófago do fungo mutualista (CURRIE; SCOTT; et al., 1999).

Os efeitos protetores e o modo de transmissão dessa bactéria levaram pesquisadores a sugerirem uma coevolução entre *Pseudonocardia* e attíneas, e que a aquisição de *Pseudonocardia* ocorreu apenas uma vez desde a origem desta associação (CURRIE, 2001a; POULSEN; CURRIE, 2006).

Estudos provaram a não especificidade da simbiose entre *Pseudonocardia* e formigas Attini, pois verificaram que as *Pseudonocardia* associadas às attíneas não formam um grupo monofilético, o que sugere várias aquisições destas actinobactérias durante a evolução (CAFARO; CURRIE, 2005). KOST e colaboradores (2007) também sugeriram que as *Pseudonocardia* teriam sido recrutadas do ambiente (transmissão horizontal), e demonstraram que não somente *Pseudonocardia* apresenta efeito antagonista em relação a *Escovopsis*, mas outros microrganismos também possuem o mesmo potencial antimicrobiano.

As espécies de *Pseudonocardia* associadas às attíneas são mais similares a espécies de vida livre e não existe congruência entre a topologia das árvores filogenéticas das formigas Attini e desta bactéria, indicando que a aquisição destas bactérias deve ser do meio ambiente (MUELLER et al., 2008).

As actinobactérias poderiam ter um papel mais amplo nos ninhos das formigas Attini: as actinobactérias *Pseudonocardia* e *Amycolatopsis* protegem as formigas contra uma grande variedade de infecções bacterianas ou fúngicas, e não somente contra o *Escovopsis* sp.; evitam o crescimento descontrolado do fungo mutualista, suprimindo e impedindo seu espalhamento pelo ninho (BARKE et al., 2010; SEN et al., 2009) ao invés de potencializar seu crescimento como descrito anteriormente (CURRIE; SCOTT; et al., 1999). As *Pseudonocardia* presentes nos tegumentos das formigas Attini parecem ser mais uma estratégia de defesa das próprias formigas e não exclusivamente, um mecanismo para a proteção do jardim de fungo (MATTOSO; MOREIRA; SAMUELS, 2012).

Acromyrmex spp. tem associação com uma diversidade de actinobactérias (ZUCCHI; GUIDOLIN; CONSOLI, 2011). A presença de múltiplas linhagens de actinobactérias encontradas também em *Trachymyrmex septentrionalis* (formigas e jardim de fungo) por métodos independentes de cultivo (ISHAK et al., 2011a) levam à ideia que as formigas acumulam biofilmes complexos, assim, as variadas actinobactérias poderiam apresentar propriedades complementares benéficas às formigas Attini (ISHAK et al., 2011a).

Portanto, as formigas Attini utilizam de uma terapia multidrogas contra patógenos: diferentes compostos são produzidos para combater os parasitas em suas colônias. Estudos recentes identificaram substâncias produzidas pelas actinobactérias associadas às formigas Attini, com atividade antimicrobiana sobre o *Escovopsis* e outros patógenos: nistatina P1 da família poliene (BARKE et al., 2010) (OH et al., 2009), o dipeptídeo cíclico e antifúngico dentigerumicina (OH et al., 2009) o antibiótico candicidina (BARKE et al., 2010; HAEDER et al., 2009)

(2) A bactéria *Burkholderia* sp. também atua na defesa das formigas Attini. Foi isolada de jardins de fungo de *Atta sexdens rubropilosa* e apresentou atividade contra o fungo parasita *Escovopsis* sp., os entomopatógenos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* e contra o saprofítico *Verticillium lecanii* (SANTOS et al., 2004).

(3) Algumas leveduras isoladas dos jardins de fungo da *Atta texana* também mostraram poder controlar o fungo parasita *Escovopsis* sp., o fungo *Syncephalastrum racemosum*, encontrado frequentemente em ninhos de laboratório de formigas cortadeiras, e o entomopatógeno *Beauveria bassiana*, indicando que elas devem participar da defesa do jardim de fungo (RODRIGUES et al., 2009).

1.3.2 Simbiontes parasitas

Os parasitas também são de grande importância no processo evolutivo das associações simbióticas das attíneas, já que podem ajudar a estabilizar relações de cooperação entre os organismos de uma comunidade, unindo dois mutualistas contra um inimigo comum (LITTLE; CURRIE, 2009). Os seguintes parasitas já foram encontrados nos ninhos das formigas Attini:

(1) *Escovopsis* sp., é um parasita encontrado no jardim de fungo das attíneas e é altamente virulento, podendo levar à devastação do jardim e matar toda a colônia (CURRIE, 2001b; CURRIE; SCOTT; et al., 1999). *Escovopsis weberi* parasita o fungo mutualista e compete pelo substrato presente no jardim de fungo (REYNOLDS; CURRIE, 2004). Os ninhos infectados por *Escovopsis* spp.

apresentam menor acúmulo de jardim de fungo e há uma diminuição na produção de operárias, mostrando que o parasita tem impacto negativo sobre a simbiose (CURRIE, 2001b). *Escovopsis* sp. secreta substâncias que degradam as células do fungo mutualista e absorvem os nutrientes que são liberados (REYNOLDS; CURRIE, 2004).

Esse gênero de fungo ainda não foi encontrado fora do jardim de fungo das attíneas, nem mesmo no solo adjacente aos seus ninhos. A transmissão de *Escovopsis* sp. é exclusivamente horizontal, sendo que outros inquilinos que visitam os ninhos das formigas podem ser responsáveis por dispersar este parasita (CURRIE; MUELLER; MALLOCH, 1999).

(2) O fungo *Trichoderma* sp. é frequentemente encontrado em ninhos de formigas cortadeiras (RODRIGUES et al., 2005a). *Trichoderma* sp. e *Gliocladium* sp. encontrados em ninhos de *Atta cephalotes* atuam como antagonistas para o fungo mutualista (ORTIZ; ORDUZ, 2001). *Trichoderma harzianum*, algumas estirpes de *Escovopsis weberi* e *Acremonium kiliense* foram selecionados de *Atta sexdens rubropilosa* num estudo de busca por estirpes virulentas de micro fungos que agiam contra o fungo mutualista *Leucoagaricus gongylophorus* (SILVA et al., 2006). Silva e colaboradores (2006) relatam que alguns dos fungos analisados são candidatos em potencial para controlar a incidência de ninhos de formigas cortadeiras em áreas de cultivo.

(3) *Phialophora* spp. são leveduras negras isoladas do fungo mutualista de espécies de *Apterostigma* e atuam como parasita na simbiose com as attíneas (LITTLE; CURRIE, 2007). Elas adquirem os nutrientes necessários para seu desenvolvimento a partir das actinobactérias, suprimindo o crescimento destas. Conseqüentemente, na presença de leveduras negras, a eficiência no controle do parasita *Escovopsis* é diminuída (LITTLE; CURRIE, 2008).

(4) Algumas espécies de leveduras isoladas de ninhos de *Atta sexdens* mostraram produzir a toxina *killer*, e possuem a habilidade de inibir o crescimento do fungo mutualista ou entre elas (CARREIRO et al., 2002).

(5) Os fungos *Fusarium* sp. e *Acremonium strictum* encontrados em ninhos de *Atta sexdens rubropilosa* e podem agir como oportunistas quando as colônias sofrem um estado de desequilíbrio (RODRIGUES et al., 2005b). *Fusarium oxysporum* e *Escovopsis* sp. foram os mais frequentes em ninhos de *Acromyrmex* spp. e parecem competir por nutrientes e possuir também algum grau de patogenicidade, sendo um adversário para a simbiose Attini-jardim de fungo (RODRIGUES et al., 2008a). *Fusarium* sp. e *Acremonium* sp. também foram isolados dos corpos de formigas operárias descartadas no lixo de ninhos mantidos em laboratório (HUGHES; BOOMSMA, 2004).

1.3.3 Simbiontes relacionados à nutrição das formigas

Algumas leveduras encontradas em ninhos das attíneas possuem papéis ainda desconhecidos, mas, provavelmente participam da produção de nutrientes atuando na degradação de folhas através da decomposição de polissacarídeos das plantas (função comum a muitas leveduras) para gerar fonte de carbono para o fungo mutualista e auxiliam na remoção de compostos potencialmente tóxicos, assimilando compostos deletérios para o jardim de fungos e para as formigas (MENDES et al., 2012). Bactérias isoladas do jardim de fungo e do lixo de *Atta sexdens rubropilosa* também parecem ter um papel na nutrição das formigas, pois apresentaram capacidade de degradar biopolímeros por possuírem celulases, pectinases, amilases e proteases (BACCI et al., 1995). AYLWARD e colaboradores (2012) identificaram bactérias associadas ao fungo mutualista e mostraram que essa comunidade bacteriana está envolvida com a ciclagem de nutrientes através da conversão do nitrogênio em vitaminas do complexo B, aminoácidos e outros componentes celulares.

As formigas, para obter acesso ao carbono armazenado nas paredes celulares das plantas, se utilizam das atividades metabólicas de seus jardins de fungos, que atuam como um sistema digestivo auxiliar (PINTO-TOMAS et al., 2009). O fungo mutualista possui adaptações evolutivas em seu genoma que auxiliam na nutrição das formigas Attini (DE FINE LICHT et al., 2013) e na degradação da parede celular das plantas (BACCI et al., 1995; DE SIQUEIRA et al., 1998; SCHIØTT et al., 2008; SCHIØTT et al., 2010). O fungo mutualista não é o único

responsável pelo processo de degradação de biomassa vegetal no jardim de fungo. SUEN e colaboradores (2010) apresentaram a primeira caracterização funcional da microbiota do jardim de fungo, e revelaram uma gama de bactérias associadas ao jardim e que provavelmente participam da degradação da biomassa das plantas.

PINTO-THOMAS e colaboradores (2009) revelaram outro simbiote: *Klebsiella*. Esta bactéria é capaz de captar nitrogênio da atmosfera e torná-lo disponível para o fungo e para as formigas. Bactérias fixadoras de nitrogênio têm sido relatadas associadas aos jardins de fungos (AYLWARD et al., 2012; SUEN et al., 2010).

Existem ainda microrganismos que não tiveram uma função especificada, mas foram encontrados associados aos jardins de fungo em ninhos de *Atta sexdens rubropilosa* (RODRIGUES et al., 2005b); fungos filamentosos em ninhos de *Atta laevigata* (GUEDES; ATTILI-ANGELIS; PAGNOCCA, 2012); micro fungos em jardins de *Cyphomyrmex wheeleri*, *Trachymyrmex septentrionalis* e *Atta texana* (RODRIGUES et al., 2011). Em *Acromyrmex octospinosus* alguns grupos microbianos foram identificados de forma independente de cultivo (VAN BORM; BILLEN; BOOMSMA, 2002) utilizando *primers* específicos para determinados grupos de microrganismos. Foram encontrados os filos Proteobacteria (*Wolbachia* sp., *Caulobacter* sp., Rhizobiaceae, *Escherichia coli*), Actinobacteria (Pseudonocardinae, Propionibacterina e Micrococcinae), Tenericutes (Entomoplasmataceae), Bacteroidetes (*Flexibacter* sp. e *Flavobacterium* sp.), Ascomycota (*Cordyceps* sp.), e Basidiomycota, filo do fungo mutualista, mas as funções atribuídas a cada grupo não foram investigadas neste trabalho.

Os estudos que revelaram a composição bacteriana associada às formigas Attini, na maioria das vezes, estão relacionados aos jardins de fungo objetivando explorar os mecanismos de degradação da biomassa vegetal. Contudo, ainda faltam mais informações sobre a microbiota associada ao tegumento e informações sobre a microbiota associada ao intestino das attíneas e sua função.

1.4 Identificação de microrganismos não cultivados

Nas últimas duas décadas, a aplicação de abordagens genéticas e genômicas, revelou um mundo microbiano surpreendente em sua grande distribuição e diversidade (RASTOGI; SANI, 2011). As metodologias tradicionais

dependentes de cultivo, baseadas no uso de condições seletivas, permitem a recuperação de grupos microbianos específicos com baixa diversidade taxonômica e metabólica. Esses métodos são limitados para a real avaliação da diversidade microbiana. Atualmente, sabe-se que a maior parte dos microrganismos presentes nos ambientes naturais não é cultivável. A principal limitação de técnicas baseadas em cultivo é que mais de 99% dos microrganismos em qualquer ambiente não são cultiváveis (HUGENHOLTZ, 2002).

Ao longo das últimas décadas, o campo da ecologia microbiana teve um enorme progresso, e uma grande variedade de técnicas de biologia molecular têm sido desenvolvidas para a descrição e caracterização filogenética e diversidade funcional dos microrganismos. Métodos independentes de cultivo tornaram-se muito importante para avaliar a ecologia e diversidade microbiana.

A análise de sequências dos genes das subunidades menores dos RNAs ribossomais (rRNAs) é um marco importante no estudo da evolução e classificação de organismos vivos. WOESE e FOX (1977) foram os primeiros a analisar sequências de rRNAs para estudos filogenéticos.

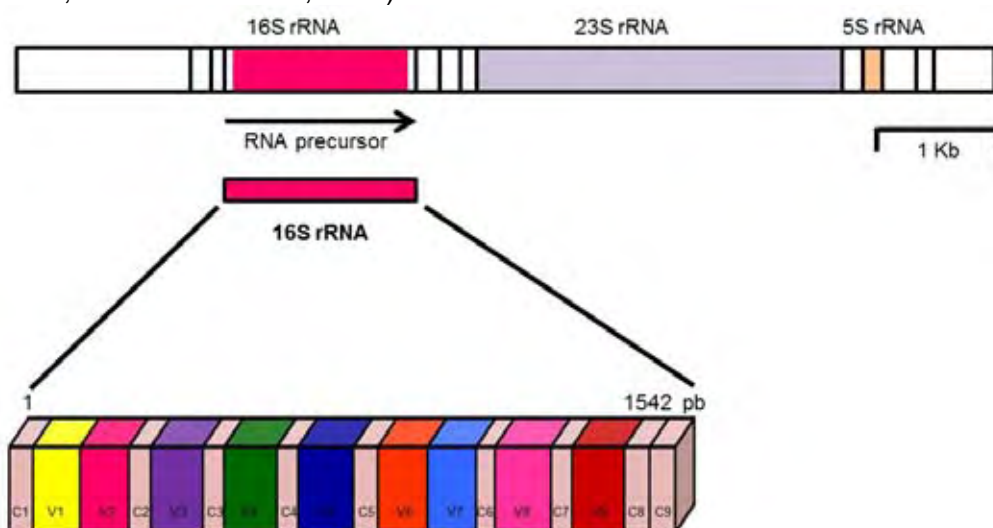
Os RNAs ribossomais estão entre as macromoléculas mais conservadas evolutivamente em todos os seres vivos. Suas sequências são altamente conservadas entre o mesmo gênero e espécie. A determinação destas sequências de DNA possibilita não somente a medida das relações evolutivas entre as moléculas sequenciadas, mas também pode gerar uma visão de evolução dos organismos a partir do qual elas foram geradas (MELO et al., 2002). Com base em análises comparativas destas assinaturas de RNA ribossomal, a vida celular foi classificada em três domínios principais: um eucariótico (Eukarya) e dois procarióticos (Bacteria e Archaea) (RASTOGI; SANI, 2011). Variações nas sequências dos nucleotídeos do gene que codifica a subunidade menor do RNA ribossomal procarioto (16S rRNA) são indícios de mudanças evolutivas.

Ubiquidade nos procariotos, procedência de um ancestral comum, baixa taxa evolutiva, tamanho razoável e a presença de regiões altamente conservadas e regiões hipervariadas, tornaram o gene 16S rRNA um dos marcadores moleculares mais utilizados e mais importantes para o estudo de filogenia e ecologia microbiana (PETROSINO et al., 2009).

O sequenciamento deste gene permite a identificação de microrganismos e tem sido amplamente utilizado para caracterizar comunidades microbianas. A

identificação precisa de isolados bacterianos é uma das funções mais importantes de laboratórios de microbiologia clínica (WOO et al., 2008). Sua sequência pode ser usada para medir distâncias filogenéticas, mesmo entre os organismos mais distintamente relacionados. As regiões altamente conservadas permitem o alinhamento das sequências, enquanto que as regiões altamente variáveis oferecem grandes possibilidades para o desenho de sondas e *primers* específicos (PETROSINO et al., 2009) (Figura 2).

Figura 2 Representação esquemática das regiões conservadas (C1-C9) e regiões hipervariadas (V1-V9) do gene 16S rRNA. Adaptado de (PETROSINO et al., 2009; VAUGHAN et al., 1999)



Não existe um consenso sobre a definição de gênero ou espécie bacteriana por comparação de sequências do gene 16S rRNA (CLARRIDGE, 2004). O sequenciamento do gene 16S rRNA muitas vezes não fornece informações suficientes para a identificação em nível de espécie (ZEIGLER, 2003), limitando os estudos à classificação de taxa no nível de gênero ou acima (SUNDQUIST et al., 2007). A classificação dos microrganismos é controversa, geralmente sequências do gene 16S rRNA com identidade maior que 97% são atribuídas à mesma espécie (BRENNER; STALEY; KRIEG, 2005; DRANCOURT; RAOULT, 2005) e se possuem identidade maior que 95% são atribuídas ao mesmo gênero. O critério de 97% similaridade que define espécie é o mais utilizado na identificação de sequências do gene 16S rRNA. Já BOSSHARD e colaboradores (2003) definiram que bactérias pertencem à mesma espécie se suas sequências apresentam 99% de similaridade

ou mais e pertencem ao mesmo gênero se suas sequências apresentarem entre 95 e 99% de similaridade.

O tamanho adequado (aproximadamente 1500 pares de bases - pb), e crescente número de sequências de 16S rRNA disponíveis em bancos genéticos para a comparação de sequências como o GenBank[®] (BENSON et al., 2013) do *National Institutes of Health*, e o banco curado de sequências 16S rRNA do *The Ribosomal Database Project* – RDP (COLE et al., 2009), ainda tornam este gene uma grande escolha em ecologia microbiana.

O uso de técnicas independentes de cultivo no estudo da ecologia microbiana teve início com a construção de bibliotecas 16S rRNA, um dos métodos mais sensíveis, até o surgimento de novas tecnologias para obtenção de sequências (Pirossequenciamento, Solid, Illumina e Ion torrent são alguns exemplos). A metodologia para construção de bibliotecas 16S rRNA, utiliza o DNA genômico total extraído diretamente do meio ambiente, ampliações por reação em cadeia da polimerase (PCR) com marcadores universais (ou derivados destes marcadores), clonagem e sequenciamento de primeira geração (Sanger), tornando possível a identificação de microrganismos não cultiváveis através de comparações de suas sequências nos bancos genéticos. O procedimento de transformação do gene 16S rRNA exige o sequenciamento de um grande número de clones para detectar taxas com baixa abundância, mas é eficaz para caracterizar comunidades com baixa diversidade. Dados deste tipo são relevantes para se conhecer a composição e estrutura da comunidade microbiana, no entanto, o método é limitado quanto à geração de informação a respeito da fisiologia dos microrganismos não cultivados. As bibliotecas 16S rRNA geralmente contêm menos que 1000 clones e, por conseguinte, as sequências revelam, dependendo do tipo de amostra estudada, apenas uma pequena porção da diversidade microbiana (RASTOGI; SANI, 2011).

Análise de microrganismos independente de cultivo permite estudar a diversidade genética dos microrganismos sem a necessidade de cultivá-los. Fragmentos amplificados com *primers* universais por PCR são diretamente sequenciados através dos sequenciamentos de segunda geração como o Pirossequenciamento, Solid, Illumina ou Ion torrent. Usando-se esta abordagem metodológica é possível sequenciar simultaneamente milhares ou milhões de fragmentos de DNA.

Outra abordagem independente de cultivo é a metagenômica que analisa o conjunto de genomas de todos os microrganismos presentes em determinado ambiente. A metagenômica também pode ter uma abordagem funcional e analisar o conjunto de genes expressos (metatranscriptoma) ou ainda os produtos produzidos em determinada comunidade (metaproteômica). Essa estratégia permite o acesso às características dos microrganismos não cultivados, agregando informações sobre a diversidade metabólica das comunidades microbianas. Os dados produzidos em larga escala representam considerável desafio para a bioinformática. *Pipelines* (ferramentas da bioinformática que segue um fluxo ordenado, onde os dados de saída são a entrada da próxima etapa) têm sido criados para otimizar o tempo de análise dos dados.

Uma das ferramentas para análises de dados derivados de bibliotecas 16S rRNA é o MOTHUR (SCHLOSS et al., 2009), que utiliza unidade taxonômicas operacionais (OTUs) para analisar a diversidade de microrganismos. FERRO (2013) desenvolveu um *pipeline* (16Scan, não publicado) para análises de diversidade e identificação de sequências 16S rRNA. Neste *pipeline* o programa ClustalW2 (versão recente do programa ClustalW) alinha as sequências (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994), e o programa MOTHUR gera curvas de rarefação, índices de riqueza e diversidade e permite a comparação de amostras. Após as análises são gerados gráficos de todos os processos (FERRO, 2013).

As abordagens independentes de cultivo é uma das saídas para estudos de associações entre insetos e seus simbioses, já que muitas vezes o cultivo destes microrganismos não é possível, principalmente pela escassez de meios seletivos. Descobertas de muitas associações entre insetos sociais e microrganismos simbioses permitiram a bioprospecção destas bactérias não cultiváveis, e contribuíram para o entendimento da história evolutiva e das adaptações das bactérias para a simbiose e para o estabelecimento de inferências a respeito da importância destas interações (GIL; LATORRE; MOYA, 2004; KIKUCHI, 2009).

1.5 Evolução da simbiose

A formação das associações simbióticas com microrganismos benéficos que conferem capacidades fisiológicas novas a seus hospedeiros tem sido descrita como uma forma de inovação evolutiva (ZILBER-ROSENBERG; ROSENBERG, 2008). A

formação de simbiose com microrganismos capacitam os hospedeiros a ter acesso a nutrientes da biomassa das plantas ou ainda a desenvolver estratégias para defendê-los de parasitas (DOUGLAS, 2009). As formigas Attini são exemplos marcantes de insetos herbívoros que ganham acesso aos nutrientes do material vegetal por meio de simbioses com microrganismos.

A seleção natural é a chave para a compreensão de como a simbiose evolui. Em uma dada população, alguns organismos terão características que são mais vantajosas para a reprodução bem sucedida do que outros, por exemplo. Desta forma, se um microrganismo é transmitido verticalmente e isso é útil para as colônias das formigas, então maior aptidão será atribuída para este microrganismo (BARKE et al., 2011). As associações mutualísticas provavelmente começaram como uma relação facultativa. Ao longo de muitas gerações os organismos simbiontes passam a depender mais um do outro. Eventualmente, a simbiose torna-se a única fonte de alimento, abrigo, enzimas ou outras necessidades para os simbiontes.

