

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 31/05/2018.

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

**MICROBIOMA DE FORMIGAS COM ÊNFASE EM CAMPONOTINI
(HYMENOPTERA, FORMICIDAE)"**

MANUELA DE OLIVEIRA RAMALHO SANCHEZ

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

Maiο - 2017

MANUELA DE OLIVEIRA RAMALHO SANCHEZ

**MICROBIOMA DE FORMIGAS COM ÊNFASE EM CAMPONOTINI
(HYMENOPTERA, FORMICIDAE)**

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

Orientador: Prof. Dr. Odair Correa Bueno
Coorientador: Prof. Dr. Corrie Saux Moreau

**Rio Claro
2017**

595.796 Ramalho-Sanchez, Manuela de Oliveira
R165m Microbioma de formigas com ênfase em Camponotini
(Hymenoptera, Formicidae) / Manuela de Oliveira
Ramalho-Sanchez. - Rio Claro, 2017
167 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Odair Correa Bueno
Coorientador: Corrie Saux Moreau

1. Formiga. 2. Blochmannia. 3. Endossimbionte. 4.
Endobactéria. 5. Wolbachia. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: COMUNIDADES DE BACTÉRIAS DE DOIS GÊNEROS DE FORMIGAS
Polyrhachis (SPINY ANTS) E Camponotus (CARPENTER ANTS)

AUTORA: MANUELA DE OLIVEIRA RAMALHO SANCHEZ

ORIENTADOR: ODAIR CORREA BUENO

COORIENTADORA: CORRIE SAUX MOREAU

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

g
Prof. Dr. ODAIR CORREA BUENO
CEIS / IB Rio Claro

Prof. Dr. FEJ O A
CEIS / IB-Rio Claro

rf'lo)Í;.:M ··n
Profa. Ora. CINTIA MARTINS PERINOTTO
Campus Ministro Reis Velloso / Universidade Federal do Piauí

James Montoya Lerme
Prof. Dr. JAMES MONTOYA LERME
Departamento de Biologia / Universidade del Valle

Priscila Cintra Ocolowski
Profa. Ora. PRISCILA CINTRA OCOLOWSKI
Bolsista do Laboratório de Microscopia Eletrônica/ IB Rio Claro

Rio Claro, 31 de maio de 2017

Título alterado para: "Microbioma de formigas com ênfase em Camponotini (Hymenoptera,
Formicidae)"

**Dedico esta tese ao meu amado pai, José Manoel de Oliveira Ramalho.
Que em vida, além de ser uma pessoa bondosa e justa, sempre me ensinou na
prática a importância do estudo e da dedicação ao trabalho. Saudade eterna.**

Agradecimentos

Eu gostaria de agradecer a Deus por se fazer presente na minha vida diariamente, seja em um abraço de um amigo, ou numa manhã linda de sol.

Agradeço a bolsa de estudos concedida pela Capes, incluindo o tempo do doutorado sanduíche. Sem ela, nada disso seria possível.

Agradeço ao meu querido professor Dr Odair Correa Bueno por todo auxílio e dedicação desde a minha IC até ao final do doutorado. O Prof. Odair sempre acreditou que eu fosse capaz, mesmo quando eu duvidei. Suas sábias palavras, incluindo “calma”, foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. A sua paixão e dedicação pelas formigas sempre serão inspirações para minha vida!

À Dr Corrie S Moreau, que além de uma mulher extraordinária que luta pelas injustiças das mulheres na ciência, é fonte de inspiração para seguir a minha carreira. Também apaixonada por formigas, é uma profissional dedicada e como co-orientadora contribuiu muito com a realização deste trabalho. Poder conhecer como é a rotina desta pesquisadora fantástica, foi maravilhoso!

Agradeço a minha família de Campinas mãe Ana, pai José, irmã Marília, cunhado Edson “Sonic”, e Vó Nadir por acreditarem em mim, e por terem orgulho de ter uma pesquisadora “de formigas” na família! Tios Renato, Patricia, Ildete, Hamilton, Cuca e primos Guto, Gisele, Guga, Ana Beatriz, Felipe, Vivi e Pedro por todo companheirismo de sempre. Não poderia deixar de agradecer também a Luppy, Bibi, Miah e Cacau, que também fazem parte da família. O amor e alegria de vocês me deram forças em momentos difíceis.

À toda família de Guaraci, (Ahh...Guaraci!!) por todo amor recebido e tantos ensinamentos. Pessoas inteligentes não faltam nessa família: Tios Dim, Fia, Cidinha, Cida, Eduardo, Railda, Dete, Antonio Marcos, Amadeuzinho, Aidamar e primos Marcio, Elaine, João Pedro, Maria Clara, Viviane, Beto, Edu, Caio, Estela, Betinho, Nathalia, Rafael, Carlos Henrique, Paulinha, Henrique, Marina, Gledson, Sophia, Augusto, Nati (tem duas), Clarissa, Fer, Alexandre, Julia, Pedro e meu companheiro de ideal Carlos Eduardo. Tenho muito orgulho de fazer parte dessa família brilhante!

À família Simões Sanchez que é tão minha família como a que eu nasci, e em especial meus queridos sogros Roselei e Maurício. Nesse meio de amor, além dos primos maravilhosos como Angélica (amada e parceira de profissão também!), Arthur, Gi, Bruno, Fabi, Viny e Poly; ganhei também diversos tios como Odair, Angela,

Marivane e Valdi, e até a Vó Elza. Vocês sempre me acolheram de portas abertas, com carinho e muitos ensinamentos que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Gostaria de agradecer muito aos amigos Jholl, Joice, Maria Clara, Melissa, Horse, Pablo, Andressa, Martin, Laurence, Vitor Hugo, Carlitos, Gil, Sophia, Tata, Cebola, Karla, Olivia, Digo, Gi, Tito, Marina, Kats, Siri, Davi, Hugo, Mariana, Julia, Camila, Livia, Guilherme, Marcelo, Aninha, Mariana, Gabriela, Clarinha, Naiara, Ogro, Sherman, Jacque e Daniel por me esperarem olhar as formiguinhas que estavam forrageando! Foram muitas “palestras” e “curiosidades” sobre o assunto, e além de muita paciência para ouvir, vocês sempre me fizeram sentir bem por essa minha paixão.