Mas, como formigas selecionam essas bactérias que são úteis a partir da comunidade microbiana diversificada do meio ambiente? E como essas bactérias benéficas sobrepujam as outras bactérias para manter sua simbiose com as formigas Attini? Essas questões são o foco de duas teorias sobre mutualismo, conhecidas como *Partner Fidelity Feedback* - PFF e *Partner Choice* - PC e foram discutidas no artigo de BARKE e colaboradores (2011).

Sobre a teoria PFF, uma força exógena (por exemplo, codispersão) alinha os interesses de duas espécies e faz com que o comportamento mutualista evolua, pois quando o microrganismo simbiote ajuda o hospedeiro, o hospedeiro que se torna mais saudável, automaticamente, retorna os benefícios para o simbiote (WEYL et al., 2010). Como exemplo a actinobactéria *Pseudonocardia*, que teria sido recrutada no início da evolução das formigas Attini e, devido à codispersão, evoluiu para se tornar uma mutualista. Esta teoria é a razão pela qual a explicação da coevolução da associação attíneas-*Pseudonocardia* foi aceita (BARKE et al., 2011).

Já a teoria PC postula que os hospedeiros selecionam simbiontes benéficos de um conjunto onde estão todos os possíveis simbiontes, conduzindo ao mutualismo (BULL; RICE, 1991). Mas como as formigas evitam o recrutamento de bactérias prejudiciais ou que não teriam funções benéficas a elas? A teoria *Microeconomic* (ARCHETTI et al., 2011) fornece mecanismos para o sucesso da teoria PC: se um hospedeiro pode estabelecer condições que favoreçam mutualistas

e desfavoreçam parasitas, apenas os simbioses benéficos irão evoluir para colonizar tais hospedeiros.

Uma questão para a associação entre formigas Attini e actinobactérias é como manter a eficácia do antibiótico, uma vez que os patógenos especialistas devem desenvolver resistência. A solução teria sido recrutar várias actinobactérias do solo, assim, os múltiplos antibióticos que elas produzem poderiam ajudar as formigas a retardar a evolução da resistência (BARKE et al., 2011). O que reforça os achados em outros trabalhos (MUELLER et al., 2010; SEN et al., 2009).

Outra teoria sobre evolução da simbiose é a do hologenoma, que considera o holobionte (o animal ou planta com todos os seus microrganismos associados) como uma unidade de seleção na evolução. O hologenoma é definido como a soma da informação genética do hospedeiro e de seus microrganismos. A teoria do hologenoma postula que (i) todos os animais e plantas estabelecem relações simbióticas com microrganismos; (ii) os microrganismos simbioses são transmitidos entre gerações e, portanto, podem também influenciar a evolução do holobionte; (iii) a associação entre o hospedeiro e o simbiote afeta a aptidão do holobionte dentro de seu ambiente; (iv) variação no hologenoma pode ser provocada por mudanças tanto no genoma do hospedeiro quanto no genoma da microbiota, e sob estresse ambiental, essa mudança pode ser rápida (ZILBER-ROSENBERG; ROSENBERG, 2008). A teoria do hologenoma considera toda a microbiota diversificada associada ao animal ou à planta como parte do holobionte evoluindo. Assim, a teoria do hologenoma se encaixa dentro do âmbito de superorganismo, que é uma comunidade multiespécies que funciona como uma unidade organizacional (WILSON; SOBER, 1989). O mutualismo entre as formigas Attini e o jardim de fungos representam um exemplo clássico de superorganismo (SEAL; TSCHINKEL, 2007).

2 OBJETIVOS

Geral:

Caracterização das comunidades bacterianas associadas às formigas Attini *Atta laevigata*, *Trachymyrmex urichi* e *Mycocepurus goeldii* por métodos independentes de cultivo.

Específicos:

1. Desenvolvimento de um protocolo de lavagem para eliminar as bactérias presentes no tegumento das formigas e que permite posterior diferenciação das bactérias internas e externas associadas às formigas.
2. Inferência sobre prováveis funções das novas bactérias simbiotes associadas a estas formigas.
3. Triagem da frequência de associação de bactérias simbiotes prevalentes em outras espécies de *Atta* e outros gêneros de formigas Attini através de marcadores moleculares específicos desenhados a partir do gene 16S rRNA.
4. Caracterização filogenética para cada grupo microbiano estudado.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material biológico

Indivíduos de três espécies de formigas Attini (Tabela 1) foram selecionados para análise da diversidade de bactérias associadas a essas formigas através da construção de bibliotecas 16S rRNA (Figura 3). Um ninho de cada espécie de formiga foi amostrado: (i) indivíduos de *A. laevigata* foram coletados nas entradas do ninho; (ii) os ninhos de *T. urichi* e *M. goeldii* foram escavados e indivíduos das duas espécies foram coletados das câmaras e também próximos à entrada de cada ninho.

O procedimento de coleta foi realizado de forma asséptica, com uso de materiais esterilizados (luvas, pinças, espátulas e frascos) para evitar a contaminação das amostras. Após a coleta, as formigas foram acondicionadas em microtubos de 2,0 mL e armazenadas a -80 °C até o processamento.

Tabela 1 Sumário das características das formigas coletadas para a construção das bibliotecas 16S rRNA.

	Formigas Attini	Agricultura*	ID	Local
1	<i>Atta laevigata</i> (Smith, 1858)	Cortadeira	ACM201009	Rio Claro - SP
2	<i>Trachymyrmex urichi</i> (Forel, 1893)	Derivada	ACM030910	Rio Claro - SP
3	<i>Mycocepurus goeldii</i> (Forel, 1893)	Basal	ACM030910	Rio Claro - SP

*(SCHULTZ; BRADY, 2008)

Figura 3 Espécies de formigas Attini utilizadas para o estudo de associações bacterianas. Figuras (ANTWEB, 2002): *A. laevigata* e *M. goeldii* (fotos de April Nobile), *T. urichi* (foto de Will Ericson).



3.2 Avaliação da sensibilidade da PCR

Para a avaliação da sensibilidade da PCR, foram utilizadas amostras de DNA extraído de soldados de *A. laevigata* e diluições seriadas de um clone contendo um inserto de tamanho conhecido em vetor pJET (Fermentas) e transformado em *Escherichia coli* (DH10B). As extrações de DNA foram realizadas com o *Spin Invisorb Tissue Mini Kit* (Invitex).

As amostras de DNA de formiga foram testadas em diferentes concentrações adicionando ou não a cultura do clone de *E. coli*. O objetivo foi avaliar a quantidade de DNA bacteriano necessário para que a amplificação do gene 16S rRNA não fosse prejudicada pelo DNA da formiga, presente nas amostras.

A cultura do clone, a partir de uma colônia isolada, foi realizada em meio de cultura CG (Circle Grow) líquido contendo ampicilina (20 µg/mL), a 37 °C e sob agitação de 180 rpm durante uma noite, quando então realizou-se a diluição seriada (10^{-1} a 10^{-10}). Cada diluição foi semeada três vezes em placa contendo meio CG-ágar com ampicilina e incubada durante 12 h a 37 °C. As colônias que cresceram foram contadas, e o número total de colônias foi usado para determinar a densidade bacteriana em unidades formadoras de colônia (UFC), calculadas utilizando a fórmula:

$$\text{UFC} = \text{n}^\circ \text{ de colônias na placa} \times \text{diluição/volume plaqueado}$$

As amostras da diluição seriada foram submetidas às PCRs utilizando os pares de *primers*: pJET-F e pJET-R, que amplificam o inserto transformado em *E. coli* gerando fragmento de aproximadamente 600 pb; e 27F (5'-AGAGTTTGATCA/CTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-TACGGT/CTACCTTGTT ACGACTT-3') (POLZ; CAVANAUGH, 1998), que amplificam o gene 16S rRNA gerando um fragmento com aproximadamente 1500 pb. As reações foram realizadas com o *The PureTaq RTG kit* (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante, com volume final de 25 µL e 5 pmol de cada *primer*. As condições da PCR para o *primer* do gene 16S rRNA foram: 5 min de desnaturação inicial a 95 °C, 35 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 50 °C e 3 min a 72 °C. As condições para as amplificações utilizando os *primers* do vetor pJET foram as recomendadas pelo fabricante. O DNA foi analisado em gel de agarose 1%, separado em eletroforese a 3,0 V/cm⁻¹ em tampão TBE 1X. O marcador de peso molecular utilizado foi de 1,0 Kb (New England Biolab®). As

amostras foram coradas com brometo de etídio para visualização em luz UV e fotografadas.

3.3 Protocolo de lavagem

Para a padronização do protocolo de lavagem, foram utilizados soldados de *A. laevigata* e o mesmo clone de *E. coli* usado para a avaliação da sensibilidade da PCR. O clone de *E. coli* foi utilizado para contaminar a formiga e ser um controle da lavagem.

Foram inoculadas 35 UFC do clone de *E. coli* no gáster de cada soldado e após 48 horas de incubação à temperatura ambiente, os procedimentos de lavagem foram iniciados. Foram testadas como soluções de lavagem: água ultrapura, etanol 70%, hipoclorito de sódio 2% e tween 20. Cada solução foi adicionada a um microtubo de 1,5 mL contendo uma única formiga. O tubo foi submetido à agitação em vórtex por 10 seg e sonicação por 10 min para desagregar células bacterianas externas que poderiam estar aderidas à cutícula das formigas. A formiga foi então transferida para um microtubo novo e procedeu-se à lavagem com água ultrapura. Os processos de vórtex e sonicação foram então repetidos uma vez.

Após a aplicação do método de lavagem, foi realizada a extração de DNA, utilizando o *Spin Invisorb Tissue Mini Kit* (Invitex) de acordo com as instruções do fabricante. Amplificações do inserto presente nos vetores pJET foram realizadas utilizando os pares de *primers* pJET-F e pJET-R (Fermentas) e o *The PureTaq RTG kit* (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante. A presença de *amplicons* do inserto em pJET em gel de agarose indicou a presença da *E. coli* inoculada, enquanto a ausência de *amplicons* pJET indicou o sucesso do protocolo de lavagem.

3.4 Dissecções de intestinos de formiga

As dissecções do intestino de *A. laevigata* foram realizadas para validar o protocolo de lavagem, através de comparações entre as bibliotecas 16S rRNA do intestino da formiga e de formigas lavadas e não lavadas. Intestinos de dez soldados de *A. laevigata* foram dissecados em lupa estereomicroscópica, colocando-se o

material sobre uma lâmina de vidro contendo uma gota de NaCl 0,9%. Os intestinos foram externamente esterilizados por imersão em etanol 70%, seguido de duas lavagens em água destilada e exposição à radiação UV por 20 min (250 nm) (VAN BORM; BUSCHINGER; et al., 2002) e, agrupados em um único tubo para extração de DNA com o *Spin Invisorb Tissue Mini Kit* (Invitex).

3.5 Construção de bibliotecas 16S rRNA

Para a construção das bibliotecas 16S rRNA foram utilizadas as formigas *A. laevigata*, *T. urichi* e *M. goeldii*. Um pool de 10 indivíduos lavados e outro de 10 indivíduos não lavados de cada espécie de formiga foram macerados com nitrogênio líquido e logo após iniciou-se as extrações de DNA com o *Spin Invisorb Tissue Mini Kit* (Invitex).

A amplificação do gene 16S rRNA foi feita por PCR com os *primers* universais 27F e 1492R. As reações foram realizadas com *The PureTaq RTG kit* (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante, com volume final de 25 μ L e 5 pmol de cada *primer*. As condições da PCR foram 5 min de desnaturação inicial a 95 °C, 35 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 50 °C e 3 min a 72 °C, com extensão final de 10 min a 72 °C. Os *amplicons* foram purificados usando *GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit* (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante.

A extração de DNA e a presença de *amplicons* foram confirmadas em gel de agarose 1% separado em eletroforese a 3,0 V/cm⁻¹ em tampão TBE 1X. O marcador de peso molecular utilizado foi de 1,0 Kb (Fermentas). As amostras foram coradas com GelRed™ (Uniscience) para visualização em luz UV, foto-documentadas e quantificadas em NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

Os produtos de PCR foram transformados em células competentes *E. coli* DH10B ou DH5 α (Life Technologies) usando o *pGEM®-T Easy Vector Systems* (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. O sistema de α -complementação foi utilizado em placas contendo meio LB com ampicilina (100 μ g/mL) e X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) a 37 °C. As colônias (clones) brancas selecionadas cresceram em meio LB líquido com ampicilina (100 μ g/mL) por 22 horas, para a realização da extração do DNA plasmidial (*miniprep*). A *miniprep* seguiu o protocolo de lise alcalina (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

A reação de sequenciamento foi realizada utilizando o *BigDye Terminator*[®] kit v 3.1 (Life Technologies) com o *primer* vetorial M13F, volume final de 10 µL, 3,2 pmol de cada *primer* e 0,5 a 1 µg da amostra de DNA. As condições da PCR foram 2 min de desnaturação inicial a 96 °C, 28 ciclos de 46 seg a 96 °C, 30 seg a 50 °C e 4 min a 60 °C. Sequências de *amplicons* que entraram invertidas no vetor foram ressequenciadas com o primer vetorial M13R. As reações foram purificadas e as sequências determinadas no sequenciador automático ABI 3500 (Life Technologies).

3.6 Análise das sequências

As etapas de análise das sequências foram realizadas no sistema operacional Linux Debian, de forma automatizada utilizando a ferramenta computacional EGene (DURHAM et al., 2005), que é um sistema de geração *pipelines* para pré-processamento de sequências. As sequências geradas passaram por uma etapa de pré-processamento, onde inicialmente foram verificadas se as bases atribuídas pelo sequenciador continham apenas trechos com qualidade Phred maior que 20. Posteriormente, foi realizada a limpeza das sequências, visando a identificação e retirada dos trechos contendo vetor e *primer* que poderiam prejudicar análises posteriores. Após essas filtragens de qualidade e limpeza, foram ainda selecionadas as sequências com tamanho mínimo de 300 pb.

As sequências foram alinhadas usando o *Pyrosequencing Aligner* do *Ribosomal Database Project* (RDP), que utiliza a ferramenta *Infernal Aligner* (NAWROCKI; EDDY, 2007), a qual permite o alinhamento múltiplo de sequências (MSA) levando em consideração a estrutura secundária do gene 16S rRNA (SCHLOSS, 2009). Após o alinhamento, as sequências foram analisadas e editadas no programa BioEdit versão 7.1.3 (HALL, 1999). Sequências completas de genes 16S rRNA recuperadas do banco de sequências genéticas GenBank[®], foram utilizadas para guiar o alinhamento. Essas sequências são representativas da diversidade de bactérias encontrada nas amostras das formigas Attini e pertencem aos grupos: *Arthrobacter* (JQ966221), *Kaistobacter* (JN852951), *Acetobacter* (AB681086), *Burkholderia* (JQ979083), *Rhizobium* (AB663504), *Wolbachia* (JQ726771), *Acidobacteria* (JQ793466), *Bacillus* (JQ946083) e *Bacteroidetes* (HM215037).

3.7 Atribuição taxonômica das sequências do gene 16S rRNA e funcional aos taxons identificados

Sequências usadas como guia foram descartadas do alinhamento o qual foi então dividido numa combinação de subconjuntos representativos de duas ou três das bibliotecas 16S, uma vez que o programa MOTHUR (SCHLOSS et al., 2009) analisa somente até quatro bibliotecas simultaneamente. Através deste programa, sequências que mostraram pelo menos 97% de similaridade entre si foram atribuídas a uma única espécie baseado no critério de unidade taxonômica operacional molecular (MOTU). MOTHUR também foi utilizado para calcular os índices de diversidade e riqueza que expressam a diversidade alfa e beta das comunidades bacterianas, para desenhar diagramas de Venn comparando a distribuição das espécies em diferentes amostras e, para gerar curvas de rarefação acessando a cobertura amostral. A designação taxonômica das espécies foi realizada através de uma pesquisa na base de dados do GenBank® não redundante utilizando o programa BLASTn (ALTSCHUL et al., 1990). Uma sequência representativa de cada espécie foi usada como consulta.

O critério de 97% de similaridade que define espécie é o mais utilizado na identificação de sequências 16S rRNA e foi o adotado neste trabalho. A atribuição de gênero foi com 95-97%, família com 90-95%, ordem com 85-90%, classe com 80-85% e filo com 75-80% (ISHAK et al., 2011a). A classificação taxonômica foi utilizada para tentar atribuir funções às espécies e classificá-las como bactérias mutualistas, parasitas ou comensais, com base em dados de literatura sobre as espécies bacterianas similares encontradas em diferentes ambientes.

3.8 Análise de Coordenadas Principais (PCoA)

Sequências representativas de cada espécie e uma sequência de Archaea (utilizada como grupo externo para enraizamento da árvore: Archaeon não cultivado, KC156588) foram alinhadas, e o alinhamento foi usado para construir uma árvore de máxima verossimilhança (ML) através do programa MEGA v 5.2.2 (TAMURA et al., 2011). Esta árvore foi carregada na ferramenta *on-line* UniFrac (LOZUPONE; HAMADY; KNIGHT, 2006) para calcular a Análise de Coordenadas Principais (PCoA) e determinar se as diferentes espécies de formigas abrigam diferentes

comunidades bacterianas. A abordagem utilizada foi a UniFrac ponderada, que leva em conta a abundância relativa de sequências bacterianas presentes nas diferentes amostras. Valores normalizados e não normalizados foram testados (a normalização coloca as comparações entre pares na mesma escala). Para verificar se as comunidades bacterianas foram significativamente diferentes foram realizados testes de significância UniFrac. Os valores *p*, que comparam cada comunidade bacteriana com outra, foram corrigidos para comparações múltiplas através da multiplicação do valor de *p* calculado pelo número de comparações feitas (correção de Bonferroni).

3.9 Pesquisa de espécies de bactérias em outras espécies de formigas Attini

Quatro grupos de bactérias simbiotes foram destacados a partir das análises das bibliotecas 16S rRNA. Para pesquisar esses grupos bacterianos em outras formigas, foram utilizados exemplares depositados na coleção entomológica (Tabela 2) do Laboratório de Evolução Molecular (LEM) na UNESP; incluindo no estudo os cinco tipos de agricultura das formigas cultivadoras de fungo (Schultz e Brady, 2008). As formigas da coleção entomológica estavam armazenadas em etanol 90% e não foram lavadas antes do levantamento.

Tabela 2 Formigas da coleção entomológica do LEM utilizadas para a prospecção de bactérias simbiotes.

	Formigas Attini	Agricultura*	ID	Local
1	<i>Atta bisphaerica</i> (Forel, 1908)	Cortadeira	E298	Botucatu - SP
2	<i>Atta capiguara</i> (Gonçalves, 1944)	Cortadeira	IS060307-03	Aracaju - SE
3	<i>Atta cephalotes</i> (Linnaeus, 1758)	Cortadeira	E512	Não especificado
4	<i>Atta colombica</i> (Guérin-Méneville, 1844)	Cortadeira	E523B	Não especificado
5	<i>Atta opaciceps</i> (Borgmeier, 1939)	Cortadeira	IS060307-02	Aracaju - SE
6	<i>Atta sexdens rubropilosa</i> (Forel, 1908)	Cortadeira	E404	Rio Claro - SP
7	<i>Atta texana</i> (Buckley, 1860)	Cortadeira	E521	Não especificado
8	<i>Acromyrmex coronatus</i> (Fabricius, 1804)	Cortadeira	SES040130-10	Alta Floresta - MT
9	<i>Sericomyrmex</i> sp. (Mayr, 1865)	Derivada	E953	Carlinda - MT
10	<i>Cyphomyrmex auritus</i> (Mayr, 1887)	Tipo levedura	TRS111012-06	Blumenau - SC
11	<i>Mycetarotes parallelus</i> (Emery, 1906)	Basal	JSC111027-02	Rio Claro - SP
12	<i>Myrmicocrypta</i> cf. <i>squamosa</i> (Smith, 1860)	Basal	TRS110921-02	Brasília - DF
13	<i>Apterostigma megacephala</i> (Lattke, 1999)	Tipo coral	JSC110910-03	Parauapebas - PA

*(SCHULTZ; BRADY, 2008)

Os DNAs das formigas da coleção foram extraídos com o *Spin Invisorb Tissue Mini Kit* (Invitek). Para a amplificação dos simbiotes selecionados, *primers*

específicos foram desenhados (Tabela 3) para hibridizar numa região hipervariável do gene 16S rRNA de cada simbionte.

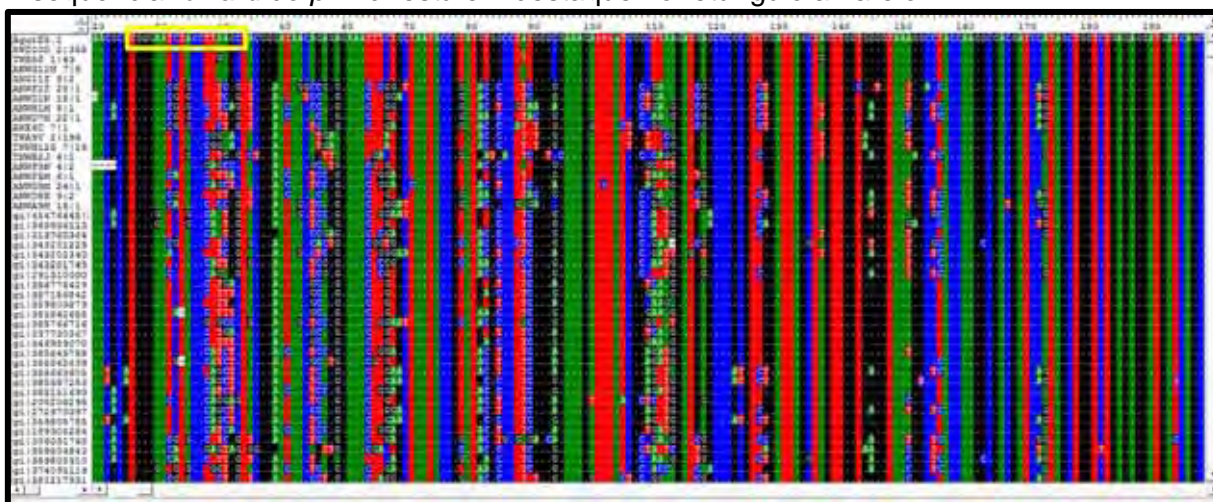
Tabela 3 Primers utilizados para as PCR de diagnóstico. O gene alvo das amplificações é o 16S rRNA.

Nome do primer	Espécies-alvo	Sequências dos primers	Amplicon pb	Ta*
Acet	<i>Acetobacter</i> sp.	F: 5' CGATAGCTGTCAGATGTGA 3' R: 5' GACACCGAATGATAAATCATCC 3'	270	56,3 °C
Burk	<i>Burkholderia</i> sp.	F: 5' CTCGCGCTATAGGGTTGG 3' R: 5' CCTCTCAGCAGGATTCCGAC 3'	800	58,6 °C
Prop	Propionibacteriaceae	F: 5' GTAACGGCTACCAAGGCTTC 3' R: 5' GTATCGGAAGCAGGCTCCAGG 3'	400	60 °C
Rhiz	Rhizobiales	F: 5' TGGGAATCTACCTTAAGC 3' R: 5' GATTTCACCTCTGACTTATC 3'	470	50 °C

* Temperatura de anelamento; • F: *primer forward* e R: *primer reverse*.

A figura 4 mostra parte do alinhamento de sequências utilizadas no desenho do *primer* específico para amplificar a bactéria Rhizobiales sp. 2. As regiões variáveis podem diferir em tamanho e são muito utilizadas para a classificação universal das bactérias (PETROSINO et al., 2009). De modo similar, alinhamentos foram feitos e *primers* desenhados para os demais grupos bacterianos prospectados. Para proceder a tais prospecções, o DNA de cada espécie de formiga foi testado em triplicata.

Figura 4 Alinhamento de sequências utilizadas para o desenho do *primer* Rhiz. A sequência *foward* do *primer* está em destaque no retângulo amarelo.



3.10 Análises filogenéticas

Análises filogenéticas foram realizadas para inferir as relações evolutivas, através do programa MEGA v 5.2.2 (TAMURA et al., 2011) utilizando o método de máxima verossimilhança, baseado no modelo de distâncias evolutivas nos parâmetros Kimura-2 (KIMURA, 1980). Para estas análises, foram incluídas as sequências derivadas das ampliações com os *primers* específicos dos simbiontes selecionados, sequências oriundas das bibliotecas 16S rRNA que pertenceram à mesma Ordem do simbionte para qual o *primer* foi desenhado e, sequências relacionadas do GenBank®, alinhadas com o *Infernal Aligner* (NAWROCKI; EDDY, 2007). Valores de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985) foram estimados utilizando ML e 1000 pseudo-réplicas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise da sensibilidade da PCR

A análise da sensibilidade da PCR foi realizada a fim de compreender os vieses que podem ser causados pela interferência do DNA da formiga na amplificação do gene bacteriano 16S rRNA. Primeiramente foi avaliada a sensibilidade das reações sem a interferência do DNA de formiga. Foram realizadas reações de amplificação com *primers* do vetor pJET (Figura 5A), e do gene 16S rRNA (Figura 5B) em amostras da cultura do clone de *E. coli* e de sua diluição seriada (Tabela 4). *Amplicons* do inserto em vetor pJET de amostras com até 0,02 UFC geraram bandas, o que sugere que algumas células podem ter se rompido e liberado o material genético no meio, fazendo com que fosse possível amplificar até mesmo quantidades menores que uma UFC. Uma UFC já é suficiente para a visualização de *amplicon* do gene 16S rRNA no gel de agarose (Figura 5B, amostra 8).

Figura 5 Amplificações do inserto em pJET (A) e do gene 16S rRNA (B) nas amostras da diluição seriada do clone de *E. coli*. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. (M) Marcador 1Kb, (C-) Controle negativo, (1) Cultura inicial, (2) Cultura diluída 10^{-1} , (3) Cultura diluída 10^{-2} , (4) Cultura diluída 10^{-3} , (5) Cultura diluída 10^{-4} , (6) Cultura diluída 10^{-5} , (7) Cultura diluída 10^{-6} , (8) Cultura diluída 10^{-6} (50%), (9) Cultura diluída 10^{-7} , (10) Cultura diluída 10^{-8} , (11) Cultura diluída 10^{-9} , (12) Cultura diluída 10^{-10} .

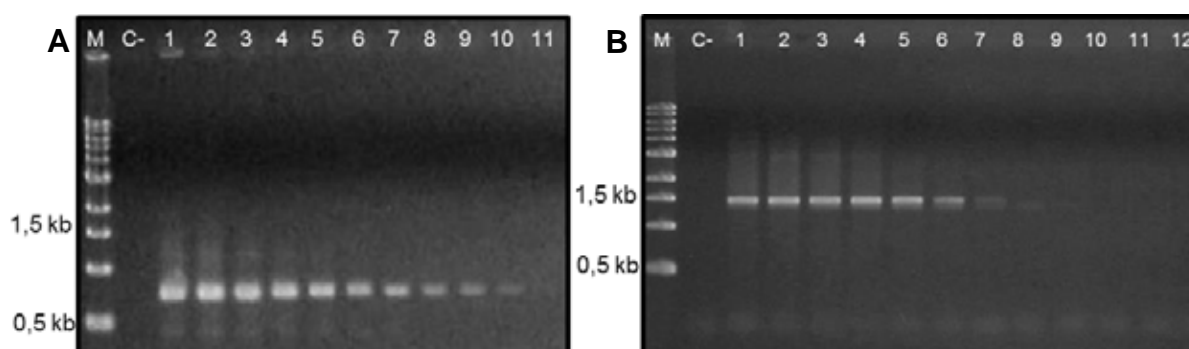
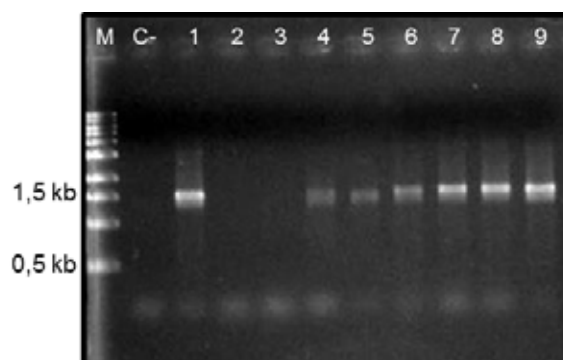


Tabela 4 Diluição seriada da cultura do clone de *E. coli* e suas respectivas UFCs.

Amostras	UFC/μL
Cultura inicial não diluída	2.000.000
Cultura diluída 10^{-1}	200.000
Cultura diluída 10^{-2}	20.000
Cultura diluída 10^{-3}	2.000
Cultura diluída 10^{-4}	200
Cultura diluída 10^{-5}	20
Cultura diluída 10^{-6}	2
Cultura diluída 10^{-6} (50%)	1
Cultura diluída 10^{-7}	0,2
Cultura diluída 10^{-8}	0,02
Cultura diluída 10^{-9}	0,002
Cultura diluída 10^{-10}	0,0002

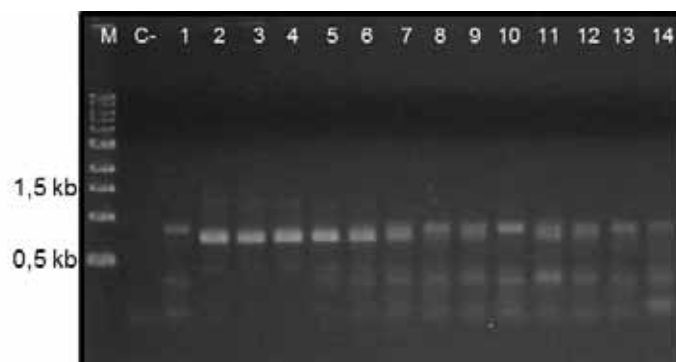
Para verificar a interferência do DNA de formiga nas amplificações com o *primer* 16S rRNA, foram testadas amostras de DNA de formiga em diferentes concentrações adicionando ou não a cultura do clone de *E. coli* (Figura 6). As reações com menores concentrações de DNA apresentaram melhor resultado, tanto nas amostras somente do DNA da formiga quanto nas amostras do DNA da formiga com a cultura diluída. Os *amplicons* visualizados nas amostras sem inóculo de *E. coli*, são das bactérias associadas às formigas. Em decorrência deste resultado, a quantidade de 10 ng de DNA da formiga foi escolhida para as análises subsequentes.

Figura 6 Amplificações do gene 16S rRNA de cultura de *E. coli* diluída a 10^{-3} com diferentes concentrações de DNA de formiga. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. (M) Marcador 1Kb, (C-) Controle negativo, (1) Cultura do clone *E. coli* diluída 10^{-3} , (2) 200 ng de DNA de formiga, (3) 100 ng de DNA de formiga, (4) 50 ng de DNA de formiga, (5) 10 ng de DNA de formiga, (6) 200 ng de DNA de formiga + cultura diluída, (7) 100 ng de DNA de formiga + cultura diluída, (8) 50 ng de DNA de formiga + cultura diluída, (9) 10 ng de DNA de formiga + cultura diluída.



Após determinação da quantidade ideal de DNA de formiga, foi testada a quantidade mínima de bactéria capaz de ser amplificada por PCR. Aos 10 ng de DNA de formiga foram adicionados 1,0 μL (da diluição seriada do clone de *E. coli*) para amplificações com o *primer* pJET (Figura 7). Até a quantidade de 200 UFC (Figura 7, amostra 7), a concentração de DNA de formiga não interferiu na formação de *amplicons* do inserto em pJET. A partir de 20 UFC, os produtos amplificados não correspondem mais aos *amplicons* do clone de *E. coli*, mas somente aos de formiga (resultado de uma amplificação inespecífica). Portanto, bactérias raras associadas às formigas possivelmente não serão amplificadas pela PCR. No entanto, é um limite claro na metodologia de amplificação de sequências 16S rRNA que organismos menos comuns dificilmente são detectados (WOO et al., 2008).

Figura 7 Amplificações do inserto em pJET, a partir de quantidades diferentes de *E. coli* (diluição seriada) na quantidade de 10 ng de DNA de formiga. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. (M) Marcador 1Kb, (C-) Controle negativo, (1) 10 ng de DNA de formiga, (2) Cultura inicial de *E. coli*, (3) Cultura inicial + DNA de formiga, (4) Cultura diluída 10^{-1} + DNA de formiga, (5) Cultura diluída 10^{-2} + DNA de formiga, (6) Cultura diluída 10^{-3} + DNA de formiga, (7) Cultura diluída 10^{-4} + DNA de formiga, (8) Cultura diluída 10^{-5} + DNA de formiga, (9) Cultura diluída 10^{-6} + DNA de formiga, (10) Cultura diluída 10^{-6} (50%)+ DNA de formiga, (11) Cultura diluída 10^{-7} + DNA de formiga, (12) Cultura diluída 10^{-8} + DNA de formiga, (13) Cultura diluída 10^{-9} + DNA de formiga, (14) Cultura diluída 10^{-10} + DNA de formiga.



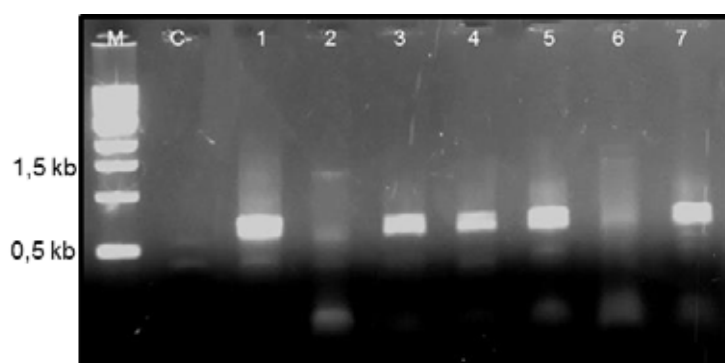
4.2 Desenvolvimento do protocolo de lavagem

O protocolo de lavagem das formigas foi desenvolvido para eliminar bactérias externas e ser utilizado como um método alternativo para a amostragem de microrganismos do interior de formigas. O interessante é que o procedimento de dissecação de intestinos de formigas, utilizado hoje, é longo e demorado, especialmente para as pequenas espécies de attíneas como a *M. goeldii*.

A capacidade de diferentes reagentes para lavar *E. coli* inoculada em soldados de *A. laevigata* foi verificada por reação de PCR, com amplificação de um inserto de aproximadamente 600 pb. (Figura 8). Formigas contaminadas mostraram um aumento significativo na quantidade de produtos de amplificação detectados. Este sinal ainda se manteve presente em formigas contaminadas que tinham sido previamente lavadas com água, etanol 70% ou Tween 20, mas foi substancialmente removido após a lavagem com solução de hipoclorito de sódio 2%. Assim, o hipoclorito de sódio 2% foi selecionado para uso no protocolo de lavagem.

Uma fraca amplificação do sinal gerado após a lavagem com hipoclorito ainda pode ser detectada, o que pode ser o resultado da remoção incompleta de bactérias externas. A mesma intensidade de sinal também pode ser observada na amostra de *A. laevigata* não contaminada (Figura 8, amostra 2), levando-se a acreditar que a amplificação observada no teste é, ao menos em parte, o resultado da amplificação inespecífica do *primer*.

Figura 8 Amplificação do inserto de *E. coli* após realização do procedimento de lavagem das formigas inoculadas com diferentes reagentes. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. (M) Marcador 1Kb, (C-) Controle negativo, (1) Clone de *E. coli*, (2) *A. laevigata* não lavada, (3) *A. laevigata* contaminada com inóculo do clone de *E. coli*, (4) *A. laevigata* contaminada lavada com água, (5) *A. laevigata* contaminada lavada com etanol 70%, (6) *A. laevigata* contaminada lavada com hipoclorito de sódio 2%, (7) *A. laevigata* contaminada lavada com tween 20.



Para testar a eficiência do protocolo de lavagem foram comparadas bibliotecas 16S rRNA de bactérias presentes em *A. laevigata* lavada, *A. laevigata* não lavada e intestino dissecado desta formiga.

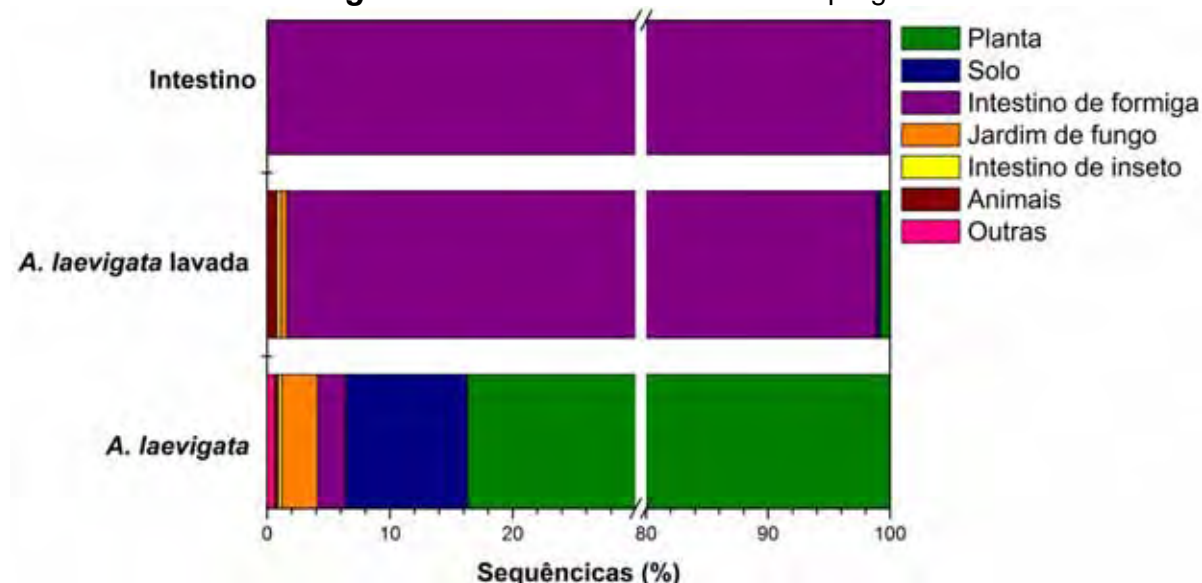
Foram analisadas 241 sequências 16S rRNA da biblioteca do intestino dissecado (Tabela 5). Todas as sequências tiveram 99% de identidade entre si e foram agrupadas em uma mesma MOTU atribuída à Ordem Rhizobiales. Na

biblioteca de formigas lavadas, 96,7% das sequências (355 das 367 sequências obtidas) também foram agrupadas na mesma MOTU da bactéria simbiote do intestino. A biblioteca de *A. laevigata* lavada ainda apresentou outras 12 sequências que pertenceram a outras nove espécies. Essas espécies foram similares a espécies de bactérias encontradas em plantas (três espécies), em solo (uma espécie), outros animais (três espécies), intestino de inseto (uma espécie) e jardim de fungo de formigas cortadeiras (uma espécie) (Figura 9). Na biblioteca de formigas não lavadas, 93,6% das sequências foram similares a bactérias geralmente associadas a plantas e solo (Figura 9).

Tabela 5 Bibliotecas usadas para a validação do protocolo de lavagem.

Biblioteca	N*	Sp**	Simbiote
<i>A. laevigata</i> (intestino)	241	01	Rhizobiales sp. 2
<i>A. laevigata</i> (lavada)	367	10	Rhizobiales sp. 2 + 9 spp.
<i>A. laevigata</i>	345	55	Rhizobiales sp. 2 + 54 spp.

Figura 9 Origem das sequências mais similares a de bactérias encontradas nas bibliotecas de *A. laevigata*. Resultados obtidos através do programa Blastn.



A maioria destas bactérias removidas após o procedimento de lavagem é similar a espécies associadas ao material coletado pelas formigas e ao solo, e se encontram em pequenas quantidades: espécies com um a três clones sequenciados. Estes microrganismos provavelmente são vetorizados pelas formigas e não apresentam maiores funções para a vida das formigas Attini. As bactérias removidas na lavagem, ou seja, presentes somente nas formigas não submetidas ao

procedimento de lavagem, mas que se encontravam em grandes populações foram consideradas como prováveis simbioses mutualistas ou parasitas que possivelmente apresentem funções importantes para as attíneas e foram melhor analisados.

A biblioteca de *A. laevigata* apresentou o maior número de espécies bacterianas similares a bactérias associadas a plantas e solo. Portanto, a maior parte das espécies bacterianas encontradas associadas à *A. laevigata*, pode ser composta de contaminantes sem um papel significativo na vida das formigas. Por *A. laevigata* ter maior superfície em relação às outras formigas attíneas estudadas, pode vetorizar maior quantidade de microrganismos que as demais formigas, gerando essa grande diferença na quantidade de espécies bacterianas que foram encontradas associadas a elas e similares a espécies previamente encontradas em plantas e solo.

O protocolo de lavagem permitiu obter uma amostra representativa da comunidade bacteriana intestinal em *A. laevigata*, eliminando a maior parte das espécies bacterianas da superfície do corpo da formiga. Foram encontradas diferenças claras nas comunidades bacterianas associadas às formigas Attini, antes e após o procedimento de lavagem. Já os microrganismos que não foram removidos pelo protocolo de lavagem são predominantemente os microrganismos encontrados no intestino das formigas (resultado comprovado pela dissecação dos intestinos de *A. laevigata*) e foram assumidos como bactérias de sua microbiota intestinal.

A lavagem das formigas se mostrou apropriada e útil para ser usada ao invés da dissecação do intestino das formigas, e pode se mostrar especialmente favorável para analisar as bactérias do intestino de pequenas formigas de difícil dissecação como as *M. goeldii*. Este procedimento de lavagem foi realizado nas outras formigas objetos de estudo do presente trabalho de doutorado.

As sequências referentes à biblioteca 16S rRNA do intestino dissecado de *A. laevigata* foram utilizadas somente para validar o protocolo de lavagem e não foram utilizadas nas análises de comunidade.

4.3 Análises das comunidades bacterianas das formigas Attini

Um total de 1993 sequências foram geradas a partir das bibliotecas 16S rRNA de bactérias associadas às formigas (lavadas e não lavadas) *A. laevigata*, *T. urichi* e *M. goeldii* (Tabela 6).

As bibliotecas das formigas lavadas apresentam as bactérias presentes no interior das formigas que, possivelmente, estão presentes em seus intestinos. Já as bactérias encontradas nas bibliotecas das formigas não lavadas são, na sua maioria, bactérias externas ao corpo das formigas presentes em seus tegumentos.

As espécies amostradas tiveram índices de diversidade (Shannon e Simpson) e riqueza (Chao1) estimados pelo programa MOTHUR (Tabela 6). No geral, os índices de diversidade e riqueza foram menores nas amostras das formigas lavadas que nas formigas não lavadas. A diversidade de bactérias encontrada nos intestinos das formigas é menor que a diversidade de bactérias encontrada em seu tegumento.

A comunidade microbiana de *A. laevigata* lavada apresentou menor diversidade que as bibliotecas lavadas de *T. urichi* e *M. goeldii*, mesmo possuindo um índice de riqueza maior. A riqueza e a diversidade de espécies dependem do esforço amostral: o número de espécies aumenta com o aumento do número de indivíduos amostrados. Mas, amostras abundantes e raras contribuem de forma diferente para a comunidade, sendo assim, espécies raras têm menor peso comparado às espécies mais comuns (RICKLEFS, 2010). O que pode explicar a maior riqueza e a menor diversidade de *A. laevigata* lavada em relação às outras formigas lavadas.

A comunidade bacteriana de *A. laevigata* revelou maior riqueza e maior diversidade que as bibliotecas das outras formigas Attini estudadas. A biblioteca de *T. urichi* apresentou um menor esforço amostral, o que pode ter contribuído para um índice de diversidade menor.

Tabela 6 Sequências das bibliotecas 16S rRNA das formigas Attini, estimação de riqueza e índices de diversidade. Valores entre parênteses representam o intervalo de confiança (95% de probabilidade).

Biblioteca	N*	Sp**	Chao1	Shannon	Simpson
<i>A. laevigata</i>	345	55	146,1 (93,7-269,3)	2,0 (1,8-2,2)	0,3 (0,3-0,3)
<i>A. laevigata</i> (lavada)	367	10	13,8 (10,6-32,0)	0,2 (0,1-0,3)	0,9 (0,9-1,0)
<i>T. urichi</i>	288	14	59,0 (27,7-162,1)	1,0 (1,2-0,4)	0,4 (0,4-0,4)
<i>T. urichi</i> (lavada)	267	04	4,0 (4,0-0,0)	0,7 (0,9-0,6)	0,6 (0,5-0,6)
<i>M. goeldii</i>	384	20	29,0 (22,1-58,0)	1,7 (1,6-1,8)	0,2 (0,2-0,2)
<i>M. goeldii</i> (lavada)	342	07	7,5 (7,0-15,3)	0,4 (0,3-0,5)	0,8 (0,8-0,9)
Total	1993				

*número de clones sequenciados; **número de espécies encontradas em cada biblioteca (sem levar em consideração o compartilhamento de espécies).

A análise de rarefação (Figura 10), utilizando o critério de similaridade de sequência a 97%, mostrou haver saturação de espécies para o número de sequências analisadas para a maioria das bibliotecas. Somente a bibliotecas de *A. laevigata* não lavada atingiu um platô e mostrou que a intensidade amostral não foi suficiente para acessar a comunidade bacteriana estudada.

Para avaliar a diversidade beta (grau de diferença entre duas comunidades) entre as comunidades bacterianas das formigas Attini, foi utilizada a Análise de Coordenadas Principais (PCoA) no programa UniFrac que compara as comunidades microbianas agrupando as mais parecidas. Os resultados das análises UniFrac ponderada normalizada e não normalizada mostram que as comunidades bacterianas associadas às Neoattini *A. laevigata* e *T. urichi* são mais semelhantes entre si que a comunidade bacteriana associada à Paleoattini *M. goeldii* (Figura 11).