À Debora – sempre ela! Amiga-irmã desde nossos três anos. Ela sempre me fez ser uma pessoa melhor (inclusive já se vestia sozinha aos três anos – e isso me irritava! Rs). Amo você, sister!!! Você sempre será um exemplo para mim!

Agradeço a universidade Unesp, Departamento de Bio, CEIS, funcionários, técnicos e professores que compartilharam ensinamentos e experiências em todos esses anos (2006-2017). Ao CBN 2006 – “os medíocres” que persistem - Monizze, Van, Pam, Bruna, Cazuza, Eli e Dom agradeço por todas alegrias e parcerias (TQAB forever!). Nesses anos de Pós graduação BCM também aprendi muito e fiz muitas amizades importantes, sobretudo nos eventos que realizamos juntos (vários BioCelMols, Primeiros Passos na Ciência e Junção Gap) – Matraca, Allison, Franco, Luis Adriano, Adna, Paty, Fran, Luiza, Jorge, Day, Caio, Mão, Leticia Rocha, Leticia Menezes, Murilo, João, e muitos outros que seria impossível citar!! Um agradecimento especial também aos alunos que pude orientar nesses anos: Marcella, Thais, Thays, Manu (sim, tem outra!) e Gabriel. À todos vocês “da unesp” muito obrigada por embarcar nessa vida acadêmica comigo!

No dia à dia, agradeço quem partilha das minhas angústias de experimento (quando a PCR não vai), dos meus momentos de inspiração (Blá Blá Blá) e da hora do café (Ah... café!). Neste grupo de amigos cito Pamela (minha comadre- companheira-amiga de todas as horas! Mesmo distante, quando a gente “inventa” de estudar fora, quase rola experimento pelo Whatsapp! Te amo muito, e tenho muito orgulho de você, Pam!!!), Cintia Martins (parceira - Skype ajuda também!), Alex Vieira (parceiro!), Larissa, Viviane, Amanda Oliveira, Amanda Carlos, Marcela, Mayara, Ita, Thais, Nathalia Almeida, Nathalia Lorenzon, Silvana, Aline Nondillo, Sandrinha, Bianca e Virginia. Sem vocês, eu não teria conseguido!

Eu não poderia deixar de agradecer também a todos amigos que fiz no meu doutorado sanduiche, onde tive oportunidade de conhecer e trabalhar com pessoas maravilhosas. Os 10 meses morando em Chicago e trabalhando no Field Museum, especialmente com a galera do Moreau Lab foram fantásticos: Corrie Moreau, Matt Boot, Kevin Feldheim, Felix, Grewe, Estefany Romero, Andrea Thompson, Max Winston, Brian Wray, Erica Zahnle, Sarah Owens, Benjamin Rubin, Jon Sanders, Benjamin Blanchard, Supriya Nair, Shauna Price: com vocês aprendi algo novo todos dias, inclusive nos happy hours de sexta feira! Nesse tempo fora do país, longe de casa e família, além de ser muito bem recebida no trabalho, também fui muito bem acolhida pela minha “Família de Chicago”: Marylin, Phill, Tameem, Olivia e Hannah – com vocês, vivi momentos especiais. Mesmo longe de TUDO, sempre me senti “em casa”. Muito obrigada!!

Já em alguns anos trabalhando com mirmecólogos, tive a oportunidade de conhecer profissionais maravilhosos: Dr Ana Eugenia, Dr Ricardo Harakava, Dr Maria Santana Morini, Dr Kleber Del-Claro, Dr Jacques Delabie, Dr Rodrigo Feitosa, Dr Roberto Brandão, Rodolfo Probst, Dr Fernanda Costa, Otavio Moraes, Tae Fernandes, Dr Debora Rodrigues, Corina Barrera, Sergio Miague, Dr Brian Fisher, Dr Phil Ward, Dr Longino, Dr Flavia Esteves, Dr James Trager, Dr Scott Powell, Dr James Montoya, Dr Roxana Jonsen e todos amigos e instrutores do Ant Course 2015. Em diferentes momentos da minha vida, contei com vocês e aprendi muito. Muito obrigada por tantos momentos bons compartilhados.

Agradeço a todas as “mulheres da ciência” que de maneiras diferentes sempre me incentivam e me inspiram!

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, fica aqui o meu: muito obrigada!

Finalmente, agradeço imensamente ao meu marido Marcelo, que além de ser uma pessoa maravilhosa contribuiu grandemente para este doutorado com encorajamentos e excelentes conselhos. Com ele, absolutamente tudo foi comemorado: resultados positivos e negativos. Marcelo mudou comigo para Rio Claro, depois para Chicago, depois Rio Claro sozinho... sempre me apoiando! Compartilho com você mais esta vitória em nossas vidas! Te amo!

*“...from so simple a beginning endless forms most beautiful and most wonderful have
been, and are being evolved.”*

Charles Darwin

*“Podemos agrupar as formas de vida em três, cinco ou um milhão de categorias, mas a
vida em si nos escapará.”*

Lynn Margulis, uma mulher da ciência

Sumário

	Página
Resumo	10
Abstract	11
Introdução Geral	12
Objetivos	18
Referências.....	19
Capítulo 1... ..	23
Introdução... ..	26
Materiais e Métodos.....	27
Resultados	29
Discussões	31
Referências.	38
Material Suplementar	41
Capítulo 2	55
Introdução	59
Materiais e Métodos.....	61
Resultados	67
Discussões	76
Referências	80
Lista de Tabelas e Figuras.....	88
Material Suplementar	92
Capítulo 3... ..	103
Introdução	107
Materiais e Métodos.....	108
Resultados	112
Discussões	115
Referências	119
Lista de Figuras	125
Material Suplementar	129
Capítulo 4... ..	141
Introdução	145
Materiais e Métodos	147
Resultados.	149

Discussões.	150
Referências	153
Lista de Figuras.	158
Material Suplementar	162
Considerações Finais... ..	163

Microbioma de formigas com ênfase em Camponotini (Hymenoptera, Formicidae)

Resumo

A interação simbiótica tem sido uma das responsáveis pela evolução e a biodiversidade de espécies existentes no planeta. Mais estudos abordando diferentes hospedeiros mostram-se necessários para aumentar o conhecimento do significado evolutivo desta associação na natureza. As formigas pertencentes aos gêneros *Polyrhachis* e *Camponotus* estão contidas na tribo Camponotini e são estreitamente relacionadas além de possuírem ampla distribuição, hábitos diversificados, e estão frequentemente associadas à endossimbiontes. Entretanto existem poucos estudos nesta área, permanecendo então muitas questões a respeito destas associações. Desta maneira, por meio da técnica de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) Illumina MiSeq2000, o presente estudo teve como objetivo: I. explorar a comunidade microbiana de diversas espécies de *Polyrhachis* distribuídas em toda sua extensão e verificar os fatores que a influenciam. II. caracterizar a comunidade bacteriana associada aos gêneros *Colobopsis* e *Camponotus*, e analisar se há diferenças na composição da comunidade bacteriana quando comparada entre os diferentes gêneros, colônias e em todos os estágios de desenvolvimento; III. averiguar como se dá a distribuição da comunidade bacteriana nas diferentes partes do corpo (cabeça, mesossoma e gáster) de *Camponotus*, e se esta diversidade está associada ao ambiente onde estas *Camponotus* foram coletadas; IV. caracterizar o ovário de *Camponotus textor*, utilizando técnicas de histologia (HE), documentar a localização de *Blochmannia* e *Wolbachia* na ovogênese por hibridação “in situ” de fluorescência (FISH), e sugerir o mecanismo de desenvolvimento que estas bactérias utilizam para atingir o ovo. Estes estudos demonstraram que existem diversos fatores que podem influenciar a comunidade bacteriana associada a formiga, como a filogenia do hospedeiro, o gênero, a colônia, a ontogenia, diferentes partes do corpo e o ambiente que a formiga foi coletada. Adicionalmente, foi possível sugerir mecanismos adaptativos que garantem que as principais bactérias cheguem ao ovo.

Palavras Chaves: *Blochmannia*, endossimbionte, endobactéria, *Wolbachia*.

Microbiome of ants with emphasis on Camponotini (Hymenoptera, Formicidae)

Abstract

Symbiotic interaction has been one of the factors responsible for the evolution and biodiversity of species on the planet. More studies addressing different hosts are necessary to increase the knowledge of the evolutionary meaning of this association in nature. The ants belonging to the genera *Polyrhachis* and *Camponotus* are contained in the Camponotini tribe and they are closely related in addition to having wide distribution, diversified habits, and are often associated with endosymbionts. However, there are few studies in this area, and many questions remain about these associations. In this way, through the New Generation Sequencing technique (NGS) Illumina MiSeq2000, the present study aimed: I. To explore the microbial community of several species of *Polyrhachis* distributed throughout its range and to verify the factors that influence it. II. Characterize the bacterial community associated with the genus *Colobopsis* and *Camponotus*, and analyze if there are differences in the composition of the bacterial community when compared between different genera, colonies and at all stages of development; III. To determine how the distribution of the bacterial community occurs in the different parts of the body (head, mesosome and gaster) of *Camponotus*, and if this diversity is associated with the environment where these *Camponotus* were collected; IV. To characterize the ovary of *Camponotus textor* using histology techniques (HE), to document the location of *Blochmannia* and *Wolbachia* in oogenesis by fluorescence in situ hybridization (FISH), and to suggest the mechanism of development that these bacteria use to reach the egg. These studies have demonstrated that there are several factors that can influence the ant-associated bacterial community, such as host phylogeny, genera, colony, ontogeny, different body parts, and the environment the ant was collected. In addition, it was possible to suggest adaptive mechanisms that guarantee that the main bacteria reach the egg.

Key words: *Blochmannia*, Camponotini, endosymbionte, endobacteria, *Wolbachia*, NGS.

Introdução Geral

Existem cerca de 20.000 espécies de formigas pertencentes à família Formicidae - Ordem Hymenoptera, as quais são amplamente distribuídas pelo globo terrestre, não havendo representantes apenas no Pólo Norte e Antártida. A grande diversidade do grupo se dá devido ao grande sucesso ecológico, implicando nas várias formas de nidificação, preferências alimentares e comportamento social com divisão de trabalho entre as castas (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; WILSON, 1987).

As formigas da tribo Camponotini Forel 1878, pertencentes à subfamília Formicinae, compreendem oito gêneros existentes, como *Calomyrmex*, *Camponotus*, *Colobopsis*, *Dinomyrmex*, *Echinopla*, *Opisthopsis*, *Overbeckia* and *Polyrhachis* e mais dois gêneros extintos: *Chimaeromyrma* e *PseudoCamponotus* (BOLTON, 2016). Dentre eles, os gêneros *Polyrhachis* e *Camponotus* tem se mostrado estreitamente relacionados (SAMESHIMA et al., 1999). Ambos possuem ampla distribuição e são extremamente diversos, podendo apresentar diferentes formas de nidificação, desde ninhos terrestres a arbóreos, sendo que esta última pode resultar em uma dieta com deficiência nutricional, já que a obtenção do nitrogênio se dá pelo exsudato de plantas e predação de insetos fitófagos (COOK; DAVIDSON, 2006; DAVIDSON et al., 2003). Ambos os gêneros também possuem representantes tecelãs e constroem seus ninhos a partir da seda produzida pelas suas próprias larvas para entrelaçar folhas e galhos (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