Figura 10 Análise de rarefação das bibliotecas 16S rRNA de bactérias associadas às formigas Attini obtidas pelo programa MOTHUR. O nível de similaridade utilizado foi de 97%.

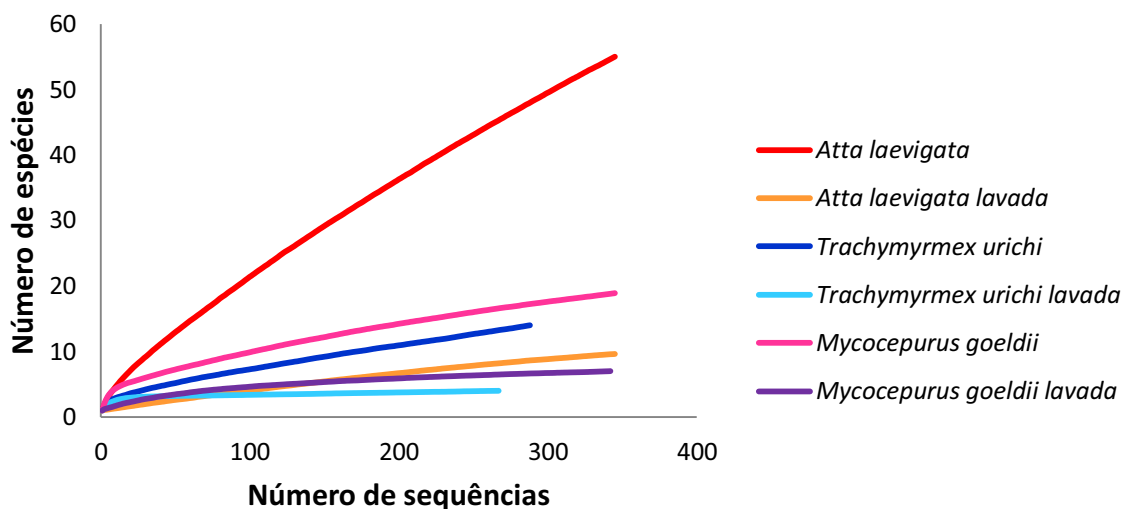
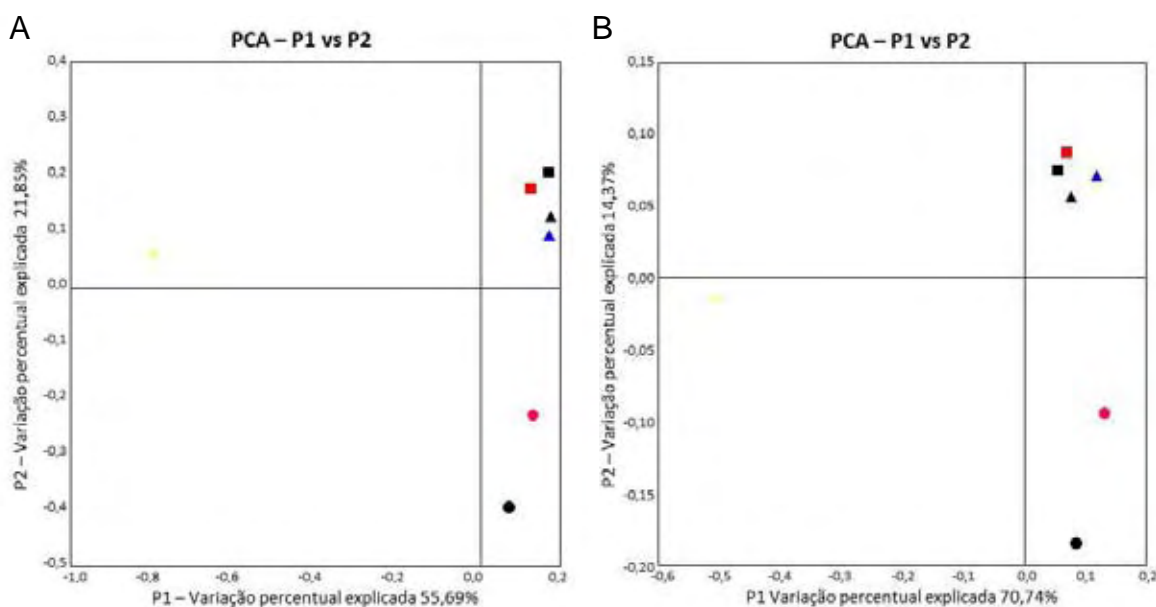


Figura 11 Diversidade beta entre as comunidades bacterianas associadas às formigas Attini por PCA. Resultados dos componentes principais 1 e 2 (P1 e P2) de valores (A) normalizados e (B) não normalizados. (■) *Atta laevigata*; (■) *Atta laevigata* lavada; (▲) *Trachymyrmex urichi*; (▲) *Trachymyrmex urichi* lavada; (●) *Mycocepurus goeldii*; (●) *Mycocepurus goeldii* lavada.



Testes de significância UniFrac foram realizados para determinar os valores nas diferenças observadas entre as comunidades bacterianas das formigas Attini (Tabela 7). Após as correções de Bonferroni (valores abaixo da diagonal), apenas as comparações entre *A. laevigata* e *M. goeldii* lavada e não lavada foram altamente

significativas, o que reforça a maior semelhança entre as comunidades bacterianas das Neoattini *A. laevigata* e *T. urichi*.

Tabela 7 Distâncias UniFrac (acima da diagonal) e valores de p corrigidos para múltiplas comparações utilizando a correção de Bonferroni (a partir de testes de significância UniFrac; abaixo da diagonal). Baseado em comparações pareadas, ponderadas e normalizadas entre as comunidades bacterianas das diferentes Attini. Destacado em cinza as relações com diferenças significativas.

	<i>A. laevigata</i>	<i>A. laevigata</i> (lavada)	<i>T. urichi</i>	<i>T. urichi</i> (lavada)	<i>M. goeldii</i>	<i>M. goeldii</i> (lavada)
<i>A. laevigata</i>	-	0,435	0,481	0,468	0,571	0,666
<i>A. laevigata</i> (lavada)	1,000	-	0,316	0,174	0,569	0,622
<i>T. urichi</i>	0,280	0,670	-	0,364	0,347	0,639
<i>T. urichi</i> (lavada)	1,000	1,000	1,000	-	0,525	0,569
<i>M. goeldii</i>	0,000	0,190	0,870	0,220	-	0,466
<i>M. goeldii</i> (lavada)	0,000	0,120	0,030	0,410	0,520	-

Essa constatação também pode ser visualizada na figura 12, que mostra os Filos das bactérias associadas às formigas Attini. Nas formigas *A. laevigata* e *T. urichi* houve uma predominância de Proteobacteria, tanto nas formigas lavadas (98,4 e 89,9%, *A. laevigata* e *T. urichi*, respectivamente), como nas não lavadas (83,2 e 97,2%, *A. laevigata* e *T. urichi*, respectivamente). Já *M. goeldii*, apresentou uma predominância de Proteobacteria nas formigas não lavadas (45,3%), com quantidades significativas de Firmicutes (31,3%) e Tenericutes (20,3%); e uma predominância de Tenericutes (93,3%) nas formigas lavadas.

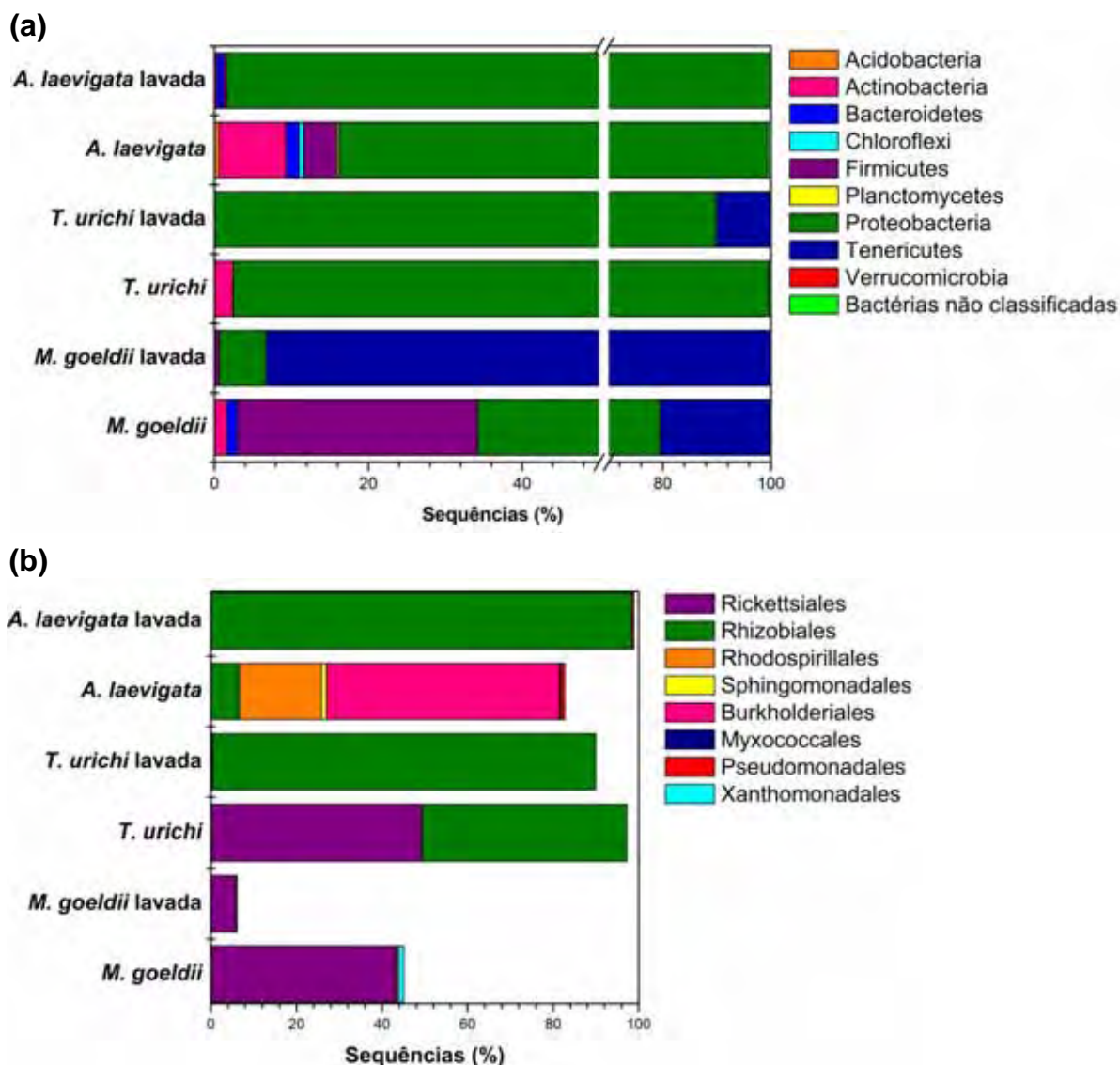
A lavagem causou uma mudança mais significativa na composição bacteriana em *M. goeldii* que nas outras espécies de Attini, o que pode ser observado pela predominância de Tenericutes (e não de Proteobacteria) em formigas *M. goeldii* lavadas (Figura 12a).

A investigação atual encontrou espécies bacterianas em 18 Ordens. A distribuição das Ordens entre as bibliotecas demonstra comunidades distintas de bactérias nas diferentes formigas Attini. Dezesesseis destas Ordens já tinham sido relatadas associadas às formigas Attini (ISHAK et al., 2011a; MUELLER et al., 2008) e seus jardins de fungos (AYLWARD et al., 2012; SUEN et al., 2010), ou a formigas não attíneas (ANDERSON et al., 2012; FUNARO et al., 2011; ISHAK et al., 2011b; KAUTZ et al., 2013; STOLL et al., 2007).

Uma descrição mais detalhada dos grupos de microrganismos presentes no Filo Proteobacteria revelou a predominância de sequências bacterianas afiliadas à Ordem Rhizobiales em *A. laevigata* e *T. urichi* lavadas, e grande quantidade de

bactérias pertencentes à Ordem Rickettsiales nas bibliotecas de *T. urichi* e *M. goeldii* não lavadas (Figura 12b).

Figura 12 Afiliação taxonômica das sequências 16S rRNA presentes nas bibliotecas das formigas Attini. (a) Grupos taxonômicos do Domínio Bactéria classificados por BLASTn contra o banco de dados do GenBank®; (b) Composição da comunidade microbiana entre as diversas Ordens para as sequências atribuídas ao Filo Proteobacteria.



As comunidades bacterianas das formigas Attini foram analisadas a um nível taxonômico mais específico, onde o programa MOTHUR foi utilizado para verificar sobreposição de MOTUs utilizando o diagrama de Venn (Figura 13). As bibliotecas de formigas lavadas e não lavadas foram analisadas em conjunto (Figura 13a). Algumas MOTUs de bactérias são compartilhadas por mais de uma formiga e apenas uma MOTU bacteriana foi encontrada nas três formigas estudadas, sendo a

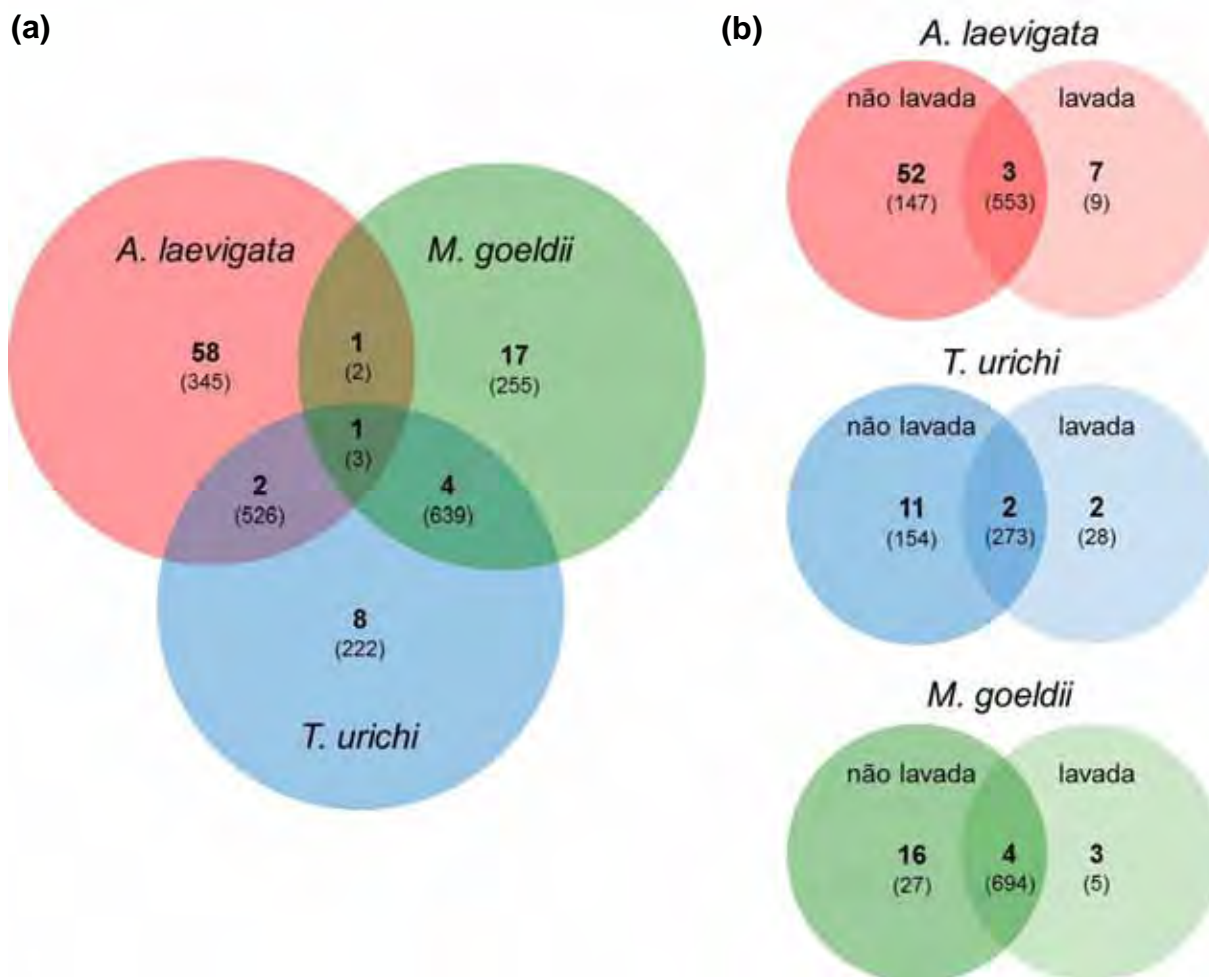
maioria das bactérias específicas para cada comunidade microbiana das diferentes formigas Attini: 58 espécies exclusivas de *A. laevigata*, 8 espécies exclusivas de *T. urichi* e 17 espécies exclusivas de *M. goeldii*.

Existe um maior compartilhamento de MOTUs entre as comunidades bacterianas das formigas *A. laevigata* e *T. urichi* e, entre as comunidades bacterianas de *T. urichi* e *M. goeldii*. Pode-se observar maior número de sequências agrupadas nas MOTUs compartilhadas entre essas espécies de formigas. Portanto, a formiga filogeneticamente intermediária *T. urichi* compartilha espécies com o grupo das formigas mais derivadas e com o grupo das formigas mais basais. Uma explicação para tal fato seria a ocorrência de uma sucessão evolutiva das associações microbianas com as formigas Attini, discutida posteriormente no presente trabalho.

O compartilhamento de MOTUs entre as bibliotecas lavadas e não lavadas (Figura 13b) de cada formiga Attini estudada, revelou que a maioria das MOTUs compartilhadas agrupou um maior número de sequências. O que evidencia a importância funcional destas MOTUs predominantes na vida das formigas.

As attíneas *A. laevigata*, *T. urichi* e *M. goeldii* apresentaram comunidades bacterianas particulares. As formigas submetidas ou não ao procedimento de lavagem também abrigaram espécies bacterianas características, o que tornou possível diferenciar os microrganismos internos e externos associados a elas.

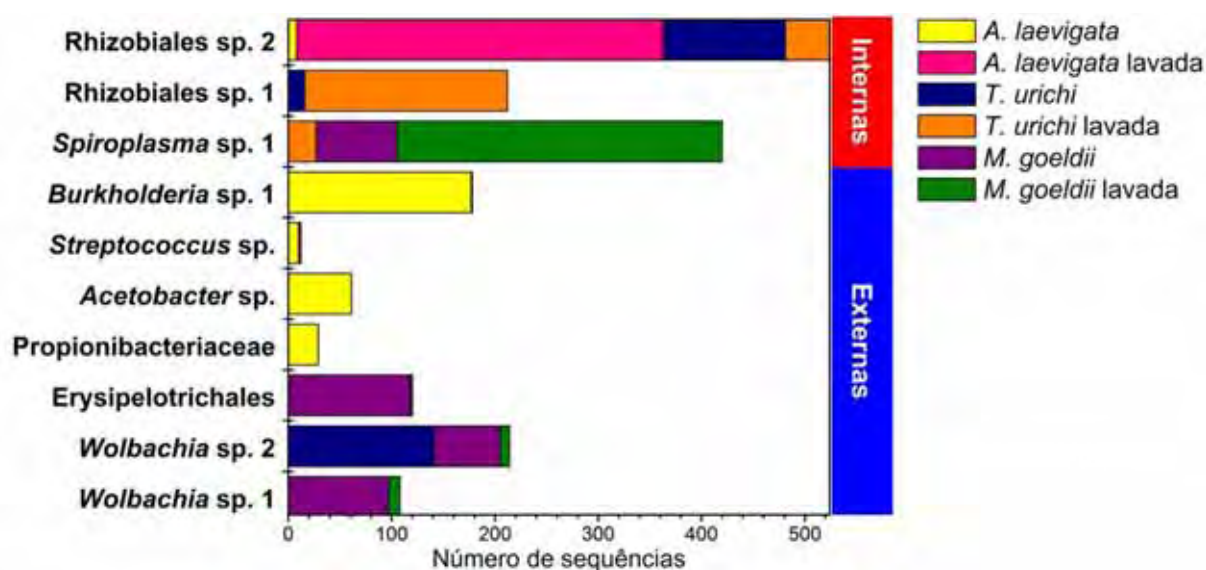
Figura 13 Diagrama de Venn mostrando sobreposição de MOTUs entre as três comunidades bacterianas Attini. (a) Formigas lavadas e não lavadas foram agrupadas; **(b)** Formigas lavadas e não lavadas foram analisadas separadamente para cada espécie de formiga. O critério usado para agrupamento das MOTUs foi de 97% de similaridade entre as sequências.



4.4 MOTUs predominantes de bactérias encontradas nas formigas Attini

As 1993 sequências das bibliotecas 16S rRNA das bactérias associadas às formigas Attini em estudo foram atribuídas a 92 MOTUs. Dez das 92 MOTUs encontradas nas comunidades microbianas das formigas Attini representaram 85,3% das sequências geradas (Figura 14, Tabela 8). Estas espécies foram provavelmente mais eficientes em colonizar o corpo da formiga e assim atingir maiores populações.

Figura 14 Classificação das MOTUs mais abundantes encontradas internamente (em formigas lavadas) ou externamente (em formigas não lavadas) nas formigas Attini.



Três das espécies bacterianas apresentadas em grande população vivem no interior, possivelmente no intestino, das formigas, pois foram encontradas em grande quantidade nas formigas lavadas. *Spiroplasma* sp. 1 foi encontrada em *M. goeldii* lavada (92,1% das sequências geradas) e *T. urichi* lavada (10,1%); Rhizobiales sp. 1 foi encontrada em *T. urichi* lavada (73,4%) e Rhizobiales sp. 2 foi encontrada em *A. laevigata* lavada (96,7%) e *T. urichi* lavada (16,1%). Portanto, o intestino de *M. goeldii* é dominado por *Spiroplasma* sp. 1, assim como os intestinos de *A. laevigata* e *T. urichi* são dominados por espécies de Rhizobiales.

O intestino da espécie de Attini mais basal *M. goeldii* abriga principalmente *Spiroplasma* sp. 1. *Spiroplasma* se associa a uma variedade de insetos (ELEFATHERIANOS et al., 2013; LUKASIK et al., 2013). Algumas espécies de *Spiroplasma* são consideradas patogênicas e manipuladores reprodutivos (HACKETT et al., 1986). Outras espécies de *Spiroplasma* podem ser encontradas na hemolinfa e interagem diretamente com moléculas secretadas pela resposta imune humoral (HASELKORN, 2010). Algumas espécies de *Spiroplasma* presentes no intestino de outros insetos também foram relacionadas com funções mutualistas, e protegem os seus hospedeiros contra entomopatógenos (COCKBURN et al., 2013; JAENIKE et al., 2010; LUKASIK et al., 2013; XIE; VILCHEZ; MATEOS, 2010), ou restauram a fertilidade de fêmeas parasitadas por nematoides (HASELKORN et al.,

2013). Devido à abundância de *Spiroplasma* sp. 1 encontrado no intestino de *M. goeldii* e sua presença no intestino de *T. urichi*, é proposto um papel protetor deste simbionte nas formigas Attini.