Outra característica comum entre os dois gêneros é a ausência da glândula metaplaural em *Polyrhachis* e também na maioria das espécies de *Camponotus*. Esta glândula seria responsável pela produção de secreções com funções antisépticas, defesa química e marcação de território (YEK; MUELLER, 2011). Johnson, Agapow e Crozier (2003) sugerem que a perda desta glândula possa ter facilitado a nidificação arbórea, uma vez que espécies com hábitos epigeicos e hipogeicos, as quais coletam na superfície do solo e nas suas camadas superficiais, respectivamente, estariam mais sujeitas a infecções, necessitando assim de outras estratégias de defesa. Baseado nesta informação, outro trabalho concluiu que o comportamento de autolimpeza, assim como o veneno com propriedades antimicrobianas são fundamentais para a resistência a doenças dentro da colônia de uma espécie tecelã de *Polyrhachis* (GRAYSTOCK; HUGHES, 2011). Ainda, Vieira, Bueno e Camargo-Mathias (2012) abordaram estudo através de evidências comparativas da morfologia desta glândula em formigas cultivadoras e não cultivadoras de fungos, incluindo representantes attines basais e

derivadas (formigas cortadeiras). Tais resultados revelaram que a morfologia da glândula metapleurar mostrou-se mais desenvolvida nas formigas cortadeiras evidenciando maior proteção contra a proliferação de fungos e bactérias indesejadas no jardim de fungo. Estes estudos comparativos são escassos, porém tendem a revelar aspectos importantes sobre a biologia do inseto. Portanto, os dois gêneros (*Polyrhachis* e *Camponotus*) foram considerados no presente estudo.

O gênero *Polyrhachis* Smith, 1857 é caracterizado pela sua diversidade taxonômica, ecológica e social (VAN ZWEDEN et al., 2007). Este gênero compreende cerca de 700 espécies e possui ampla distribuição pelo Velho Mundo. Muitos autores sugeriram diversas divisões em subgêneros, porém Bolton (2016) separa da seguinte maneira: *Polyrhachis (Myrma)*, *Polyrhachis (Hemioptica)*, *Polyrhachis (Hagiomyrma)*, *Polyrhachis (Hirtomyrma)*, *Polyrhachis (Campomyrma)*, *Polyrhachis (Myrmotherinx)*, *Polyrhachis (Cyrtomyrma)*, *Polyrhachis (Myrmhopta)*, *Polyrhachis (Chariomyrma)*, *Polyrhachis (Hedomyrma)*, *Polyrhachis (Myrmatopa)* e *Polyrhachis (Aulacomyrma)*.

Os ninhos de *Polyrhachis* podem variar drasticamente desde terrestres (presentes na lama) até arbóreos (no dossel das árvores), em zonas áridas ou em florestas tropicais. Os ninhos podem ser monodômicos ou polidômicos, as colônias podem ser monogínicas ou poligínica e com muitos ou poucos indivíduos (DOROW, 1995; DOROW; KOHOUT, 1995; NIELSEN, 1997; ROBSON; KOHOUT, 2005). Adicionalmente, *Polyrhachis* é o único exemplo de Formicinae que possui fundação semiclaustral (LENOIR; DEJEAN, 1994), ou seja, a rainha sai do ninho em construção para forragear, na tentativa de garantir recurso alimentar, apesar do perigo de predação, ao contrário da fundação do ninho claustral (NICKELE et al., 2013).

O gênero *Camponotus* Mayr, 1861, está subdividido em 43 subgêneros, abrangendo mais de 1000 espécies válidas, 465 subespécies e 31 fósseis (BOLTON, 2016), apresentando ampla distribuição geográfica: Américas, África, Ásia, Europa e Oceania (ANTWEB, 2017). De acordo com Robinson (1996), é o gênero mais representativo e heterogêneo das regiões neotropicais e tropicais, possuindo, inclusive, distribuição nas zonas temperadas.

Conhecidas popularmente como formigas-carpinteiras são comuns nos cerrados brasileiros e podem beneficiar as plantas pela predação dos herbívoros (DEL-CLARO; BARTO; RÉU, 1996). Possuem hábitos noturnos e dieta generalista, podendo nidificar em cavidades no solo, árvores vivas ou mortas e até no interior de construções. As principais espécies encontradas no Brasil (incluindo as espécies encontradas em áreas

urbanas) são *Camponotus atriceps* (Smith, 1858) (= *C. abdominalis*), *Camponotus crassus* Mayr, 1862, *Camponotus rufipes* (Fabricius, 1775), *Camponotus renggeri* Emery, 1894, *Camponotus arboreus* (Smith, 1858), *Camponotus fuscocinctus* Emery, 1888 e *Camponotus sericeiventris* (Guérin-Méneville, 1838) (ZORZENON et al., 2011).

A ocorrência de endossimbiontes é comum nos artrópodes. , Análises em 63 espécies revelaram que 76% estavam infectados (JEYAPRAKASH; HOY, 2000). Buchner (1965) foi um dos pioneiros no estudo de insetos como hospedeiro e os consideravam organismos modelos para o estudo dos endossimbiontes, por serem tolerantes à convivência de micro-organismos internamente e externamente ao corpo. Dentre os Hymenoptera, Formicidae é frequentemente relacionada à presença de endossimbiontes (ZIENTZ et al., 2005). A flexibilidade alimentar obtida por seus membros resulta no sucesso evolutivo do grupo, em parte alcançada pela presença dos endossimbiontes que auxiliam os hospedeiros nutricionalmente (ISHIKAWA, 1989).

Existem dois tipos de interação molecular entre as bactérias simbióticas e seus hospedeiros: a primária e a secundária, e ambos já foram relatados em formigas. A interação primária caracteriza-se por associações especializadas, descendentes de um ancestral, cujas árvores filogenéticas dos simbiotes são congruentes com a dos seus hospedeiros em períodos longos na escala evolutiva, indicando coevolução de ambos (BAUMANN, 2005; MUNSON et al., 1991). Também ocorrem alterações no tamanho do genoma do simbiote primário e este geralmente localiza-se em algum órgão especializado no interior do hospedeiro. Um bom exemplo disso em formigas é a *Blochmannia* (DEGNAN; LAZARUS; WERNEGREN, 2005; GIL et al., 2004). Esta bactéria foi identificada pela primeira vez em *Camponotus ligniperda* (Latreille, 1802) (BLOCHMAN, 1882), ocorrendo no interior de uma célula especializada denominada de bacteriócito (SAMESHIMA et al., 1999).

A presença de um endossimbionte primário contido em um bacteriócito em Camponotini já foi descrita por Sameshima et al., (1999), Degnan et al., (2004), Feldhaar et al., (2007), e Wernegreen et al., (2009). Em análises filogenéticas, o endossimbionte permaneceu num clado monofilético de Camponotini, revelando que houve coevolução entre hospedeiro e endossimbionte, assim como a aquisição do micro-organismo deve ter ocorrido no ancestral comum da tribo (SAMESHIMA et al., 1999; WERNEGREN et al., 2009).

Acredita-se que o endossimbionte *Blochmannia* desempenhe papel nutricional

para o hospedeiro, fornecendo alguns aminoácidos essenciais (FELDHAAR et al., 2007), principalmente no início da vida (DEGNAN; LAZARUS; WERNEGREN, 2005; GIL et al., 2003; WOLSCHIN et al., 2004). A *Blochmannia*, apesar de ter o seu genoma reduzido, mantém os genes para determinadas funções celulares básicas, como por exemplo, a biossíntese de nove aminoácidos essenciais (exceto Arginina), além de cofatores e enzimas de urease, as quais permitem que o simbiote recicle o nitrogênio da ureia (DE SOUZA et al., 2009; FAN et al., 2013; FELDHAAR et al., 2007). Portanto, a detecção desse endossimbionte em *Camponotus* e *Polyrhachis* torna-se importante, uma vez que estes dependem da *Blochmannia* para auxiliar no fornecimento de aminoácidos essenciais, já que ambos possuem uma dieta com deficiência de nutrientes em consequência de apresentarem hábitos arborícolas (SAMESHIMA et al., 1999; WERNEGREN et al., 2009). Complementarmente, o papel nutricional da *Blochmannia* não é o único aspecto a se destacar da interação com o seu hospedeiro, pois esta endobactéria contribui para o metabolismo de nitrogênio, enxofre e de lipídeos (DEGNAN; LAZARUS; WERNEGREN, 2005; GIL et al., 2003; WILLIAMS; WERNEGREN, 2010).

A interação secundária normalmente é facultativa, podendo ser benéfica ou não, como a *Wolbachia*, uma vez que estimativas sugerem que milhões de espécies podem estar infectadas (SHOEMAKER; KELLER; ROSS, 2003). Há relatos deste endossimbionte associado a diversas espécies de Formicidae, como por exemplo, em *Solenopsis* spp. Westwood, 1840 (MARTINS; SOUZA; BUENO, 2012; SHOEMAKER; KELLER; ROSS, 2003), *Atta* spp. Fabricius, 1804 *Acromyrmex* spp. Mayr, 1865 (FROST et al., 2010), *Wasmannia auropunctata* (Roger, 1863) (REY et al., 2013) e inclusive em *Camponotus textor* Forel 1899, em que todas as colônias analisadas apresentaram uma ou mais cepas do endossimbionte (RAMALHO et al., 2017).

Além dos endossimbiontes *Wolbachia* e *Blochmannia*, este último estreitamente relacionado à tribo Camponotini, inclusive nos gêneros *Polyrhachis* e *Camponotus*, existem diversos trabalhos relatando a presença de outras espécies de hospedeiros e de endossimbiontes, como é o caso de *Arsenophonus* spp., *Cardinium hertigii*, *Hamiltonella defensa*, *Spiroplasma* spp., e *Wolbachia* spp. descritos por Russell et al. (2012) encontrados em algumas espécies hospedeiras de formigas e borboletas. No entanto, existem poucos estudos sobre identificação, função e interação de coevolução e codivergência de bactérias associadas aos gêneros *Polyrhachis* e *Camponotus*.

Perguntas sobre a interação da *Blochmannia* e ainda outros endossimbiontes com Camponotini, principalmente em *Camponotus* e *Polyrhachis*, permanecem em aberto: o que Camponotini possui de diferente dos outros grupos que fez com que esta simbiose ficasse tão estabelecida na tribo? Será que existe algum endossimbionte relacionado à defesa contra patógenos dentro destes gêneros, já que a ausência da glândula metapleural é frequente? Mesmo em gêneros relacionados e que abrigam a *Blochmannia*, como é o caso de *Polyrhachis* e *Camponotus*, como se dá à distribuição e comparação deste e outros endossimbiontes com hospedeiros coletados em diferentes continentes?

Noggi (1981), Cochran (1985) e Lai, Baumann e Baumann (1994) enfatizaram que apesar de já ser bem difundida a ideia de simbiontes micetócitos (nome também dado ao bacteriócito por alguns autores) estarem frequentemente associados à interação nutricional com seus hospedeiros, pouco se conhece sobre a biologia desta relação. E quanto aos outros endossimbiontes associados? Questões feitas há décadas ainda permanecem muito recorrentes e sem resposta.

O estudo de endossimbiontes não cultiváveis tornou-se viável a partir da década de 70 com a técnica da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e o *16S rRNA* mostrou-se uma ferramenta útil para reconstrução filogenética e caracterização sistemática (PALUMBI, 1996). Apesar destes resultados, todos os trabalhos acima citados foram realizados pela amplificação do *16S* e sequenciamento pelo método de Sanger, os quais se baseiam em um número relativamente pequeno de micro-organismos. Existem diversas técnicas de Sequenciamento de Nova Geração (sigla *NGS*, proveniente do inglês *Next-Generation Sequencing*) que podem ser ferramentas úteis a se agregar ao estudo dos endossimbiontes e hospedeiros. Kautz e colaboradores (2013) compararam a técnica de pirosequenciamento (*NGS*) com métodos tradicionais para descobrir a diversidade bacteriana em *Cephalotes varians* (Smith, 1876). Com a técnica de *NGS* foi possível a recuperação de 445 OTUs (Unidade Taxonômica Operacional) raras que não foram detectados com as técnicas tradicionais, confirmando que este método irá proporcionar a descoberta da microbiota associada ao hospedeiro, e que é uma excelente ferramenta para a caracterização de comunidades anteriormente pouco estudadas, como a diversidade microbiana associada aos insetos.