Nos intestinos da Attini filogeneticamente intermediária *T. urichi*, foram encontradas duas espécies de Rhizobiales (sp. 1 e sp. 2) predominantes e o *Spiroplasma* sp. 1. No intestino da Attini mais derivada *A. laevigata* uma única espécie de Rhizobiales (sp. 2) foi encontrada.

Rhizobiales sp. 2 poderia mediar a fixação de nitrogênio nas formigas Attini. Bactérias deste grupo são conhecidas por fixar nitrogênio para as plantas (BAZIN et al., 2012). Rhizobiales tem sido especulada por fixar o nitrogênio atmosférico para os insetos e está presente em uma ampla gama de formigas (ANDERSON et al., 2012; KAUTZ et al., 2013; RUSSELL et al., 2009; STOLL et al., 2007; VAN BORM; BUSCHINGER; et al., 2002) sugerindo uma história profunda de simbiose entre formigas e Rhizobiales presentes em seus intestinos.

As outras sete espécies de simbiontes predominantes provavelmente vivem na cutícula da formiga, pois foram quase completamente lavadas do corpo das formigas: *Burkholderia* sp. 1 (0,3% e 51,3% nas formigas lavadas e não lavadas, respectivamente), *Acetobacter* sp. (17,7%), Propionibacteriaceae (8,4%) e *Streptococcus* sp. (0,5% e 2,9% nas formigas lavadas e não lavadas, respectivamente) encontradas em *A. laevigata*; Erysipelotrichales (0,6 % e 30,7% nas formigas lavadas e não lavadas, respectivamente) e *Wolbachia* sp. 1 (3,2% e 25,3% nas formigas lavadas e não lavadas, respectivamente) encontradas em *M. goeldii*; e *Wolbachia* sp. 2 encontrada em *M. goeldii* (2,6% e 16,7% nas formigas lavadas e não lavadas, respectivamente) e *T. urichi* (49%).

Bactérias simbiontes que vivem no tegumento de formigas Attini têm sido intensamente investigadas, pois elas produzem antibióticos e secreções com propriedades antifúngicas (BARKE et al., 2010; CURRIE; SCOTT; et al., 1999; ISHAK et al., 2011a; KOST et al., 2007; ZUCCHI et al., 2011). Duas das sete bactérias encontradas nas cutículas das formigas Attini, pertencem a grupos de espécies produtoras de antibiótico (*Burkholderia* sp. 1 e a Actinobacteria Propionibacteriaceae), uma pertence ao grupo das fixadoras de nitrogênio (*Acetobacter* sp.), uma bactéria ainda não foi descrita funcionalmente em insetos (*Streptococcus* sp.), duas espécies mutualistas de *Wolbachia* e, uma espécie de

Erysipelotrichales encontrada pela primeira vez associada a insetos e também com nenhum papel funcional descrito.

Espécies de *Burkholderia* já foram identificadas em jardins de fungo de *Atta sexdens* e têm sido propostas por apresentarem funções supressoras de doenças inibindo o fungo *Escovopsis* sp. e outros fungos entomopatogênicos (SANTOS et al., 2004). A *Burkholderia* sp. 1, encontrada na cutícula de *A. laevigata* já foi anteriormente encontrada em um órgão em forma de bolsa na junção do intestino médio e do intestino de formigas *Tetraponera* e, agindo como bactérias fixadoras de nitrogênio (VAN BORM; BUSCHINGER; et al., 2002). Também foi relatada como uma das espécies de *Burkholderia* encontradas na comunidade microbiana do intestino de percevejos *Plinachtus* (KIKUCHI; HOSOKAWA; FUKATSU, 2011). Por isso, é razoável supor *Burkholderia* sp. 1 como uma mutualista associada às formigas Attini.

Do mesmo modo, actinobactérias são conhecidas por terem a capacidade de produzir compostos antibióticos e essas bactérias têm sido encontradas em associação com formigas Attini.

Pseudonocardia sp., *Amycolatopsis* sp. e *Streptomyces* sp. são as principais actinobactérias que vivem nos tegumentos das formigas cultivadoras de fungos que produzem antibióticos contra fungos patogênicos (BARKE et al., 2010; CAFARO et al., 2011; CURRIE; SCOTT; et al., 1999; HAEDER et al., 2009; MATTOSO et al., 2012; SEN et al., 2009). No entanto, embora a associação de Actinobacteria com formigas Attini tenha sido sempre relatada, essas bactérias raramente foram encontradas em associação com as espécies mais derivadas das formigas cortadeiras *Atta* (MUELLER et al., 2008; ZUCCHI et al., 2011), o que leva à especulação que este grupo específico de formigas cortadeiras tem um mecanismo alternativo para a prevenção de doenças. Levando em consideração ainda que a manutenção destas actinobactérias na cutícula das formigas é penosa para as attíneas, e causa um aumento nas taxas de respiração e também do consumo do jardim de fungo (POULSEN et al., 2003), seria talvez uma estratégia evolutiva associar-se a outras bactérias.

Espécies de *Acetobacter* são bactérias fixadoras de nitrogênio (SAMADDAR et al., 2011) envolvidas em muitos aspectos da biologia de seus hospedeiros. Estas espécies contribuem para a manutenção da homeostasia nos intestinos de seus hospedeiros e com a comunicação célula-célula, através da produção de compostos

voláteis. Além disso, elas mantêm um equilíbrio de um consórcio microbiano através do fornecimento de metabólitos de outros microrganismos benéficos ao hospedeiro (CROTTI et al., 2010). Espécies na Família Acetobacteraceae já foram relatadas associadas a formigas (RUSSELL et al., 2009), abelhas (JEYAPRAKASH; HOY; ALLSOPP, 2003; KOCH et al., 2013), vespas (ZOUACHE et al., 2009), mosquitos (FAVIA et al., 2007), moscas de frutas (KOUNATIDIS et al., 2009; RIDLEY et al., 2012; WONG; NG; DOUGLAS, 2011), cochonilhas da cana (CROTTI et al., 2010) e cigarrinhas (CROTTI et al., 2009). O papel de *Acetobacter* sp. nas formigas Attini permanece desconhecido, mas elas podem fazer parte de um consórcio microbiano no tegumento de *A. laevigata*.

Espécies de *Wolbachia* foram encontradas externamente, provavelmente associadas às cutículas de *M. goeldii* e *T. urichi*, apesar de sua frequente ocorrência intracelular. A inesperada presença de *Wolbachia* extracelular já foi relatada em formigas *Acromyrmex*, mas estavam presentes no lúmen intestino anterior (ANDERSEN et al., 2012) e, embora elas sejam assumidas como parasitas reprodutivos, *Wolbachia* também podem apresentar um papel funcional mutualístico na nutrição da formiga (ANDERSEN et al., 2012). *Wolbachia* também têm sido associada a funções mutualísticas de nutrição em percevejos (HOSOKAWA et al., 2010) e na regulação da morte celular programada de vespas (PANNEBAKKER et al., 2007). Não é possível afirmar qual o papel das espécies de *Wolbachia* encontradas nas cutículas das formigas Attini.

Espécies de *Wolbachia* foram descritas como ausentes em colônias de *Mycocepurus smithii* (FROST et al., 2010; HIMLER et al., 2009) e, portanto, para nosso conhecimento, esta é a primeira vez que *Wolbachia* foi encontrada associada a formigas do gênero *Mycocepurus*.

As comunidades bacterianas predominantes encontradas associadas às formigas atíneas do presente trabalho são distintas das comunidades mais abundantes encontradas nos jardins de fungo de *Atta colombica* (AYLWARD et al., 2012; SUEN et al., 2010) e *A. cephalotes* (AYLWARD et al., 2012). Formigas e jardins de fungo selecionaram diferentes microrganismos para se associarem. Mas, espécies de *Burkholderia* e *Gluconobacter* (espécie próxima de *Acetobacter*) foram identificadas associadas às formigas *A. laevigata* e ao jardim de fungo de *A. colombica* (SUEN et al., 2010), entretanto não foi possível analisar suas sequências

para saber se são filogeneticamente correlacionadas. *Burkholderia* sp. também já foi identificada no jardim de fungo de *A. sexdens* (SANTOS et al., 2004).

4.5 Espécies bacterianas raras em formigas Attini

As 82 espécies bacterianas restantes foram representadas por uma a cinco sequências e foram assumidas por representar espécies raras que vivem em pequenas populações associadas às formigas Attini (Tabela 8). Estes microrganismos também podem ser apenas vetorizados, sem funções biológicas definidas para a formiga.

Estas espécies bacterianas foram, em sua maioria, semelhantes a bactérias associadas a plantas ou solo. Vivem em pequenas populações, possivelmente por serem submetidas a um processo de limpeza realizado pelas formigas (QUINLAN; CHERRETT, 1977).

As formigas Attini são conhecidas por abrigarem várias espécies de actinobactérias em seu tegumento (KOST et al., 2007), e também acolhem outros microrganismos, como observado neste trabalho.

Os microrganismos associados ao corpo das formigas são grandes fontes de microrganismos para seus ninhos, assim como as plantas forrageadas pelas formigas. As partes aéreas das plantas ou filosfera fornecem um habitat para microrganismos. As bactérias são os habitantes dominantes da filosfera, embora arqueias, fungos filamentosos e leveduras também sejam encontrados (WHIPPS et al., 2008). Estes microrganismos podem ser encontrados como epífitos sobre a superfície da planta e, como endófitos dentro dos tecidos de plantas (LINDOW; BRANDL, 2003). Plantas tropicais podem conter de 10^6 a 10^7 bactérias por cm^2 (LINDOW; BRANDL, 2003) sendo a composição da comunidade bacteriana da filosfera de cada espécie significativamente diferente uma da outra (LAMBALIS et al., 2006). É possível, entretanto, que as formigas vetorizem estas bactérias, como tem sido sugerido ocorrer com fungos endofíticos (MANTOVANI et al., 2013). E também como ocorre com sementes de plantas que dependem de formigas para sua dispersão (PFEIFFER; HUTTENLOCHER; AYASSE, 2010).

Actinobactérias são frequentemente encontradas nos tegumentos das formigas Attini (CURRIE; SCOTT; et al., 1999; ISHAK et al., 2011a; KOST et al., 2007; MUELLER et al., 2010). No presente trabalho dois gêneros de actinobactérias

foram identificados em *T. urichi*, *Pseudonocardia* e *Amycolatopsis*, mas em pequena quantidade (1 e 3 clones sequenciados, respectivamente). Possivelmente, foram escolhidas formigas com baixa carga de actinobactérias, como ocorre com as cortadeiras *Acromyrmex* (POULSEN et al., 2002). POULSEN e colaboradores (2002) mostraram que existe um equilíbrio entre os mecanismos de defesa em formigas *Acromyrmex*. As operárias maiores possuem menores glândulas metapleurais (proporcionais ao tamanho do corpo) e elevada abundância de actinobactérias em seu tegumento, e são mais abundantes na parte inferior do jardim de fungo, onde *Escovopsis*, se presente, é também mais abundante. (POULSEN et al., 2002). Já as operárias menores possuem grandes glândulas metapleurais e baixa abundância das actinobactérias (POULSEN et al., 2002).

Tabela 8 Composição e abundância de espécies bacterianas associadas ao corpo das formigas Attini.

Spp.	Biblioteca	N*	Classificação	Cob/Id**	Best Hit*	Origem	Referência da origem
1	<i>Trachymyrmex urichi</i>	16	Rhizobiales sp. 1	99/97	FJ477662	Intestino de formiga	(RUSSELL et al., 2009)
	<i>Trachymyrmex urichi</i> (lavada)	196		100/96	JQ254239		
2	<i>Atta laevigata</i>	8		99/97	FJ477647		
	<i>Atta laevigata</i> (lavada)	355	Rhizobiales sp. 2	99/97	FJ477551	Intestino de formiga	(RUSSELL et al., 2009)
	<i>Trachymyrmex urichi</i>	118		99/98	FJ477647		
	<i>Trachymyrmex urichi</i> (lavada)	43		93/96	FJ477551		
	<i>Trachymyrmex urichi</i> (lavada)	27		97/96	GU993266		
3	<i>Mycocetopurus goeldii</i>	78	<i>Spiroplasma</i> sp. 1	92/99	GQ275136	Intestino de formiga	(RUSSELL et al., 2009)
	<i>Mycocetopurus goeldii</i> (lavada)	315		96/94	GU993266		
	<i>Atta laevigata</i>	177	<i>Burkholderia</i> sp. 1	98/99	JX901049	Planta	(YOU et al., 2012) •
4	<i>Atta laevigata</i> (lavada)	1		99/99	JX901049		
5	<i>Atta laevigata</i>	29	Proteobacteriaceae	99/93	FR832426	Planta	(SASAKI et al., 2010) •
	<i>Atta laevigata</i>	61	<i>Acetobacter</i> sp.	99/92	AB681084	Planta	(PRISTAS et al., 2007) •
7	<i>Atta laevigata</i>	10		97/98	HM558819		
	<i>Atta laevigata</i> (lavada)	2	<i>Streptococcus</i> sp.	92/98	HM558382	Jardim de fungo	(SUEN et al., 2010)
8	<i>Mycocetopurus goeldii</i>	97	<i>Wolbachia</i> sp. 1	99/100	GQ275133	Intestino de formiga	(RUSSELL, et al., 2009)
	<i>Mycocetopurus goeldii</i> (lavada)	11		99/100	GQ275133		
	<i>Trachymyrmex urichi</i>	141		99/99	GQ275145		
9	<i>Mycocetopurus goeldii</i>	64	<i>Wolbachia</i> sp. 2	100/98	Y11377	Intestino de formiga	(RUSSELL, et al., 2009)
	<i>Mycocetopurus goeldii</i> (lavada)	9		99/99	GQ275107		
	<i>Mycocetopurus goeldii</i>	118	Erysipelotrichales	99/98	JF216746	Intestino de animal	(SULLAM et al., 2012)
10	<i>Mycocetopurus goeldii</i> (lavada)	2		100/99	JF216746		
	<i>Atta laevigata</i>	2	<i>Rhizobium</i> sp. 1	99/98	JN698107	Planta	(HARDOIM et al., 2011) •
11	<i>Atta laevigata</i>	1		100/99	EU912487		
	<i>Trachymyrmex urichi</i>	1	<i>Microbacterium</i> sp.	97/99	JX011003	Planta	(MADHAIYAN et al., 2010)
	<i>Mycocetopurus goeldii</i>	1		100/98	FJ999574		
13	<i>Atta laevigata</i>	1	<i>Rhizobium</i> sp. 2	100/99	HM273883	Planta	(SANADHYA et al., 2011) •
	<i>Atta laevigata</i>	1	<i>Rhodoplanes</i> sp. 1	99/99	EF662838	Solo	(JANGID et al., 2011)
14	<i>Trachymyrmex urichi</i>	1		99/99	JN023774		
	<i>Atta laevigata</i>	2	<i>Bradyrhizobium</i> sp. 1	99/99	JQ385217	Solo	(DUNBAR et al., 2012)
16	<i>Atta laevigata</i>	1	Ktedonobacteria	100/96	EU335272	Solo	(HANSEL et al., 2008)
	<i>Atta laevigata</i>	1	<i>Burkholderia</i> sp. 2	84/99	JX901049	Planta	(YOU et al., 2012) •
18	<i>Atta laevigata</i>	1	<i>Bacillus</i> sp. 1	99/97	EU341165	Intestino de animal	(LIU, D. F. et al., 2011)
	<i>Atta laevigata</i>	1	Beijerinckiaceae	100/96	JN850165	Solo	(ZHENG et al., 2012) •
20	<i>Atta laevigata</i>	1	Methylobacteriaceae sp. 1	100/99	DQ453803	Solo	(HUANG et al., 2006) •
	<i>Atta laevigata</i>	1	Planctomycetales	89/95	JQ769659	Solo	(LIU et al., 2012) •
22	<i>Atta laevigata</i>	2	<i>Asaia</i> sp.	99/98	JF514557	Planta	(SAMADDAR et al., 2011)
	<i>Atta laevigata</i>	1	<i>Bradyrhizobium</i> sp. 2	99/94	HQ119562	Solo	(WILLIAMSON et al., 2011)

24	<i>Atta laevigata</i>	1	<i>Oxalicibacterium</i> sp.	100/97	HQ899714	Solo	(KELLY et al., 2011) •
25	<i>Atta laevigata</i>	1	<i>Sphingobacteria</i>	99/91	HQ190456	Solo	(JANGID et al., 2011)
26	<i>Atta laevigata</i>	1	<i>Acetobacteraceae</i> sp. 1	99/98	HQ674815	Solo	(Im et al., 2005) •
27	<i>Atta laevigata</i>	1	<i>Rhodoplanes</i> sp. 2	99/99	FJ478724	Solo	(YOUSSEF et al., 2009)
28	<i>Atta laevigata</i>	1	<i>Pseudomonas</i> sp.	99/99	HE575555	Inseto	(CLARK et al., 2011) •
29	<i>Atta laevigata</i>	1	<i>Phyllobacteriaceae</i> sp. 1	100/94	JN641400	Solo	(YU et al., 2012)
30	<i>Atta laevigata</i>	2	<i>Burkholderia</i> sp. 3	100/99	JX901049	Planta	(YOU et al., 2012) •
31	<i>Atta laevigata</i>	1	<i>Anaeromyxobacter</i> sp.	94/97	JN023810	Solo	(JIMENEZ-AGUILAR et al., 2011) •
32	<i>Atta laevigata</i>	1	<i>Alphaproteobacteria</i> sp. 1	99/97	FJ478824	Solo	(YOUSSEF et al., 2009)
33	<i>Atta laevigata</i>	1	<i>Methylobacteriaceae</i> sp. 2	99/98	AY921938	Solo	(TRINGE et al., 2005)
34	<i>Atta laevigata</i>	1	<i>Pigmentiphaga</i> sp.	99/98	JN541171	Outra	(SUN et al., 2011) •
35	<i>Atta laevigata</i>	2	<i>Bacteria</i> sp. 1	99/90	JF325987	Outra	(CABEZAS et al., 2011) •
36	<i>Atta laevigata</i>	1	<i>Chitinophagaceae</i> sp. 1	99/99	JN869034	Solo	(PENG et al., 2011) •
37	<i>Atta laevigata</i>	3	<i>Comamonas</i> sp.	99/99	JF218140	Planta	(TINDYEBWA et al., 2010) •
38	<i>Atta laevigata</i>	1	<i>Xenophilus</i> sp.	99/99	JQ976754	Outra	(WANG et al., 2012) •
39	<i>Atta laevigata</i>	1	<i>Cyclobacteriaceae</i>	93/99	GU375779	Solo	(CASTRO et al., 2010)
40	<i>Atta laevigata</i>	1	<i>Burkholderiaceae</i>	99/92	EF507913	Planta	(YOU et al., 2012) •
41	<i>Atta laevigata</i>	1	<i>Bacteroidetes</i> sp. 1	92/99	AB599023	Planta	(IKEDA et al., 2011)
42	<i>Atta laevigata</i>	1	<i>Bordetella</i> sp.	99/99	JX568709	Planta	(CHOU et al., 2012) •
43	<i>Atta laevigata</i>	1	<i>Chloroflexi</i>	99/99	JQ379276	Solo	(DUNBAR, et al., 2012)
44	<i>Atta laevigata</i>	1	<i>Acetobacteraceae</i> sp. 2	99/96	JQ385269	Solo	(DUNBAR, et al., 2012)
45	<i>Atta laevigata</i>	1	<i>Saprospiraceae</i>	99/99	EU160224	Planta	(JUNG et al., 2007) •
46	<i>Atta laevigata</i>	1	<i>Kaistobacter</i> sp.	99/99	JQ386635	Solo	(DUNBAR, et al., 2012)
47	<i>Atta laevigata</i>	1	<i>Rhizomicrobium</i> sp.	99/99	JF345418	Solo	(DUNBAR, et al., 2012)
48	<i>Atta laevigata</i>	2	<i>Gammaproteobacteria</i>	99/98	JQ384391	Solo	(DUNBAR, et al., 2012)
49	<i>Atta laevigata</i>	1	<i>Gluconobacter</i> sp.	98/95	JQ696103	Solo	(AYDIN et al., 2012) •
50	<i>Atta laevigata</i>	1	<i>Sphingomonas</i> sp. 1	77/94	AB540149	Planta	(KOMMANEE et al., 2011)
51	<i>Atta laevigata</i>	1	<i>Sphingomonas</i> sp. 2	86/97	HM277298	Planta	(LI et al., 2010) •
52	<i>Atta laevigata</i>	1	<i>Bacillus</i> sp. 2	96/99	EF705641	Solo	(DADHWAL et al., 2009)
53	<i>Atta laevigata</i>	1	<i>Acinetobacter</i> sp.	99/99	KC119107	Planta	(XU et al., 2012) •
54	<i>Atta laevigata</i>	2	<i>Acinetobacter</i> sp.	100/99	JF815037	Solo	(RAVINDRAN et al., 2011) •
55	<i>Atta laevigata</i>	1	<i>Firmicutes</i> sp. 1	99/98	KC171676	Solo	(CHEN et al., 2012) •
56	<i>Atta laevigata</i>	1	<i>Hyphomicrobiaceae</i>	99/99	EU527092	Solo	(LIU, Y. Q. et al., 2009)
57	<i>Atta laevigata</i>	1	<i>Acidobacteria</i> sp. 1	99/99	JQ426388	Solo	(CASTRO-SILVA et al., 2012) •
58	<i>Atta laevigata</i>	1	<i>Firmicutes</i> sp. 2	100/98	JQ376570	Solo	(DUNBAR, et al., 2012)
59	<i>Atta laevigata</i>	1	<i>Acidobacteria</i> sp. 2	100/99	JN168562	Solo	(LIN et al., 2011) •
60	<i>Atta laevigata</i>	1	<i>Sphingomonas</i> sp. 3	96/97	AB461731	Planta	(OKUBO et al., 2009)
61	<i>Atta laevigata</i>	1	<i>Flavobacterium</i> sp.	100/98	JQ375176	Solo	(DUNBAR, et al., 2012)
62	<i>Atta laevigata</i> (lavada)	2	<i>Prevotella</i> sp.	100/99	AY349402	Animal	(BALAKIREV; PAVLYUCHKOV; AYALA, 2008)
63	<i>Atta laevigata</i> (lavada)	1	<i>Methylobacterium</i> sp. 1	100/99	JF096886	Planta	(GONZALEZ et al., 2011) •

63	<i>Atta laevigata</i> (lavada)	1	Bacteroidetes sp. 2	EF608539	99/96	Intestino de inseto	(LEHMAN; LUNDGREN; PETZKE, 2009)
64	<i>Atta laevigata</i> (lavada)	1	<i>Propionibacterium</i> sp.	HQ817459	99/99	Solo	(RAO et al., 2011) •
65	<i>Atta laevigata</i> (lavada)	1	<i>Methylobacterium</i> sp. 2	AB698710	100/99	Planta	(GONIN et al., 2011) •
66	<i>Atta laevigata</i> (lavada)	2	<i>Mesorhizobium</i> sp.	FJ477647	98/97	Intestino de formiga	(RUSSELL, et al., 2009)
67	<i>Atta laevigata</i> (lavada)	1	<i>Ralstonia</i> sp.	KC001930	99/99	Inseto	(WATSUURA et al., 2012)
68	<i>Trachymyrmex urichi</i>	1	Rhizobiales sp. 3	FJ477647	99/94	Intestino de formiga	(RUSSELL, et al., 2009)
69	<i>Trachymyrmex urichi</i>	1	<i>Wolbachia</i> sp. 3	GQ275145	89/95	Intestino de formiga	(RUSSELL, et al., 2009)
70	<i>Trachymyrmex urichi</i>	1	Bacteria sp. 2	EU133213	100/93	Solo	(ELSHAHED et al., 2008)
71	<i>Trachymyrmex urichi</i>	1	Rhizobiales sp. 4	FJ477662	84/98	Intestino de formiga	(RUSSELL, et al., 2009)
72	<i>Trachymyrmex urichi</i>	1	<i>Pseudonocardia</i> sp.	JX244110	99/96	Solo	(ZHANG et al., 2012) •
73	<i>Trachymyrmex urichi</i>	1	Phylobacteriaceae sp. 2	FJ477645	96/98	Intestino de formiga	(RUSSELL, et al., 2009)
74	<i>Trachymyrmex urichi</i>	3	<i>Amycolatopsis</i> sp.	EU851950	100/99	Planta	(MINGMA et al., 2008) •
75	<i>Trachymyrmex urichi</i>	1	<i>Agrococcus</i> sp.	FJ423764	99/97	Solo	(ZHANG; LIU; LIU, 2010)
	<i>Mycocetopurus goeldii</i>	1		JQ639052	99/98		
76	<i>Trachymyrmex urichi</i>	1	<i>Dermacoccus</i> sp.	FJ490550	100/99	Jardim de fungo	(HAEDER et al., 2009)
	<i>Mycocetopurus goeldii</i>	2		FJ490550	100/99		
77	<i>Trachymyrmex urichi</i> (lavada)	1	<i>Wolbachia</i> sp. 4	EU831094	99/98	Inseto	(CHELIUS et al., 2007) •
78	<i>Mycocetopurus goeldii</i>	4	<i>Niabella</i> sp.	AF527580	99/96	Solo	(KIM et al., 2007)
79	<i>Mycocetopurus goeldii</i>	2	Rickettsiales sp. 1	GU592770	72/95	Formiga	(SIRVIO; PAMILO, 2010)
80	<i>Mycocetopurus goeldii</i>	1	Verrucomicrobia	JQ368197	99/99	Solo	(DUNBAR, et al., 2012)
81	<i>Mycocetopurus goeldii</i>	1	Firmicutes sp. 3	JQ383219	99/97	Solo	(DUNBAR, et al., 2012)
82	<i>Mycocetopurus goeldii</i>	5	<i>Lysobacter</i> sp.	GQ466922	99/98	Outra	(HU; LI, 2008)
83	<i>Mycocetopurus goeldii</i>	2	<i>Aquabacterium</i> sp.	HQ118724	99/95	Solo	(WILLIAMSON et al., 2011)
84	<i>Mycocetopurus goeldii</i>	1	Rickettsiales sp. 2	EU831094	79/96	Inseto	(CHELIUS et al., 2007) •
85	<i>Mycocetopurus goeldii</i>	1	<i>Clostridium</i> sp.	JN698001	99/99	Planta	(HARDOIM et al., 2011) •
86	<i>Mycocetopurus goeldii</i>	1	Alphaproteobacteria sp. 2	AB630443	95/99	Solo	(PENET et al., 2012) •
87	<i>Mycocetopurus goeldii</i>	1	Chitinophagaceae sp. 2	JX114457	100/98	Solo	(VAN DILLEWIJN et al., 2012) •
88	<i>Mycocetopurus goeldii</i>	1	<i>Wolbachia</i> sp. 5	JX669531	100/90	Intestino de animal	(SU et al., 2009) •
89	<i>Mycocetopurus goeldii</i>	2	<i>Aeromicrobium</i> sp.	HM629408	99/96	Animal	(KIM et al., 2010)) •
90	<i>Mycocetopurus goeldii</i> (lavada)	1	<i>Spiroplasma</i> sp. 2	GQ275136	92/98	Intestino de formiga	(RUSSELL, et al., 2009)
91	<i>Mycocetopurus goeldii</i> (lavada)	3	<i>Spiroplasma</i> sp. 3	GU993266	99/98	Intestino de formiga	(FUNARO et al., 2011)
92	<i>Mycocetopurus goeldii</i> (lavada)	1	<i>Sphingomonas</i> sp. 4	GQ466987	99/99	Solo	(RASOLOFO et al., 2010)

*Número de clones sequenciados; **Cobertura da sequência consultada e Identidade máxima; °Número de acesso do *Best Hit*; • artigo não publicado.

4.6 Incidência de bactérias selecionadas nas formigas Attini

Quatro das bactérias predominantes encontradas nas bibliotecas de 16S rRNA, tiveram a sua presença investigada em outras 13 espécies de Attini em seis gêneros, utilizando *primers* específicos (Tabela 2). As espécies bacterianas investigadas foram:

(1) **Rhizobiales sp. 2**, a qual está nos intestinos de *A. laevigata* e *T. urichi* e não foi encontrada em *M. goeldii*;

(2) **Acetobacter sp.** encontrada na cutícula de *A. laevigata*;

Bactérias nestes dois grupos podem fixar nitrogênio e algumas bactérias fixadoras de nitrogênio têm sido propostas por mediar a nutrição em formigas (AYLWARD et al., 2012; PINTO-TOMAS et al., 2009; SUEN et al., 2010);

(3) **Burkholderia sp. 1**, também encontrada na cutícula de *A. laevigata*. Foi proposta por secretar antibióticos em colônias de *Atta sexdens*, protegendo-as de entomopatógenos (SANTOS et al., 2004);

(4) **Propionibacteriaceae**, uma Actinobacteria encontrada na cutícula de *A. laevigata*. O mutualismo entre actinobactérias e *Atta* parece raro e ainda não foi bem caracterizado (MUELLER et al., 2008; SEN et al., 2009).

Os resultados da PCR mostraram que a grande maioria das espécies de formigas Attini apresentam os simbiontes bacterianos específicos, com exceção de *M. goeldii* que não possui Rhizobiales e, *Atta bisphaerica*, *A. cephalotes* e *Myrmicocrypta* cf. *squamosa* que não possuem *Burkholderia*. Portanto, as quatro bactérias estão altamente difundidas nas formigas Attini (Tabela 9).

Tabela 9 Presença (+) ou ausência (-) das bactérias simbiotas em espécies de formigas Attini.

Tipo de agricultura	Formigas Attini Frequência: positivos/total	Rhiz 15/16	Acet 16/16	Burk 13/16	Prop 16/16
Cortadeira	<i>Atta laevigata</i>	+	+	+	+
Cortadeira	<i>Atta bisphaerica</i>	+	+	-	+
Cortadeira	<i>Atta capiguara</i>	+	+	+	+
Cortadeira	<i>Atta cephalotes</i>	+	+	-	+
Cortadeira	<i>Atta colombica</i>	+	+	+	+
Cortadeira	<i>Atta opaciceps</i>	+	+	+	+
Cortadeira	<i>Atta sexdens rubropilosa</i>	+	+	+	+
Cortadeira	<i>Atta texana</i>	+	+	+	+
Cortadeira	<i>Acromyrmex coronatus</i>	+	+	+	+
Derivada	<i>Trachymyrmex urichi</i>	+	+	+	+
Derivada	<i>Sericomyrmex</i> sp.	+	+	+	+
Tipo levedura	<i>Cyphomyrmex auritus</i>	+	+	+	+
Basal	<i>Mycetarotes parallelus</i>	+	+	+	+
Basal	<i>Myrmicocrypta</i> cf. <i>squamosa</i>	+	+	-	+
Basal	<i>Mycocepurus goeldii</i>	-	+	+	+
Fungo Pterulaceae	<i>Apterostigma megacephala</i>	+	+	+	+

* *Amplicons* não sequenciados

4.7 Especialização da interação bactérias-formigas Attini

A análise filogenética de Rhizobiales (Figura 16) demonstrou que Rhizobiales sp. 2 e *Mesorhizobium* sp. encontradas internamente às formigas Attini estavam intimamente relacionadas a outras espécies de Rhizobiales encontradas nos intestinos de formigas *Pheidole* (RUSSELL et al., 2009) e *Cephalotes* (ANDERSON et al., 2012; KAUTZ et al., 2013), assim como Rhizobiales sp. 4 foi semelhante a simbiotas do intestino de formigas *Tetraponera* (STOLL et al., 2007). A espécie mais abundante encontrada em *T. urichi*, Rhizobiales sp. 1, teve uma sequência 16S rRNA mais divergente e, provavelmente, representa uma nova espécie ainda não descrita que habita o intestino de formigas. No entanto, estas Rhizobiales encontradas nos intestinos das formigas Attini parecem ser parte de uma interação especializada bactéria-formiga. Por outro lado, as demais Rhizobiales encontradas em formigas Attini foram mais estreitamente relacionadas a microrganismos associados a plantas ou solo, sugerindo uma interação não especializada com formigas.

As bactérias encontradas nos intestinos de formigas *Pheidole* são capazes de fixar nitrogênio atmosférico, já que o gene *Nitrogenase reductase* (*nifH*), responsável pela redução de nitrogênio em amônia nas bactérias, foi identificado em bactérias associadas a estas formigas (RUSSELL et al., 2009).

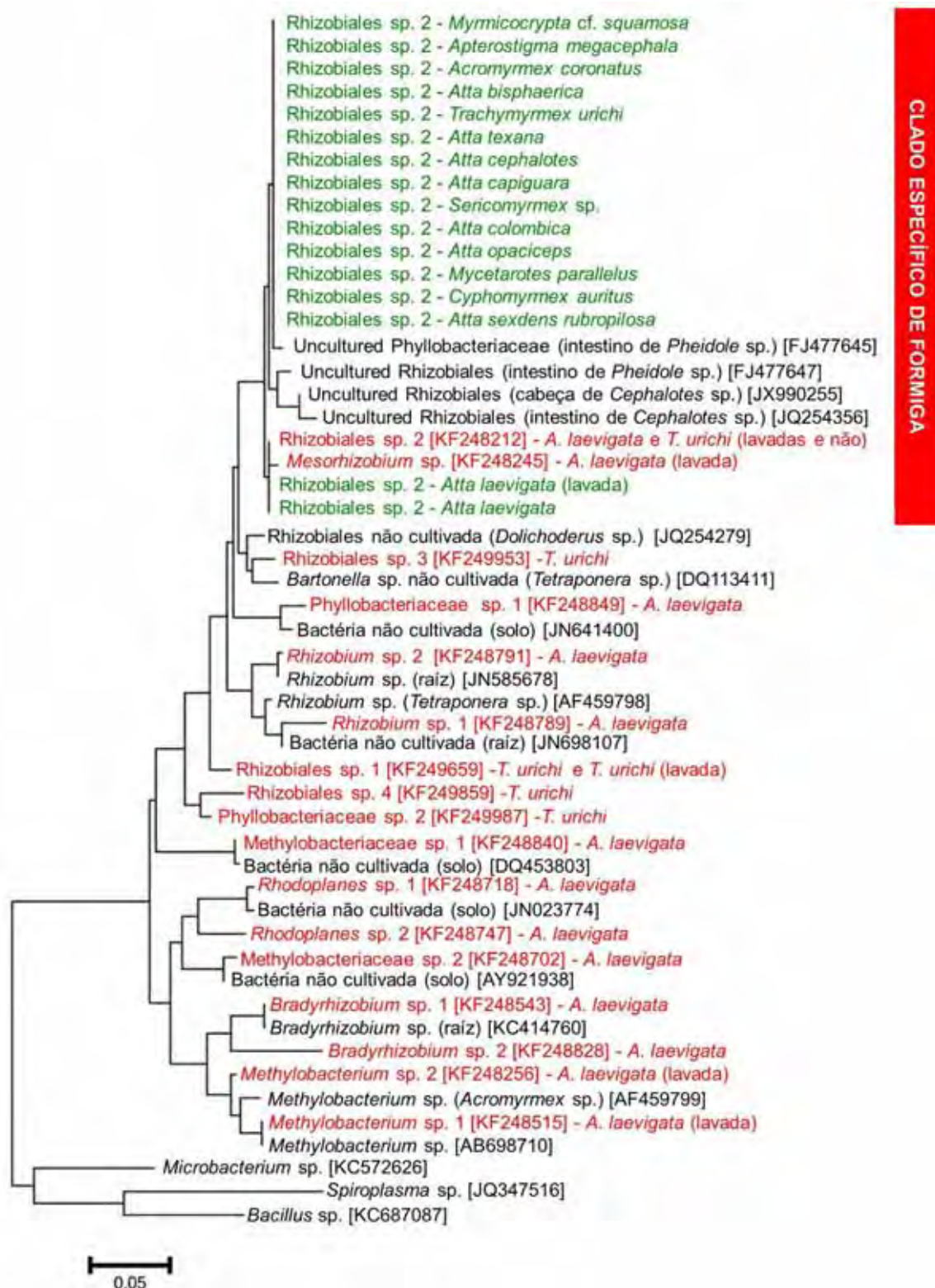
Portanto, a presença de *nifH* indica a presença de bactérias fixadoras de nitrogênio. RUSSELL e colaboradores (2009) também realizaram testes de redução de acetileno, para medir o acúmulo de etileno como um marcador para a fixação de nitrogênio e assim verificar a capacidade de fixar nitrogênio. O gene *nifH* também foi identificado em bactérias associadas a formigas *Echinopla*, *Dolichoderus* e *Tetraponera* (STOLL et al., 2007).

VAN BORM e colaboradores (2002) encontraram múltiplos microrganismos proximamente relacionados a bactérias fixadoras de nitrogênio associados a formigas *Tetraponera* e sugeriram que estes simbiossiontes evoluíram vias enzimáticas para transformar metabólitos nitrogenados em precursores de aminoácidos, isto é, desenvolveram uma maquinaria enzimática semelhante à que ocorre em bactérias intestinais de baratas e cupins. Essas bactérias estavam presentes em órgãos em forma de bolsa localizados no intestino das formigas (VAN BORM; BUSCHINGER; et al., 2002). A attínea *Atta laevigata*, estudada no presente trabalho não possui estes órgãos em seus intestinos.

Rhizobiales sp. 2 foi encontrada em 15 espécies de formigas Attini (de oito gêneros diferentes) e também está presente em formigas dos gêneros *Pheidole* e *Cephalotes* (ANDERSON et al., 2012; KAUTZ et al., 2013; RUSSELL et al., 2009). Todas estas Rhizobiales formaram um clado único e específico (um grupo monofilético) de associação com formigas (Figura 15), o que sugere que ocorreu uma única aquisição desta bactéria durante a evolução. Assim sendo, Rhizobiales sp. 2 é provavelmente parte da microbiota intestinal comum de diferentes espécies de formigas, apesar de que apenas na formiga cortadeira *A. laevigata*, foi encontrada como espécie dominante e única nos intestinos.

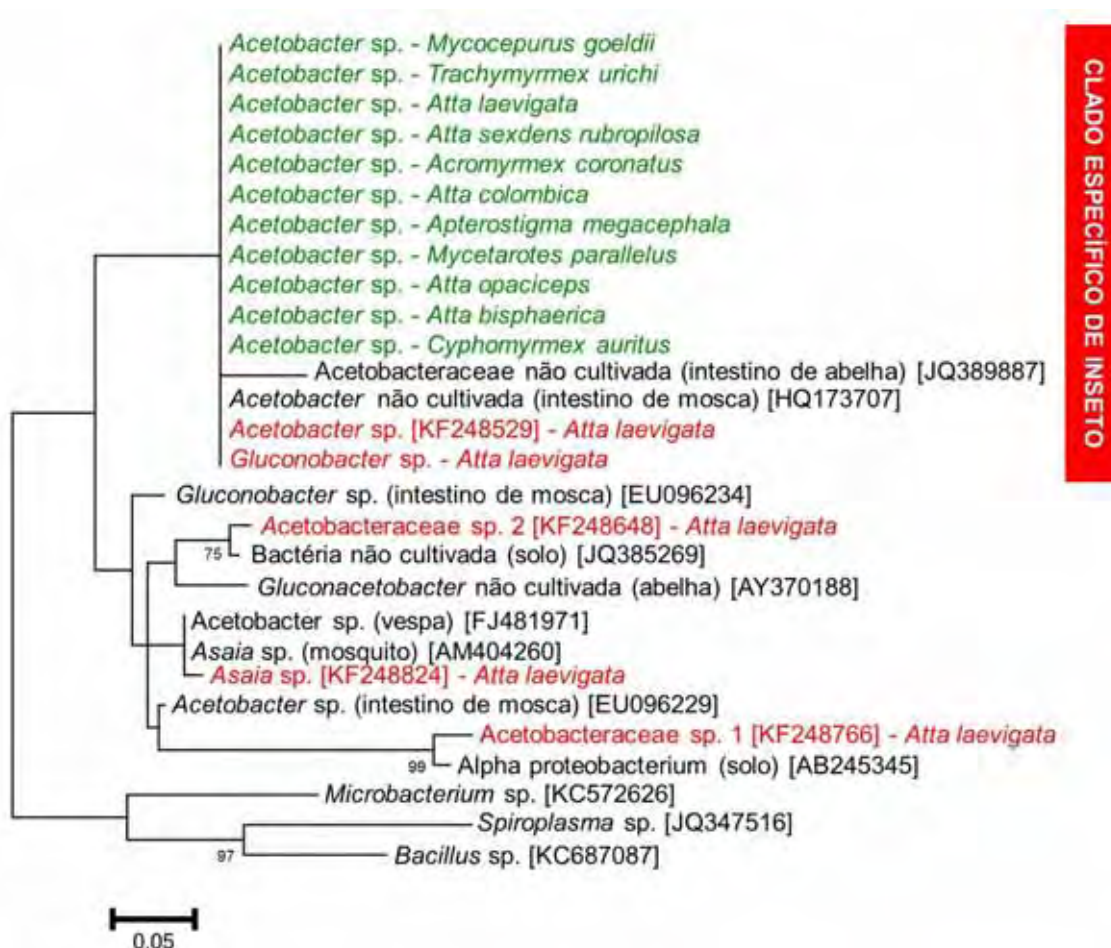
É possível que algumas das espécies de Rhizobiales identificadas nas formigas Attini, também tenham função de fixação de nitrogênio.

Figura 15 Árvore filogenética de Rhizobiales associados às formigas Attini e seqüências estreitamente relacionadas. A topologia da árvore foi obtida através de uma análise de máxima verossimilhança de 400 nucleotídeos do gene 16S rRNA de Rhizobiales associados às formigas Attini e seqüências relacionadas mais próximas recuperadas do GenBank®. Números abaixo dos ramos indicam os valores de *Bootstrap*. (verde) seqüências obtidas por PCR usando os *primers* específicos; (vermelho) seqüências representativas da Ordem Rhizobiales encontradas nas bibliotecas de *A. laevigata* e *T. urichi*. Números de acesso do GenBank® estão mostrados entre colchetes.



As bactérias cuticulares *Acetobacter* sp. e *Gluconobacter* sp. estão muito intimamente relacionadas entre si e semelhantes a outros microrganismos da Ordem Rhodospirillales associados a insetos (Figura 16). A bactéria cuticular *Asaia* sp. está intimamente relacionada a bactérias associadas a outros insetos. Portanto parece ter ocorrido uma especialização destas bactérias com insetos.

Figura 16 **Árvore filogenética de Rhodospirillales associados às formigas Attini e sequências estreitamente relacionadas.** A topologia da árvore foi obtida através de uma análise de máxima verossimilhança de 376 nucleotídeos do gene 16S rRNA de Rhodospirillales associados às formigas Attini e sequências relacionadas mais próximas recuperadas do GenBank®. Números abaixo dos ramos indicam os valores de *Bootstrap*. (verde) sequências obtidas por PCR usando os *primers* específicos; (vermelho) sequências representativas da Ordem Rhodospirillales encontradas na biblioteca de *A. laevigata*. Números de acesso do GenBank® estão mostrados entre colchetes.



Essa especialização não ocorreu para os outros dois simbiontes analisados (*Burkholderia* sp. 1 e Propionibacteriaceae), que foram mais semelhantes a bactérias provenientes do solo.

Os resultados mostram que as espécies de Burkholderiales associadas às formigas Attini são semelhantes a microrganismos que vivem numa variedade de ambientes como o solo, plantas ou diversos grupos de animais (Figura 17). Da mesma forma, nenhuma evidência de especialização foi encontrada nas bactérias Actinomycetales associadas às formigas Attini (Figura 18). Ambas as bactérias parecem ter sido adquiridas do meio ambiente recentemente, já que são similares a bactérias provenientes de solo, plantas e outras fontes. A falta de congruência entre a topologia da árvore filogenética das formigas Attini e das árvores filogenéticas de Burkholderiales e Actinomycetales também indicam que a aquisição destas bactérias deve ser do meio ambiente.

SANTOS e colaboradores (2004) também constataram que *Burkholderia* sp. poderia ser seletivamente adquirida pelas formigas do meio ambiente, já que identificaram a mesma *Burkholderia* sp. produtora de antibiótico no jardim de fungo e no solo adjacente.

Aquisições múltiplas e do meio ambiente já foram constatadas em formigas Attini. Actinobactérias produtoras de compostos antifúngicos associadas à *Acromyrmex octospinosus* também são provenientes do solo (BARKE et al., 2010; KOST et al., 2007; SEN et al., 2009). Diferentes estudos que isolaram uma espécie de *Streptomyces* da attínea *Acromyrmex* verificaram que esta bactéria é uma mutualista regular nestas formigas, mas o fato deste simbiote produzir um antifúngico que também é difundido em espécies de *Streptomyces* não associada a formigas, sugere que as formigas adquiriram esta espécie a partir do ambiente recentemente (BARKE et al., 2010; HAEDER et al., 2009; KOST et al., 2007).

Figura 17 Árvore filogenética de Burkholderiales associados às formigas Attini e seqüências estreitamente relacionadas.