Análise da microbiota de *Formica exsecta* Nylander, 1846 através do Illumina HiSeq 2000 (*NGS*) resultou em sequências que mostraram homologias com *Wolbachia*, *Arsenophonus*, *Entomoplasmatales* e *Microsporidia*, ainda, foram encontradas

sequências com identidade de outros micro-organismos, como fungos e bactérias comuns do solo (JOHANSSON et al., 2013). Na mosca tsétsé, o Sequenciamento de Nova Geração Illumina com plataforma MiSeq2000, revelou que o endossimbionte primário *Wigglesworthia* foi predominante, porém também foi confirmada a presença inesperada do *Sodalis*, uma vez que apenas com a técnica de PCR tradicional a baixa infecção por este endossimbionte não havia sido detectada (AKSOY et al., 2014). Esses trabalhos reiteram a importância da técnica de Sequenciamento de Nova Geração para estudos com endossimbionte e hospedeiro, uma vez que podem revelar uma vasta quantidade de dados, incluindo os que são omitidos pelas técnicas tradicionais, assim como fornecer informações que auxiliarão a compreensão das interações biológicas das simbioses.

De uma maneira geral, os resultados apresentados por Ramalho (2017) com a técnica de Sanger, corroboram citações da literatura e adicionam novas informações sobre a espécie pertencente ao gênero *Camponotus*, assim como da presença e distribuição do endossimbionte *Wolbachia e Blochmannia* nas colônias analisadas e sua história evolutiva. Entretanto, seria importante a utilização de novas técnicas para avaliar a variação e a interação das múltiplas cepas nos diferentes estágios de vida das operárias das espécies de *Camponotus*, bem como a sua localização nos diferentes órgãos dos hospedeiros, além sua densidade relativa. A utilização da PCR quantitativa, hibridização fluorescente “in situ” (FISH) e o microscópio confocal de varredura a laser seriam necessários para medir a densidade da *Wolbachia e Blochmannia*, além de verificar a distribuição das bactérias entre os tecidos do hospedeiro.

Desta maneira, por meio da técnica do sequenciamento de nova geração, qPCR e hibridização fluorescente “in situ” (FISH) com análise em microscopia confocal de varredura a laser, o presente estudo poderá revelar aspectos importantes sobre a biologia dos gêneros *Polyrhachis e Camponotus*, a influência dos endossimbiontes nesse grupo tão diverso, além dos tipos de interações simbióticas envolvidas.

Objetivos

Neste estudo, os principais objetivos são:

- 1- Verificar, identificar e caracterizar a comunidade microbiana associada aos diferentes subgêneros de *Polyrhachis* em sua distribuição total, e verificar os fatores que o influenciam.
- 2- Caracterizar a comunidade bacteriana associada a uma colônia do recém-reconhecido gênero *Colobopsis* e três colônias de *Camponotus* (duas espécies distintas) e mostrar quão diferente é a composição da comunidade bacteriana quando comparada entre os diferentes gêneros, colônias e em todos os estágios de desenvolvimento.
- 3- Verificar como se dá a distribuição da comunidade bacteriana nas diferentes partes do corpo (cabeça, mesossoma e gáster) de *Camponotus*, e se esta diversidade está associada ao ambiente onde estas *Camponotus* foram coletadas.
- 4- Caracterizar o ovário de *Camponotus textor*, utilizando técnicas de histologia (HE), documentar a localização de *Blochmannia* e *Wolbachia* na ovogênese por hibridação “in situ” de fluorescência (FISH), e sugerir o mecanismo de desenvolvimento que estas bactérias utilizam para atingir os ovos.

Referência

- AKSOY, E. et al. Analysis of multiple tsetse fly populations in Uganda reveals limited diversity and species-specific gut microbiota. **Applied and environmental microbiology**, v. 80, n. 14, p. 4301–12, 2014.
- ANTWEB. **AntWeb**. Disponível em: <<https://www.antweb.org>>. Acesso em: 24 feb. 2017.
- BAUMANN, P. Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. **Annu. Rev. Microbiol.**, 2005.
- BLOCHMAN, F. Über das vorkommen von bakterienähnlichegebilden in den gewebe und eiernverschiedenerinsekten. **ZentblBakteriol**, v. 11, p. 234–240, 1882.
- BOLTON, B. **An online catalog of the ants of the world.**: <<http://www.antcat.org/>>. Acesso em: 20 oct. 2016.
- BUCHNER, P. **Endosymbiosis of animals with plant microorganisms.1965.** - **Google Acadêmico**. New York: Interscience Publishers, 1965.
- COCHRAN, R. A. Nitrogen excretion in cockroaches. **Ann Rev Entomol**, v. 30, p. 29–49, 1985.
- COOK, S. C.; DAVIDSON, D. W. Nutritional and functional biology of exudate-feeding ants. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 118, n. 1, p. 1–10, 2006.
- DAVIDSON, D. W. et al. Explaining the Abundance of Ants in Lowland Tropical Rainforest Canopies. **Science**, v. 300, n. 5621, 2003.
- DE SOUZA, D. J. et al. *Blochmannia* endosymbionts improve colony growth and immune defence in the ant *Camponotus fellah*. **BMC microbiology**, v. 9, n. 1, p. 29, 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, Candidatus *Blochmannia*. **Systematic biology**, v. 53, n. 1, p. 95–110, 2004.
- DEGNAN, P. H.; LAZARUS, A. B.; WERNEGREN, J. J. Genome sequence of *Blochmannia pennsylvanicus* indicates parallel evolutionary trends among bacterial mutualists of insects. **Genome research**, v. 15, n. 8, p. 1023–33, 2005.
- DEL-CLARO, K.; BARTO, V.; RÉU, W. Effect of herbivore deterrence by ants on the fruit set of an extrafloral nectary plant, *Qualea multiflora* (Vochysiaceae). **Journal of Tropical Ecology**, v. 12, n. 6, p. 887–892, 1996.
- DOROW, W. H. **Revision of the ant genus Polyrhachis Smith, 1857 (Hymenoptera: Formicidae: Formicinae) on subgenus level with keys, checklist of species and bibliography**. Senckenbergische Naturforschende Gesellschaft: Schweizerbart science,

1995.

DOROW, W. H. O.; KOHOUT, R. J. A review of the subgenus *Hemioptica* Roger of the genus *Polyrhachis* Fr. Smith with description of a new species (Hymenoptera: Formicidae: Formicinae. **Zool. Med. Leiden**, v. 69, p. 93–104, 1995.

FAN, Y. et al. Proteomic Analysis of an Unculturable Bacterial Endosymbiont (*Blochmannia*) Reveals High Abundance of Chaperonins and Biosynthetic Enzymes. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 2, p. 704–718, 2013.

FELDHAAAR, H. et al. Nutritional upgrading for omnivorous carpenter ants by the endosymbiont *Blochmannia*. **BMC Biology**, v. 5, n. 1, p. 48, 2007.

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.

GIL, R. et al. The genome sequence of *Blochmannia floridanus*: comparative analysis of reduced genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 16, p. 9388–93, 2003.

GIL, R. et al. Determination of the core of a minimal bacterial gene set. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 68, n. 3, p. 518–37, table of contents, 2004.

GRAYSTOCK, P.; HUGHES, W. O. H. Disease resistance in a weaver ant, *Polyrhachis dives*, and the role of antibiotic-producing glands. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 65, n. 12, p. 2319–2327, 2011.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. **The ants**. Berlin: Springer - Verlag, 1990.

ISHIKAWA, H. Biochemical and Molecular Aspects of Endosymbiosis in Insects. **International Review of Cytology**, v. 116, p. 1–45, 1989.

JEYAPRAKASH, A.; HOY, M. A. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: wsp sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. **Insect Molecular Biology**, v. 9, n. 4, p. 393–405, 2000.

JOHANSSON, H. et al. A Metatranscriptomic Approach to the Identification of Microbiota Associated with the Ant *Formica exsecta*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. e79777, 2013.

JOHNSON, R. N.; AGAPOW, P.-M. M.; CROZIER, R. H. A tree island approach to inferring phylogeny in the ant subfamily Formicinae, with especial reference to the evolution of weaving. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 29, n. 2, p. 317–330, 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. 525–34, 2013.

LAI, C.-Y.; BAUMANN, L.; BAUMANN, P. Amplification of *trpEG*: Adaptation of *Buchnera aphidicola* to an endosymbiotic association with aphids. **Microbiology**, v. 91, p. 3819–3823, 1994.

LENOIR, A.; DEJEAN, A. Semi-claustral colony foundation in the formicine ants of the genus *Polyrhachis* (Hymenoptera: Formicidae). **Insectes Sociaux**, v. 41, n. 3, p. 225–234, 1994.

MARTINS, C.; SOUZA, R. F.; BUENO, O. C. Presence and distribution of the endosymbiont *Wolbachia* among *Solenopsis* spp. (Hymenoptera: Formicidae) from Brazil and its evolutionary history. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 109, n. 3, p. 287–296, 2012.

MUNSON, M. A. et al. Evidence for the establishment of aphid-eubacterium endosymbiosis in an ancestor of four aphid families. **Journal of bacteriology**, v. 173, n. 20, p. 6321–4, 1991.

NICKELE, M. A. et al. Formigas cultivadoras de fungos: estado da arte e direcionamento para pesquisas futuras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33, n. 73, p. 53–72, 2013.

NIELSEN, M. G. Nesting biology of the mangrove mud-nesting ant *Polyrhachis sokolova* Forel (Hymenoptera, Formicidae) in northern Australia. **Insectes Sociaux**, v. 44, n. 1, p. 15–21, 1997.

NOGGI, G. Significance of symbionts for the maintenance of an optimal nutritional state of successful reproduction in hematophagous arthropods. **Parasitology**, v. 82, p. 299–304, 1981.

PALUMBI, S. R. Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. In: HILLIS, D.; MORITZ, C.; MABLE, B. (Eds.). **Molecular Systematics**. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 1996. p. 205–247.

RAMALHO, M. O. et al. Intracellular symbiotic bacteria of *Camponotus textor*, Forel (Hymenoptera, Formicidae). **Current Microbiology**, 2017.

REY, O. et al. Distribution of Endosymbiotic Reproductive Manipulators Reflects Invasion Process and Not Reproductive System Polymorphism in the Little Fire Ant *Wasmannia auropunctata*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e58467, 2013.

ROBINSON, W. Urban entomology: insect and mite pests in the human environment. In: CHAPMAN AND HALL (Ed.). **Fly pests in indoor and household environments**. London: [s.n.]. p. 293–295.

ROBSON, S. K. A.; KOHOUT, R. J. Evolution of nest-weaving behaviour in arboreal nesting ants of the genus *Polyrhachis* Fr. Smith (Hymenoptera: Formicidae). **Australian Journal of Entomology**, v. 44, n. 2, p. 164–169, 2005.

RUSSELL, J. A. et al. A Veritable Menagerie of Heritable Bacteria from Ants, Butterflies, and Beyond: Broad Molecular Surveys and a Systematic Review. **PLoS**

ONE, v. 7, n. 12, p. e51027, 2012.

SAMESHIMA, S. et al. Phylogenetic comparison of endosymbionts with their host ants based on molecular evidence. **Zoological Science**, v. 16, n. 6, p. 993–1000, 1999.