A topologia da árvore foi obtida através de uma análise de máxima verossimilhança de 199 nucleotídeos do gene 16S rRNA de Burkholderiales associados às formigas Attini e seqüências relacionadas mais próximas recuperadas do GenBank®. Números abaixo dos ramos indicam os valores de *Bootstrap*. (verde) seqüências obtidas por PCR usando os *primers* específicos; (vermelho) seqüências representativas da Ordem Burkholderiales encontradas nas bibliotecas de *A. laevigata* e *M. goeldii*. Números de acesso do GenBank® estão mostrados entre colchetes.

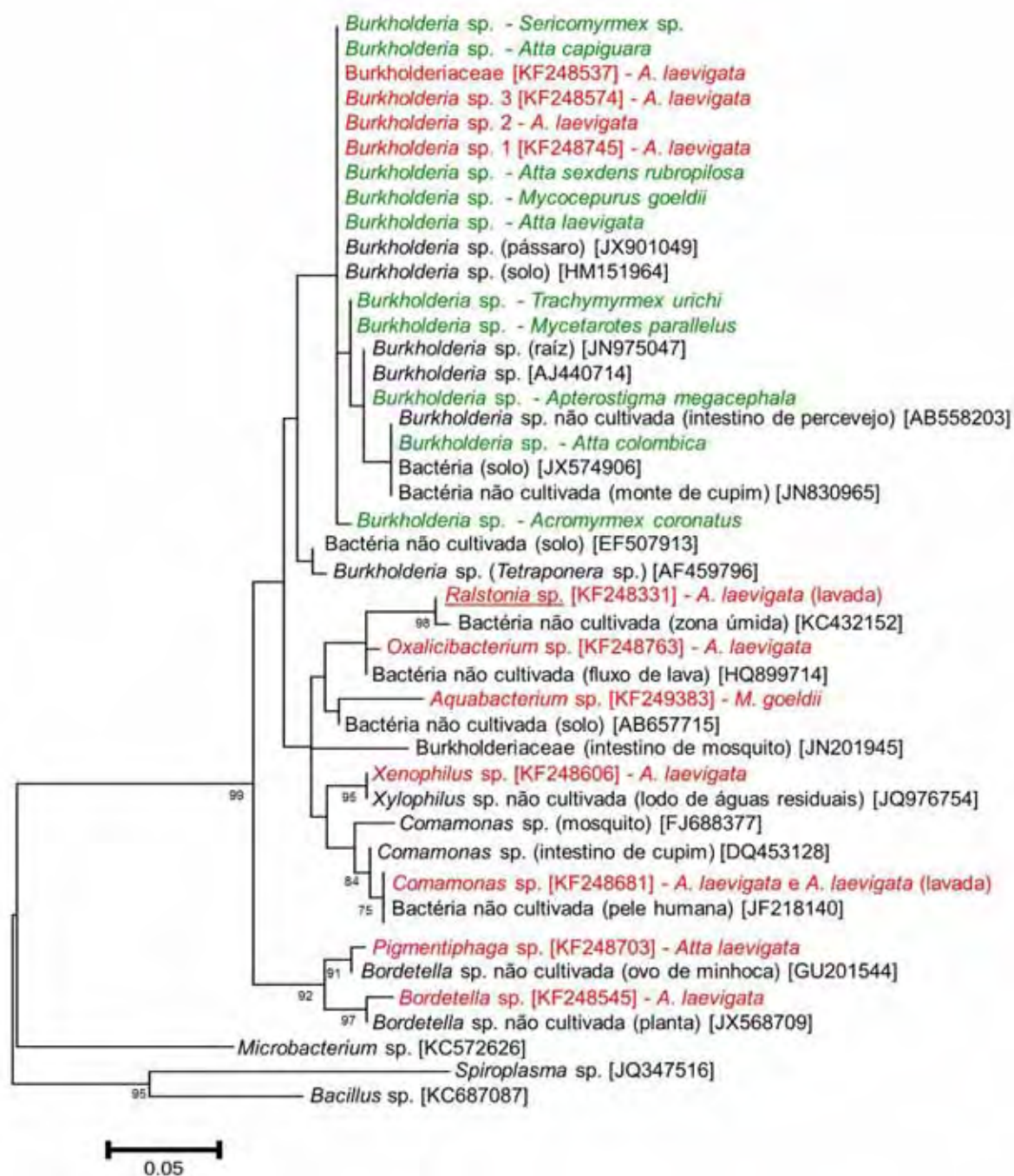
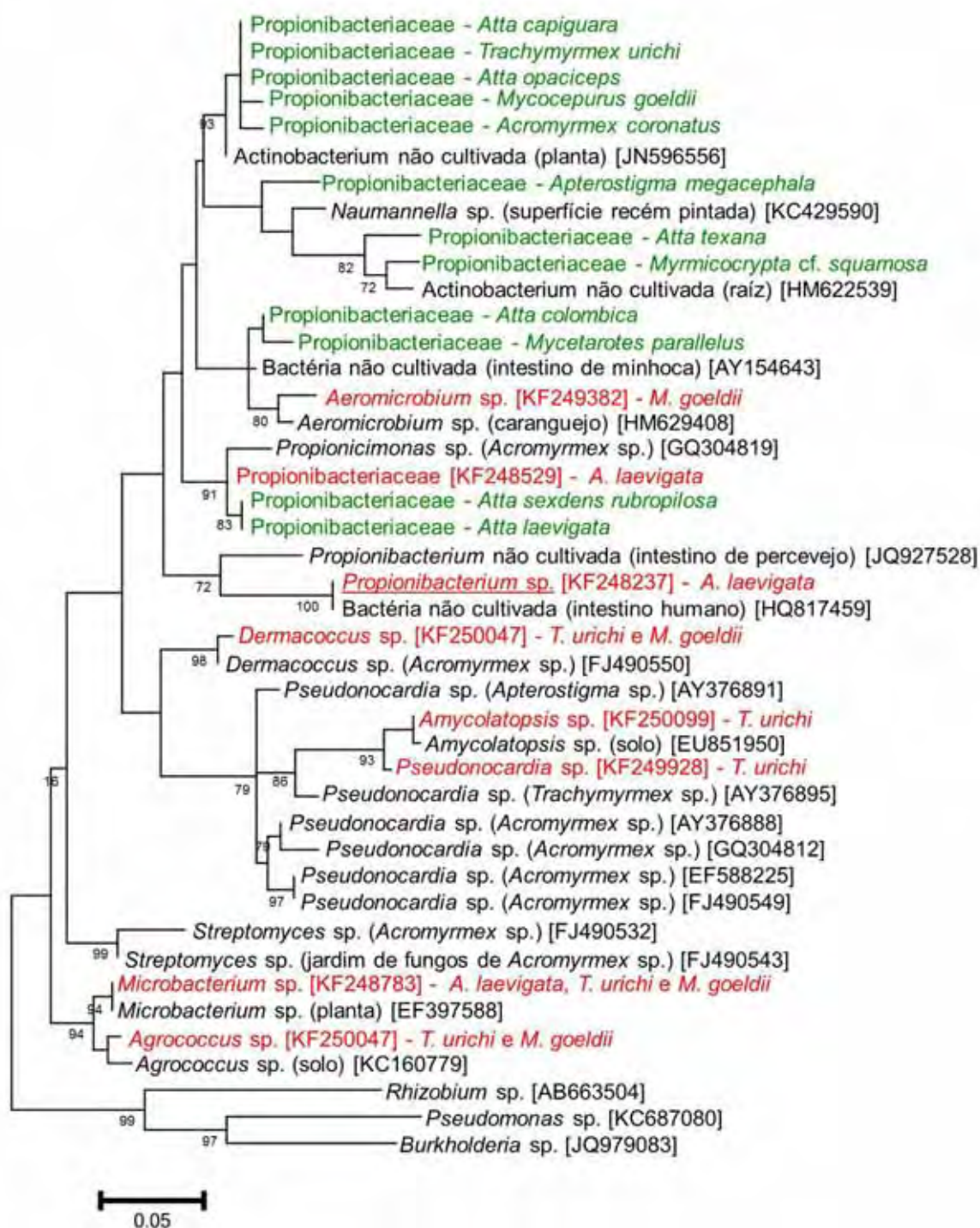


Figura 18 Árvore filogenética de Actinomycetales associados às formigas Attini e seqüências estreitamente relacionadas.

A topologia da árvore foi obtida através de uma análise de máxima verossimilhança de 306 nucleotídeos do gene 16S rRNA de Actinomycetales associados às formigas Attini e seqüências relacionadas mais próximas recuperadas do GenBank®. Números abaixo dos ramos indicam os valores de *Bootstrap*. (verde) seqüências obtidas por PCR usando os *primers* específicos; (vermelho) seqüências representativas da Ordem Burkholderiales encontradas nas bibliotecas de *A. laevigata*, *T. urichi* e *M. goeldii*. Números de acesso do GenBank® estão mostrados entre colchetes.



As supostas bactérias fixadoras de nitrogênio Rhizobiales sp. 2 e *Acetobacter* sp. associadas às formigas Attini são aparentemente especializadas em associações com outras formigas ou insetos, enquanto que para as possíveis produtoras de antibiótico *Burkholderia* sp. 1 e Propionibacteriaceae nenhuma evidência de tal especialização foi revelada.

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que existe uma especialização contínua da simbiose envolvendo as bactérias associadas às formigas Attini. Num primeiro momento esta associação não tem uma função específica, são apenas bactérias vetorizadas ou os simbiosites comensais que não atingem grandes populações e são eliminados nos processos de limpeza das formigas.

A segunda etapa de uma simbiose mais elaborada, ganhando cada vez mais importância para a vida de formiga, parece ser representada por alguns microrganismos que podem ter escapado do processo de limpeza realizado pelas formigas e atingido um grande tamanho da população, colonizando a cutícula das formigas. Entre estes microrganismos, foram caracterizadas duas espécies de *Wolbachia*, uma espécie de Erysipelotrichales, *Burkholderia* sp. 1, uma espécie de Propionibacteriaceae, *Acetobacter* sp. e *Streptococcus* sp. A predominância destas espécies e, aparentemente, o alto nível de sucesso em colonizar a cutícula das formigas sugerem que as bactérias acima mencionadas tenham papéis importantes na vida das formigas. A classificação filogenética de algumas delas em grupos microbianos de bactérias produtoras de antibióticos sugere que as formigas podem se beneficiar da associação com estes microrganismos.

Na Attini mais plesiomórfica *M. goeldii* foi encontrada associação com duas espécies de *Wolbachia* (sp. 1 e sp. 2), externas ao corpo da formiga. Além disso, na Attini no estágio intermediário *T. urichi*, a espécie cuticular *Wolbachia* sp. 2 foi completamente substituída por *Wolbachia* sp. 1. Isto também sugere que ocorreu uma especialização na associação *T. urichi*-*Wolbachia* sp. 1, embora o papel das espécies de *Wolbachia* supostamente cuticulares para as formigas permaneça obscuro. Essa especialização não foi encontrada nas formigas Attini cortadeiras mais derivadas, que parecem ter perdido completamente as *Wolbachia* mutualistas.

Microrganismos mutualistas também parecem desempenhar um papel nos intestinos, como *Spiroplasma* sp. 1, que dominou o intestino da Attini mais basal *M. goeldii*. Curiosamente, na filogeneticamente intermediária *T. urichi*, essa espécie de

Spiroplasma foi quase totalmente substituída por duas espécies de Rhizobiales (sp. 1 predominante e sp. 2 em uma população menor), assim como uma única espécie Rhizobiales sp. 2 dominou os intestinos de *A. laevigata*. Estas bactérias estão classificadas no grupo de microrganismos fixadores de nitrogênio, por isso parece que uma associação das formigas Attini e bactérias fixadoras de nitrogênio poderia ter se tornado mais específica durante a evolução das Attini.

No estado plesiomórfico representado por *M. goeldii*, nenhuma associação com Rhizobiales existiria. Em um estado intermediário, duas espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio invadiram os intestinos das formigas Attini. As formigas mais derivadas podem ter refinado a simbiose através da seleção de uma única espécie de bactérias para fixar nitrogênio. Esta especialização com uma única espécie bacteriana é parecida com a especialização das formigas cortadeiras em cultivar uma única espécie de fungo mutualista, sugerindo que as Attini mais derivadas tenham desenvolvido a capacidade de selecionar uma variedade menor de parceiros mutualistas. A associação com bactérias fixadoras de nitrogênio teria melhorado a assimilação de nitrogênio pelas formigas, contribuindo para um aumento no tamanho do corpo e da população do ninho, que pode ser observado pela grande diferença das colônias das attíneas mais primitivas para as mais derivadas. JAFFE e colaboradores (1993) sugeriram que o sistema de castas da sociedade das formigas Attini reflete o padrão de consumo de oxigênio dos indivíduos do ninho. Em todas as espécies examinadas, a exigência de energia por unidade de massa de indivíduos de uma colônia de formigas estava relacionada com o tamanho da operária (JAFFE; HEBLING-BERALDO, 1993).

O sucesso ecológico de formigas cortadeiras está atrelado à capacidade das suas associações simbióticas. Mas também muito ligado à sua habilidade em quebrar barreiras nas plantas nocivas para o crescimento do fungo (como a produção de antifúngicos), e o jardim de fungo em neutralizar as toxinas que podem ser produzidas pelas plantas nocivas às formigas (CHERRETT; POWELL; STRADLING, 1989). As formigas cortadeiras, graças a essa habilidade, são capazes de usar uma grande diversidade de Famílias de plantas, ao contrário da maioria dos insetos herbívoros, que se especializam em algumas espécies de plantas (PINTO-TOMAS et al., 2009).

No entanto, o fato das cortadeiras dependerem do material vegetal coletado, significa que suas colônias são potencialmente limitadas em nitrogênio. O trabalho

de PINTO-TOMÁS e colaboradores (2009) mostrou que essas formigas superaram essa limitação através de associações simbióticas com bactérias fixadoras de nitrogênio (*Klebsiella*) nos jardins de fungos. Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que as cortadeiras e outras formigas Attini superam esta limitação através, também, de associações com microrganismos fixadores de nitrogênio (Rhizobiales) presentes no intestino.

Alguns autores postulam que o ecossistema jardim de fungo serve como um intestino externo para o formigueiro (AYLWARD et al., 2012; PINTO-TOMAS et al., 2009; SUEN et al., 2010), responsável pela conversão e assimilação de nutrientes. As attíneas parecem ter selecionado bactérias de diferentes taxas, mas com funções semelhantes para seus “intestinos”: jardim de fungo e seu verdadeiro intestino.

5 CONCLUSÕES

O trabalho realizado permitiu a caracterização de bactérias associadas às formigas *A. laevigata*, *T. urichi* e *M. goeldii*, bem como a identificação de bactérias simbiotes prevalentes.

As três espécies de attíneas estudadas apresentaram comunidades bacterianas específicas.

A discriminação de bactérias internas e externas ao corpo das formigas foi possível devido à padronização e aplicação do protocolo de lavagem desenvolvido no presente trabalho.

Com os dados obtidos foi possível inferir sobre a evolução das associações simbióticas das formigas Attini:

- bactérias mutualistas no grupo de fixadoras de nitrogênio apresentaram especialização nas associações com formigas (*Rhizobiales* sp. 2) e com outros insetos (*Acetobacter* sp.), e por formarem um grupo monofilético, parecem ter sido adquiridas uma única vez ao longo da evolução.

- bactérias mutualistas no grupo das produtoras de antibióticos (*Burkholderia* sp. 1 e *Propionibacteriaceae*) não apresentaram especialização nas associações com formigas ou outros insetos, e parecem ter sido adquiridas recentemente do meio ambiente e por múltiplas vezes.

REFERÊNCIAS

- AKMAN, L. et al. Genome sequence of the endocellular obligate symbiont of tsetse flies, *Wigglesworthia glossinidia*. **Nature Genetics**, v. 32, n. 3, p. 402-407, 2002.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- ANDERSEN, S. B. et al. Dynamic *Wolbachia* prevalence in *Acromyrmex* leaf-cutting ants: potential for a nutritional symbiosis. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 25, n. 7, p. 1340-1350, 2012.
- ANDERSON, K. E. et al. Highly similar microbial communities are shared among related and trophically similar ant species. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 9, p. 2282-2296, 2012.
- ANTWEB. <http://www.antweb.org> 2002.
- ARCHETTI, M. et al. Let the right one in: a microeconomic approach to partner choice in mutualisms. **American Naturalist**, v. 177, n. 1, p. 75-85, 2011.
- AYLWARD, F. O. et al. Metagenomic and metaproteomic insights into bacterial communities in leaf-cutter ant fungus gardens. **ISME Journal**, v. 6, n. 9, p. 1688-1701, 2012.
- BACCI, M. et al. Biopolymer-degrading bacteria from nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 28, n. 1, p. 79-82, 1995.
- BALAKIREV, E. S.; PAVLYUCHKOV, V. A.; AYALA, F. J. DNA variation and symbiotic associations in phenotypically diverse sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 42, p. 16218-16223, 2008.
- BARKE, J. et al. A mixed community of actinomycetes produce multiple antibiotics for the fungus farming ant *Acromyrmex octospinosus*. **BMC Biology**, v. 8, 2010.
- BARKE, J. et al. A mutualistic microbiome How do fungus-growing ants select their antibiotic-producing bacteria? **Communicative & Integrative Biology**, v. 4, n. 1, p. 41-43, 2011.
- BAZIN, J. et al. Complexity of miRNA-dependent regulation in root symbiosis. **Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences**, v. 367, n. 1595, p. 1570-1579, 2012.
- BENSON, D. A. et al. GenBank. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D36-D42, 2013.
- BOLTON, B. **An online catalog of the ants of the world**. <http://antcat.org> 2013.

BOSSHARD, P. P. et al. Ribosomal DNA sequencing for identification of aerobic gram-positive rods in the clinical laboratory (an 18-month evaluation). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4134-4140, 2003.

BOURSAUX-EUDE, C.; GROSS, R. New insights into symbiotic associations between ants and bacteria. **Research in Microbiology**, v. 151, n. 7, p. 513-519, 2000.

BRENNER, D. J.; STALEY, J. T.; KRIEG, N. R. **Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology**. GARRITY, G.: Hardcover. 2: The Proteobacteria 2005.

BULL, J. J.; RICE, W. R. Distinguishing mechanisms for the evolution of cooperation. **Journal of Theoretical Biology**, v. 149, n. 1, p. 63-74, 1991.

CAFARO, M. J.; CURRIE, C. R. Phylogenetic analysis of mutualistic filamentous bacteria associated with fungus-growing ants. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 441-446, 2005.

CAFARO, M. J. et al. Specificity in the symbiotic association between fungus-growing ants and protective *Pseudonocardia* bacteria. **Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences**, v. 278, n. 1713, p. 1814-1822, 2011.

CARREIRO, S. C. et al. Occurrence of killer yeasts in leaf-cutting ant nests. **Folia Microbiologica**, v. 47, n. 3, p. 259-262, 2002.

CASTRO, H. F. et al. Soil microbial community responses to multiple experimental climate change drivers. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 4, p. 999-1007, 2010.

CHAPELA, I. H. et al. Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi. **Science**, v. 266, n. 5191, p. 1691-1694, 1994.

CHERRETT, J. M.; POWELL, R. J.; STRADLING, D. J. Insect fungus interactions. In: COLLINS, N. M.; HAMMOND, P. M., et al, 14th Symposia of the Royal Entomological Society of London. Academic Press. p.93-120.

CLARRIDGE, J. E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 4, p. 840-862, 2004.

COCKBURN, S. N. et al. Dynamics of the continent-wide spread of a *Drosophila* defensive symbiont. **Ecology Letters**, v. 16, n. 5, p. 609-616, 2013.

COLE, J. R. et al. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. D141-D145, 2009.

COSTA, A. N. et al. Do herbivores exert top-down effects in Neotropical savannas? Estimates of biomass consumption by leaf-cutter ants. **Journal of Vegetation Science**, v. 19, n. 6, p. 849-854, 2008.

CROTTI, E. et al. *Asaia*, a versatile acetic acid bacterial symbiont, capable of cross-colonizing insects of phylogenetically distant genera and orders. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 12, p. 3252-3264, 2009.

CROTTI, E. et al. Acetic acid bacteria, newly emerging symbionts of insects. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 21, p. 6963-6970, 2010.

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, n. 1, p. 99-106, 2001b.

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

CURRIE, C. R. et al. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. **Nature**, v. 423, n. 6938, p. 461-461, 2003.

CURRIE, C. R. et al. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. **Nature**, v. 398, n. 6729, p. 701-704, 1999.

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

DADHWAL, M. et al. Proposal of biostimulation for hexachlorocyclohexane (HCH)-decontamination and characterization of culturable bacterial community from high-dose point HCH-contaminated soils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 2, p. 381-392, 2009.

DE FINE LICHT, H. H. et al. Laccase detoxification mediates the nutritional alliance between leaf-cutting ants and fungus-garden symbionts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 2, p. 583-587, 2013.

DE SIQUEIRA, C. G. et al. Metabolism of plant polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 12, p. 4820-4822, 1998.

DE SOUZA, D. J. et al. *Blochmannia* endosymbionts improve colony growth and immune defence in the ant *Camponotus fellah*. **BMC Microbiology**, v. 9, 2009.

DEGNAN, P. H. et al. Host-symbiont stability and fast evolutionary rates in an ant-bacterium association: cospeciation of *Camponotus* species and their endosymbionts, candidate *Blochmannia*. **Systematic Biology**, v. 53, n. 1, p. 95-110, 2004.

DELLA-LUCIA, T. M. C. **Formigas cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa, MG: UFV, 2011.

DILLON, R. J.; CHARNLEY, A. K. Chemical barriers to gut infection in the desert locust: in-vivo production of antimicrobial phenols associated with the bacterium *Pantoea agglomerans*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 66, n. 1, p. 72-75, 1995.

DILLON, R. J.; DILLON, V. M. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. **Annual Review of Entomology**, v. 49, p. 71-92, 2004.

DOUGLAS, A. E. The microbial dimension in insect nutritional ecology. **Functional Ecology**, v. 23, n. 1, p. 38-47, 2009.

DRANCOURT, A.; RAOULT, D. Sequence-based identification of new bacteria: a proposition for creation of an orphan bacterium repository. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 9, p. 4311-4315, 2005.

DUNBAR, J. et al. Common bacterial responses in six ecosystems exposed to 10 years of elevated atmospheric carbon dioxide. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 1145-1158, 2012.

DURHAM, A. M. et al. EGene: A configurable pipeline generation system for automated sequence analysis. **Bioinformatics**, v. 21, n. 12, p. 2812-2813, 2005.

ELEFThERIANOS, I. et al. Endosymbiotic bacteria in insects: guardians of the immune system? **Frontiers in Physiology**, v. 4, n. 46, p. 1-10, 2013.

ELSHAHED, M. S. et al. Novelty and uniqueness patterns of rare members of the soil biosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 17, p. 5422-5428, 2008.