SHOEMAKER, D.; KELLER, G.; ROSS, K. G. Effects of *Wolbachia* on mtDNA variation in two fire ant species. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 7, p. 1757–1771, 2003.

VAN ZWEDEN, J. S. et al. Social and genetic structure of a supercolonial weaver ant, *Polyrhachis robsoni*, with dimorphic queens. **Insectes Sociaux**, v. 54, n. 1, p. 34–41, 2007.

VIEIRA, A. S.; BUENO, O. C.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morphophysiological Differences between the Metapleural Glands of Fungus-Growing and Non-Fungus-Growing Ants (Hymenoptera, Formicidae). **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. e43570, 2012.

WERNEGREEN, J. J. et al. One nutritional symbiosis begat another: Phylogenetic evidence that the ant tribe Camponotini acquired *Blochmannia* by tending sap-feeding insects. **BMC Evolutionary Biology**, v. 9, n. 1, p. 292, 2009.

WILLIAMS, L. E.; WERNEGREEN, J. J. Unprecedented loss of ammonia assimilation capability in a urease-encoding bacterial mutualist. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, p. 687, 2010.

WILSON, E. O. Causes of Ecological Success: The Case of the Ants. **The Journal of Animal Ecology**, v. 56, n. 1, p. 1, 1987.

WOLSCHIN, F. et al. Replication of the endosymbiotic bacterium *Blochmannia floridanus* is correlated with the developmental and reproductive stages of its ant host. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 7, p. 4096–102, 2004.

YEK, S. H.; MUELLER, U. G. The metapleural gland of ants. **Biological Reviews**, 2011.

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

ZORZENON, F. J. et al. Survey and management of carpenter ants on urban trees in the city of São Paulo, Brazil. **Proceedings of the Seventh International Conference on Urban Pests**, , p. 73–76, 2011.

Considerações Finais

Os resultados presentes nesse estudo permitiram avançar no conhecimento a respeito da variação natural da microbiota dos insetos, o que permite entender importantes aspectos da biologia do hospedeiro. Estes estudos demonstraram que existem diversos fatores que podem influenciar a comunidade bacteriana associada a formiga, como a filogenia do hospedeiro, o gênero, a colônia, a ontogenia, diferentes partes do corpo e o ambiente em que a formiga foi coletada. Adicionalmente, na análise da ovogênese de *C. textor* é possível sugerir mecanismos adaptativos que garantem que as principais bactérias cheguem ao ovo. Da mesma forma, verificou-se que as técnicas de sequenciamento de nova geração, hibridização “in situ” fluorescente (FISH) e microscopia confocal podem ser utilizadas como excelentes ferramentas para estudos de relações simbióticas.

Para *Polyrhachis*, o estudo revelou as principais bactérias associadas aos subgêneros e mostrou a presença de diversas bactérias nunca antes associadas a formigas. Também mostrou que existem algumas bactérias específicas para um determinado subgênero, o que corrobora os resultados obtidos em que a filogenia do hospedeiro é um dos fatores relevantes que interferem na comunidade microbiana deste grupo.

O presente estudo também mostrou que *Colobopsis* possui uma microbiota distinta de *Camponotus*, apesar de serem gêneros relacionados filogeneticamente. Nas análises da microbiota das colônias, verificou-se a presença de um padrão específico da espécie, que exerce uma forte influência na composição da comunidade bacteriana. Ao analisar os diferentes estágios de desenvolvimento dentro de uma colônia, percebeu-se como a comunidade bacteriana é conservada, reforçando que a trofalaxia e o intenso contato dentro de uma colônia podem atenuar as diferenças nas microbiotas.

Ao analisar separadamente as três partes do corpo de *Camponotus*, verificou-se que o gáster possui comunidades bacterianas mais abundantes, porém principalmente composta por *Blochmannia* e *Wolbachia*. O presente estudo também revelou uma diversidade bacteriana maior na cabeça e mesossoma, mas em menor abundância. Ao relacionar a similaridade de comunidades com base no local de coleta do hospedeiro, observou-se que a localidade é um fator determinante na similaridade de amostras, sugerindo que muitas das bactérias, especialmente aquelas da cabeça e o tórax, são provavelmente adquiridas no ambiente ou pelos alimentos que ingerem.

Após a confirmação de que as duas principais bactérias de *Camponotus* – *Blochmannia* e *Wolbachia* já estavam presentes no ovo, a marcação dessas bactérias

pela técnica de FISH nos ovários de *C. textor* permitiu ampliar os conhecimentos dos mecanismos de transmissão ovariana desses endossimbiontes e sobre suas adaptações. Pela primeira vez foi possível marcar concomitantemente as duas principais bactérias de *Camponotus* durante a ovogênese no ovário meroístico politrófico. Assim, foi observado que *Blochmannia* aparece primeiro no ovócito e *Wolbachia* só deve ser transferido nos estádios finais, antes do ovócito completar o desenvolvimento. Esses resultados corroboram a ideia de que *Blochmannia* é transferida para o ovócito via células foliculares e *Wolbachia* passa lateralmente direto das células nutridoras para o ovócito através das conexões citoplasmáticas entre a câmara de nutridora e câmara de ovo.

As principais bactérias associadas a essas formigas pertencentes a tribo Camponotini devem ter um papel importante na sobrevivência, apesar de ainda serem desconhecidas. Podem também influenciar a ecologia e a evolução do hospedeiro. Nos últimos anos, abordagens genômicas tem se tornado cada vez mais acessíveis, podendo ser utilizadas como excelentes ferramentas para explicar diversos fenômenos biológicos, como as relações intra e interespecíficas, a ecologia de espécies, além dos mecanismos moleculares, fisiológicos, comportamentais e evolutivos do hospedeiro. Essas abordagens têm o potencial de gerar metadados que podem contribuir para o entendimento das interações simbióticas que envolvem o campo da mirmecologia. Portanto, unir informações do hospedeiro com o microbioma permitirá entender a complexidade evolutiva dessas associações na natureza.