ERTHAL, M., JR. et al. Hydrolytic enzymes of leaf-cutting ant fungi. **Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology**, v. 152, n. 1, p. 54-59, 2009.

FAVIA, G. et al. Bacteria of the genus *Asaia* stably associate with *Anopheles stephensi*, an Asian malarial mosquito vector. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 21, p. 9047-9051, 2007.

FELDHAAAR, H.; GROSS, R. Insects as hosts for mutualistic bacteria. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 299, p. 1-8, 2009.

FELSENSTEIN, J. Confidence-limits on phylogenies - an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, n. 4, p. 783-791, 1985.

FEMI-OLA, T. O.; BABALOLA, A. G. Microbiology of the gut of the kola nut weevil, *Balanogastriis kolae*. **Journal of Insect Science**, v. 12, p. 1-6, 2012.

FERNANDEZ-MARIN, H. et al. Dynamic disease management in *Trachymyrmex* fungus-growing ants (Attini: Formicidae). **American Naturalist**, v. 181, n. 4, p. 571-582, 2013.

FERRO, M. **Desenvolvimento de pipelines para análise de EST, bibliotecas ITS e 16S para estudos genômicos em formigas Attini**. 2013. 131 (Doutorado). Instituto de Biociências - Centro de Estudos de Insetos Sociais, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Rio Claro - SP.

FROST, C. L. et al. Multiple gains and losses of *Wolbachia* symbionts across a tribe of fungus-growing ants. **Molecular Ecology**, v. 19, n. 18, p. 4077-4085, 2010.

FUNARO, C. F. et al. Army ants harbor a host-specific clade of Entomoplasmatales bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 1, p. 346-350, 2011.

GIL, R.; LATORRE, A.; MOYA, A. Bacterial endosymbionts of insects: insights from comparative genomics. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 11, p. 1109-1122, 2004.

GIL, R. et al. Extreme genome reduction in *Buchnera* spp.: toward the minimal genome needed for symbiotic life. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 7, p. 4454-4458, 2002.

GUEDES, F. L. A.; ATTILI-ANGELIS, D.; PAGNOCCA, F. C. Selective isolation of dematiaceous fungi from the workers of *Atta laevigata* (Formicidae: Attini). **Folia Microbiologica**, v. 57, n. 1, p. 21-26, 2012.

HACKETT, K. J. et al. Cultivation of the *Drosophila* sex-ratio *Spiroplasma*. **Science**, v. 232, n. 4755, p. 1253-1255, 1986.

HAEDER, S. et al. Candicidin-producing *Streptomyces* support leaf-cutting ants to protect their fungus garden against the pathogenic fungus *Escovopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 12, p. 4742-4746, 2009.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HANSEL, C. M. et al. Changes in bacterial and archaeal community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 5, p. 1620-1633, 2008.

HASELKORN, T. S. The *Spiroplasma* heritable bacterial endosymbiont of *Drosophila*. **Evolution**, v. 64, n. 1, p. 80-87, 2010.

HASELKORN, T. S. et al. Infectious adaptation: potential host range of a defensive endosymbiont in *Drosophila*. **Evolution**, v. 67, n. 4, p. 934-945, 2013.

HIMLER, A. G. et al. No sex in fungus-farming ants or their crops. **Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences**, v. 276, n. 1667, p. 2611-2616, 2009.

HINKLE, G. et al. Phylogeny of the attine ant fungi based on analysis of small-subunit ribosomal-RNA gene-sequences. **Science**, v. 266, n. 5191, p. 1695-1697, 1994.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The ants**. Cambridge (MA): Belknap Press (Harvard University Press), 1990.

HOSOKAWA, T. et al. *Wolbachia* as a bacteriocyte-associated nutritional mutualist. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 2, p. 769-774, 2010.

HU, J.; LI, D. P. Nitrite removal performance and community structure of nitrite-oxidizing and heterotrophic bacteria suffered with organic matter. **Current Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 287-293, 2008.

HUGENHOLTZ, P. Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. **Genome Biology**, v. 3, n. 2, 2002.

HUGHES, W. H. O.; BOOMSMA, J. J. Let or enemy do the work: within-host interactions between two fungal parasites of leaf-cutting ants. **Proceedings Biological Sciences**, v. B 271, p. S104-S106, 2004.

IKEDA, S. et al. The genotype of the calcium/calmodulin-dependent protein kinase gene (CCaMK) determines bacterial community diversity in rice roots under paddy and upland field conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 13, p. 4399-4405, 2011.

ISHAK, H. D. et al. Microbiomes of ant castes implicate new microbial roles in the fungus-growing ant *Trachymyrmex septentrionalis*. **Scientific Reports**, v. 1, n. 204, p. 1-12, 2011a.

ISHAK, H. D. et al. Bacterial diversity in *Solenopsis invicta* and *Solenopsis geminata* ant colonies characterized by 16S amplicon 454 pyrosequencing. **Microbial Ecology**, v. 61, n. 4, p. 821-831, 2011b.

JAENIKE, J. et al. Adaptation via symbiosis: recent spread of a *Drosophila* defensive symbiont. **Science**, v. 329, n. 5988, p. 212-215, 2010.

JAFFE, K.; HEBLING-BERALDO, M. J. Oxygen consumption and the evolution of order: negentropy criteria applied to the evolution of ants. **Experientia**, v. 49, n. 6-7, p. 587-592, 1993.

JANGID, K. et al. Land-use history has a stronger impact on soil microbial community composition than aboveground vegetation and soil properties. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 43, n. 10, p. 2184-2193, 2011.

JANSON, E. M. et al. Phytophagous insect-microbe mutualisms and adaptive evolutionary diversification. **Evolution**, v. 62, n. 5, p. 997-1012, 2008.

JEYAPRAKASH, A.; HOY, M. A.; ALLSOPP, M. H. Bacterial diversity in worker adults of *Apis mellifera capensis* and *Apis mellifera scutellata* (Insecta : Hymenoptera) assessed using 16S rRNA sequences. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 84, n. 2, p. 96-103, 2003.

KAUTZ, S. et al. Surveying the microbiome of ants: comparing 454 pyrosequencing with traditional methods to uncover bacterial diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 2, p. 525-534, 2013.

KIKUCHI, Y. Endosymbiotic bacteria in insects: their diversity and culturability. **Microbes and Environments**, v. 24, n. 3, p. 195-204, 2009.

KIKUCHI, Y.; HOSOKAWA, T.; FUKATSU, T. An ancient but promiscuous host-symbiont association between *Burkholderia* gut symbionts and their heteropteran hosts. **ISME Journal**, v. 5, n. 3, p. 446-460, 2011.

KIM, B. Y. et al. *Niabella aurantiaca* gen. nov., sp nov., isolated from a greenhouse soil in Korea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 538-541, 2007.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide-sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, n. 2, p. 111-120, 1980.

KOCH, H. et al. Diversity and evolutionary patterns of bacterial gut associates of corbiculate bees. **Molecular Ecology**, v. 22, n. 7, p. 2028-2044, 2013.

KOMMANEE, J. et al. *Gluconobacter nephelii* sp. nov., an acetic acid bacterium in the class Alphaproteobacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, p. 2117-2122, 2011.

KOST, C. et al. Non-specific association between filamentous bacteria and fungus-growing ants. **Naturwissenschaften**, v. 94, n. 10, p. 821-828, 2007.

KOUNATIDIS, I. et al. *Acetobacter tropicalis* is a major symbiont of the olive fruit fly (*Bactrocera oleae*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 10, p. 3281-3288, 2009.

LAMBAIS, M. R. et al. Bacterial diversity in tree canopies of the Atlantic forest. **Science**, v. 312, n. 5782, p. 1917-1917, 2006.

LATORRE, A. et al. Chromosomal stasis versus plasmid plasticity in aphid endosymbiont *Buchnera aphidicola*. **Heredity**, v. 95, n. 5, p. 339-347, 2005.

LATTKE, J. E. Revisión del género *Apterostigma* Mayr (Hymenoptera: Formicidae). **Archivos de Zoología**, 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, n. 4, p. 376-382, 2000.

LEHMAN, R.; LUNDGREN, J.; PETZKE, L. Bacterial communities associated with the digestive tract of the predatory ground beetle, *Poecilus chalcites*, and their modification by laboratory rearing and antibiotic treatment. **Microbial Ecology**, v. 57, n. 2, p. 349-358, 2009.

LINDOW, S. E.; BRANDL, M. T. Microbiology of the phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 4, p. 1875-1883, 2003.

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

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

LITTLE, A. E. F.; CURRIE, C. R. Parasites may help stabilize cooperative relationships. **Bmc Evolutionary Biology**, v. 9, 2009.

LIU, D. F. et al. Degradation of potassium rock by earthworms and responses of bacterial communities in its gut and surrounding substrates after being fed with mineral. **Plos One**, v. 6, n. 12, 2011.

LIU, Y. Q. et al. Bacterial diversity in the snow over Tibetan Plateau Glaciers. **Extremophiles**, v. 13, n. 3, p. 411-423, 2009.

LOZUPONE, C.; HAMADY, M.; KNIGHT, R. UniFrac - An online tool for comparing microbial community diversity in a phylogenetic context. **BMC Bioinformatics**, v. 7, 2006.

LUKASIK, P. et al. Unrelated facultative endosymbionts protect aphids against a fungal pathogen. **Ecology Letters**, v. 16, n. 2, p. 214-218, 2013.

MADHAIYAN, M. et al. *Microbacterium azadirachtae* sp. nov., a plant-growth-promoting actinobacterium isolated from the rhizoplane of neem seedlings. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p. 1687-1692, 2010.

MANTOVANI, J. D. et al. **Diversidade de fungos associados a operárias da formiga cortadeira *Atta laevigata* (Formicidae: Attini): comunicação pessoal** 2013.

MARTIN, M. M. The evolution of insect-fungus associations: from contact to stable symbiosis. **American Zoologist**, v. 32, n. 4, p. 593-605, 1992.

MATSUURA, Y. et al. Novel clade of alphaproteobacterial endosymbionts associated with stinkbugs and other arthropods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 12, p. 4149-4156, 2012.

MATTOSO, T. C.; MOREIRA, D. D. O.; SAMUELS, R. I. Symbiotic bacteria on the cuticle of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus* protect workers from attack by entomopathogenic fungi. **Biology Letters**, v. 8, n. 3, p. 461-464, 2012.

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, 2010.

MELO, I. S. et al. **Recursos Genéticos & Melhoramento - Microrganismos**. 1. Campinas: Embrapa - Meio Ambiente, 2002. 743

MENDES, T. D. et al. Generation of nutrients and detoxification: possible roles of yeasts in leaf-cutting ant nests. **Insects**, v. 3, p. 228-245, 2012.

MUELLER, U. G. et al. Coevolution between attine ants and actinomycete bacteria: a reevaluation. **Evolution**, v. 62, n. 11, p. 2894-2912, 2008.

MUELLER, U. G. et al. Placement of attine ant-associated *Pseudonocardia* in a global *Pseudonocardia* phylogeny (Pseudonocardiaceae, Actinomycetales): a test of two symbiont-association models. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 98, n. 2, p. 195-212, 2010.

MUELLER, U. G.; REHNER, S. A.; SCHULTZ, T. R. The evolution of agriculture in ants. **Science**, v. 281, n. 5385, p. 2034-2038, 1998.

MUELLER, U. G. et al. The origin of the attine ant-fungus mutualism. **Quarterly Review of Biology**, v. 76, n. 2, p. 169-197, 2001.

NAWROCKI, E. P.; EDDY, S. R. Query-dependent banding (QDB) for faster RNA similarity searches. **PLoS Computational Biology**, v. 3, n. 3, p. 540-554, 2007.

OH, D. C. et al. Dentigerumycin: a bacterial mediator of an ant-fungus symbiosis. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 6, p. 391-393, 2009.

OKUBO, T. et al. Nodulation-dependent communities of culturable bacterial endophytes from stems of field-grown soybeans. **Microbes and Environments**, v. 24, n. 3, p. 253-258, 2009.

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

PANNEBAKKER, B. A. et al. Parasitic inhibition of cell death facilitates symbiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 1, p. 213-215, 2007.

PETERSON, J. et al. The NIH Human Microbiome Project. **Genome Research**, v. 19, n. 12, p. 2317-2323, 2009.

PETROSINO, J. F. et al. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 5, p. 856-866, 2009.

PFEIFFER, M.; HUTTENLOCHER, H.; AYASSE, M. Myrmecochorous plants use chemical mimicry to cheat seed-dispersing ants. **Functional Ecology**, v. 24, n. 3, p. 545-555, 2010.

PINTO-TOMAS, A. A. et al. Symbiotic nitrogen fixation in the fungus gardens of leaf-cutter ants. **Science**, v. 326, n. 5956, p. 1120-1123, 2009.

POLZ, M. F.; CAVANAUGH, C. M. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 10, p. 3724-3730, 1998.

POULSEN, M. et al. Mutualistic bacteria and a possible trade-off between alternative defence mechanisms in *Acromyrmex* leaf-cutting ants. **Insectes Sociaux**, v. 49, n. 1, p. 15-19, 2002.

POULSEN, M. et al. Within-colony transmission and the cost of a mutualistic bacterium in the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus*. **Functional Ecology**, v. 17, n. 2, p. 260-269, 2003.

POULSEN, M.; CURRIE, C. R. Complexity of insect-fungal associations: exploring the influence of microorganisms on the attine ant-fungus symbiosis. **Insect Symbiosis**, v. 2, p. 57-77, 2006.

QUINLAN, R. J.; CHERRETT, J. M. Role of substrate preparation in symbiosis between leaf-cutting ant *Acromyrmex-octospinosus* (Reich) and its food fungus. **Ecological Entomology**, v. 2, n. 2, p. 161-170, 1977.

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 United States of America**, v. 105, n. 39, p. 14913-14917, 2008.

RAJAGOPAL, R. Beneficial interactions between insects and gut bacteria. **Indian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 114-119, 2009.

RASOLOFO, E. A. et al. Molecular analysis of bacterial population structure and dynamics during cold storage of untreated and treated milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 138, n. 1-2, p. 108-118, 2010.

RASTOGI, G.; SANI, R. K. Molecular techniques to assess microbial community structure, function, and dynamics in the environment. In: AHMAD, I.; AHMAD, F., et al (Ed.). **Microbes and microbial technology: agricultural and environmental applications**. New York: Springer Science, 2011.

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

RICKLEFS, R. E. Comunidades. In: (Ed.). **A economia da natureza**. 6. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. cap. 20, p.368-382.

RIDLEY, E. V. et al. Impact of the resident microbiota on the nutritional phenotype of *Drosophila melanogaster*. **PLoS One**, v. 7, n. 5, 2012.

RODRIGUES, A. et al. Microfungal "weeds" in the leafcutter ant symbiosis. **Microbial Ecology**, v. 56, n. 4, p. 604-614, 2008a.

RODRIGUES, A. et al. Antagonistic interactions between garden yeasts and microfungi garden pathogens of leaf-cutting ants. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 96, n. 3, p. 331-342, 2009.

RODRIGUES, A. et al. Leaf-cutting ant faecal fluid and mandibular gland secretion: effects on microfungi spore germination. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 64-67, 2008b.

RODRIGUES, A. et al. Ecology of microfungi communities in gardens of fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae): a year-long survey of three species of attine ants in Central Texas. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 78, n. 2, p. 244-255, 2011.

RODRIGUES, A. et al. Variability of non-mutualistic filamentous fungi associated with *Atta sexdens rubropilosa* nests. **Folia Microbiologica**, v. 50, n. 5, p. 421-425, 2005a.

RODRIGUES, A. et al. 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, 2005b.

RUSSELL, J. A. et al. Bacterial gut symbionts are tightly linked with the evolution of herbivory in ants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 50, p. 21236-21241, 2009.

SAMADDAR, N. et al. Nitrogen fixation in *Asaia* sp. (Family Acetobacteraceae). **Current Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 226-231, 2011.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 3rd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANCHEZ-CONTRERAS, M.; VLISIDOU, I. The diversity of insect-bacteria interactions and its applications for disease control. In: HARDING, S. E. e TOMBS, M. P. (Ed.). **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v.25, 2008. p.203-243.

SANTOS, A. V. et al. Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 239, n. 2, p. 319-323, 2004.

SAUER, C. et al. Systematic relationships and cospeciation of bacterial endosymbionts and their carpenter ant host species: proposal of the new taxon *Candidatus Blochmannia* gen. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 1877-1886, 2000.

SCHIØTT, M. et al. Towards a molecular understanding of symbiont function: Identification of a fungal gene for the degradation of xylan in the fungus gardens of leaf-cutting ants. **BMC Microbiology**, v. 8, 2008.

SCHIØTT, M. et al. Leaf-cutting ant fungi produce cell wall degrading pectinase complexes reminiscent of phytopathogenic fungi. **BMC Biology**, v. 8, 2010.

SCHLOSS, P. D. A high-throughput DNA sequence aligner for microbial ecology studies. **PLoS One**, v. 4, n. 12, 2009.

SCHLOSS, P. D. et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7537-7541, 2009.

SCHULTZ, T. R.; BRADY, S. G. Major evolutionary transitions in ant agriculture. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 14, p. 5435-5440, 2008.

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

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.

SEN, R. et al. Generalized antifungal activity and 454-screening of *Pseudonocardia* and *Amycolatopsis* bacteria in nests of fungus-growing ants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 42, p. 17805-17810, 2009.

SILVA-PINHATI, A. C. O. et al. 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**, v. 37, n. 10, p. 1463-1472, 2004.

SILVA, A. et al. Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. **Journal of Insect Physiology**, v. 49, n. 4, p. 307-313, 2003.

SILVA, A. et al. Susceptibility of the ant-cultivated fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Agaricales: Basidiomycota) towards microfungi. **Mycopathologia**, v. 162, n. 2, p. 115-119, 2006.

SIRVIO, A.; PAMILO, P. Multiple endosymbionts in populations of the ant *Formica cinerea*. **BMC Evolutionary Biology**, v. 10, 2010.

STOLL, S. et al. Bacterial microbiota associated with ants of the genus *Tetraponera*. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 90, n. 3, p. 399-412, 2007.

SUEN, G. et al. An insect herbivore microbiome with high plant Biomass-degrading capacity. **PLoS Genetics**, v. 6, n. 9, 2010.

SUEN, G. et al. The genome sequence of the leaf-cutter ant *Atta cephalotes* reveals insights into its obligate symbiotic lifestyle. **Plos Genetics**, v. 7, n. 2, 2011.

SULLAM, K. E. et al. Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: a meta-analysis. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 13, p. 3363-3378, 2012.

SUNDQUIST, A. et al. Bacterial flora-typing with targeted, chip-based Pyrosequencing. **BMC Microbiology**, v. 7, 2007.

TAMURA, K. et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Clustal-W - Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

TRINGE, S. G. et al. Comparative metagenomics of microbial communities. **Science**, v. 308, n. 5721, p. 554-557, 2005.

VAN BORM, S.; BILLEN, J.; BOOMSMA, J. J. The diversity of microorganisms associated with *Acromyrmex* leafcutter ants. **BMC Evolutionary Biology**, v. 2, 2002.

VAN BORM, S. et al. *Tetraponera* ants have gut symbionts related to nitrogen-fixing root-nodule bacteria. **Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences**, v. 269, n. 1504, p. 2023-2027, 2002.

VAUGHAN, E. E. et al. Molecular approaches to study probiotic bacteria. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, n. 12, p. 400-404, 1999.

VINHA, G. G. **Sistemática molecular de *Atta laevigata* (Smith 1858) e *Acromyrmex balzani* (Emery 1890)**. 2007. (Mestrado). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

WEBER, N. A. Gardening ants, the Attines. **Memoirs of the American Philosophical Society**, v. 92, p. 1-146, 1972.

WENNER, M. Humans Carry More Bacterial Cells than Human Ones. **Scientific American**, 2007.

WERNEGREEN, J. J. et al. Genome evolution in an insect cell: Distinct features of an ant-bacterial partnership. **Biological Bulletin**, v. 204, n. 2, p. 221-231, 2003.

WERREN, J. H.; BALDO, L.; CLARK, M. E. Wolbachia: master manipulators of invertebrate biology. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 10, p. 741-751, 2008.

WEYL, E. G. et al. Economic contract theory tests models of mutualism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 36, p. 15712-15716, 2010.

WHIPPS, J. M. et al. Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, n. 6, p. 1744-1755, 2008.

WILD, A. **Alex Wild Photography**. <http://www.alexanderwild.com> 2001.

WILLIAMSON, K. E. et al. Optimizing the indirect extraction of prokaryotic DNA from soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 43, n. 4, p. 736-748, 2011.

WILSON, D. S.; SOBER, E. Reviving the superorganism. **Journal of Theoretical Biology**, v. 136, n. 3, p. 337-356, 1989.

WOESE, C. R.; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 74, n. 11, p. 5088-5090, 1977.

WONG, C. N. A.; NG, P.; DOUGLAS, A. E. Low-diversity bacterial community in the gut of the fruitfly *Drosophila melanogaster*. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 7, p. 1889-1900, 2011.

WOO, P. C. Y. et al. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 10, p. 908-934, 2008.

XIE, J. L.; VILCHEZ, I.; MATEOS, M. *Spiroplasma* bacteria enhance survival of *Drosophila hydei* attacked by the parasitic wasp *Leptopilina heterotoma*. **PLoS One**, v. 5, n. 8, 2010.

YOUSSEF, N. et al. Comparison of species richness estimates obtained using nearly complete fragments and simulated pyrosequencing-generated fragments in 16S rRNA gene-based environmental surveys. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 16, p. 5227-5236, 2009.

YU, R. Q. et al. Contribution of coexisting sulfate and iron reducing bacteria to methylmercury production in freshwater river sediments. **Environmental Science & Technology**, v. 46, n. 5, p. 2684-2691, 2012.

ZEIGLER, D. R. Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 1893-1900, 2003.

ZHANG, J. Y.; LIU, X. Y.; LIU, S. J. *Agrococcus terreus* sp. nov. and *Micrococcus terreus* sp. nov., isolated from forest soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p. 1897-1903, 2010.

ZIENTZ, E. et al. Relevance of the endosymbiosis of *Blochmannia floridanus* and carpenter ants at different stages of the life cycle of the host. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 9, p. 6027-6033, 2006.

ZIENTZ, E. et al. Insights into the microbial world associated with ants. **Archives of Microbiology**, v. 184, n. 4, p. 199-206, 2005.

ZILBER-ROSENBERG, I.; ROSENBERG, E. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, n. 5, p. 723-735, 2008.

ZOUACHE, K. et al. Composition of bacterial communities associated with natural and laboratory populations of *Asobara tabida* infected with *Wolbachia*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 11, p. 3755-3764, 2009.

ZUCCHI, T. D.; GUIDOLIN, A. S.; CONSOLI, F. L. Isolation and characterization of actinobacteria ectosymbionts from *Acromyrmex subterraneus brunneus* (Hymenoptera, Formicidae). **Microbiological Research**, v. 166, n. 1, p. 68-76, 2011.