UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - RIO CLARO

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LUCAS ANDRADE MEIRELLES

ANTAGONISMO DE ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DE *TRACHYMYRMEX* FRENTE AO FUNGO PARASITA *ESCOVOPSIS*

Rio Claro
2012

LUCAS ANDRADE MEIRELLES

ANTAGONISMO DE ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DE *TRACHYMYRMEX* FRENTE AO FUNGO PARASITA *ESCOVOPSIS*

Orientador: André Rodrigues

Co-orientador: Fernando Carlos Pagnocca

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Campus de Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas

Rio Claro
2012

595.796 Meirelles, Lucas A.
M514a Antagonismo de actinobactérias isoladas de Trachymyrmex frente ao fungo parasita Escovopsis / Lucas A. Meirelles. - Rio Claro : [s.n.], 2012
35 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: André Rodrigues
Co-Orientador: Fernando Carlos Pagnocca

1. Formiga. 2. Interações microbianas. 3. Attini. 4. Defesa. 5. Pseudonocardia. 6. Simbiose. 7. Recrutamento. I. Título.

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

Dedico esse trabalho aos meus pais e familiares, grandes responsáveis pela minha entrada na universidade; sem eles jamais poderia viver este sonho.

AGRADECIMENTOS

A entrada na universidade foi, no início, um grande choque; acostumado à pequena Conceição do Rio Verde, nunca imaginei que aprenderia e viveria coisas que aprendi e vivi aqui. A universidade nos abre a cabeça para um novo mundo, um mundo que, infelizmente, muitos não têm chances de conhecer. Ficam aqui meus agradecimentos a todos os que participaram dessa maravilhosa experiência, pessoas com as quais serei eternamente grato:

Agradeço a minha família, especialmente minha mãe Adriana e meu pai José Roberto, sem os quais tenho certeza que não conseguiria chegar até aqui. Minha mãe, pessoa sempre atenciosa com a qual tenho orgulho de conviver, sempre disposta a me ajudar e fazer de tudo para me ver feliz. Meu pai, grande conselheiro, ainda me lembro dele falando quando eu era criança que não podemos nos limitar a viver dentro das pequenas "fronteiras" que nos rodeiam e que devemos buscar crescer cada vez mais, aumentando a cada dia o pequeno mundo que conhecemos. Terei isso sempre guardado comigo sr. JR.

Aos meus irmãos, Esther e João Marcos, pelos momentos de alegria e pelas "brigas" engraçadas que sempre causavam quando voltava para Minas para visitá-los.

Agradeço especialmente ao meu irmão Matheus, sem dúvidas, o meu melhor amigo. Obrigado por me ouvir, por estar sempre junto e por me proporcionar as conversas mais engraçadas.

Aos meus avós de Minas, Orney e Vera, e ao meu padrinho, Ângelo, pelo carinho e atenção que sempre tiveram quando volto pra casa.

Aos meus avós de Rio Claro, Elza e Paulo. Vovó Elza por me fazer entender, mesmo que sem querer, o quanto a vida é bela e o quanto o amor familiar é importante quando ela se torna frágil. Vovô Paulo por me mostrar um exemplo de pessoa prestativa, e que a idade não precisa limitar nossas ações. Gostaria muito que estivesse lendo este agradecimento, mas suas lembranças estarão sempre guardadas em minha memória.

A todas as minhas tias (Regina, Maria Paula, Maria Inês e especialmente a minha tia Teresa), pelo total apoio, convivência e bons momentos proporcionados em casa.

Ao meu tio Pedro, pela ajuda que tem prestado a mim e a toda a minha família nos últimos anos, possibilitando que eu tivesse condições de estudar. Meus profundos agradecimentos e minha eterna gratidão.

A Fernanda, pelo afeto, amor e carinho. Uma pessoa que esteve sempre ao meu lado, paciente e sempre disposta a me ajudar no que era preciso. Passamos por momentos difíceis,

mas os momentos ótimos ao seu lado são mais importantes do que tudo isso. Você me ensina a cada dia como amar e a importância de se ter uma companheira para todas as horas.

Ao meu grande amigo Jonas, futuro farmacêutico mais famoso do Brasil, que lá de Alfenas ficava me enchendo a paciência na internet quase que diariamente. Admiro muito você garoto, e tenho certeza que essa amizade vai durar muito tempo ainda.

A toda a galera do CBI09, sem dúvida uma das melhores turmas da biologia que já existiu. Grandes momentos, festas, churrascos e junininhas... vocês são pessoas que guardarei comigo sempre.

Agradeço especialmente aos grandes amigos que fiz na faculdade, em especial três elementos com os quais sei que posso contar sempre. Obrigado Boi, Noé e Marcel pelos momentos fantásticos vividos na La Arca, pelas risadas, pelas baladinhas e pela amizade. Logicamente, não dá pra esquecer os nossos trabalhos feitos em cima da hora que foram sempre sucesso no final. Sei que essa amizade vai ficar para o resto da vida moçada.

Ao time de Futsal da UNESP, pelo companheirismo e pelo espírito de equipe sempre presente durante os dois anos que tive o prazer de fazer parte dessa equipe.

Ao meu orientador, Prof. Dr. André Rodrigues, o qual tive a felicidade de conhecer no meu primeiro ano e desde então formar uma parceria que tem dado muitos frutos. Gostaria de agradecer pela atenção com a qual sempre me tratou, pelas conversas sempre interessantes acompanhadas de salgados na cantina e pelos ensinamentos que ajudaram demais na minha formação. Jamais vou me esquecer da semana em que o Vinícius estava pra nascer e você, tendo passado quase que a madrugada em claro, ficou até nove horas da noite comigo no laboratório para finalizarmos um relatório que precisava de sua ajuda. Agradeço pela confiança em mim depositada e tenho certeza que essa parceria durará muito tempo ainda.

Ao Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca, pela possibilidade de começar a trabalhar no laboratório desde o começo da minha graduação, pela dedicação sempre presente para conseguir bolsas que me ajudaram muito financeiramente e pela amizade e conselhos durante esses quatro anos.

Ao Prof. Odair Correa Bueno, pela oportunidade de Iniciação Científica oferecida durante o ano de 2011 e pela respectiva bolsa recebida durante esse tempo.

Aos demais professores que participaram da minha graduação, sendo responsáveis pelo desenvolvimento da minha paixão pela Ciência e por me fazerem aprender e crescer muito durante todos esses anos, tanto pessoal como profissionalmente.

A galera do Laboratório de Microbiologia no CEIS (Sílvio, Weilan, Ife, Virgínia, Lídia, Thaís e demais) e ao pessoal do recente LESF (Danilo, Jaque, Rafa, Isabela, Mariana e

todos os outros) pela amizade, momentos engraçados e bate-papos nos nossos momentos de folga.

Ao CNPq (INCT – Controle Biorracional de Insetos Pragas), FAPESP e PROEX pelas bolsas concedidas durante toda a minha graduação, as quais foram muito importantes para minha estadia em Rio Claro.

A todos os funcionários da UNESP-Rio Claro e a todas as eventuais pessoas que eu possa ter esquecido de mencionar aqui. A todos, muito obrigado!

“Tornamos nosso mundo significativo pela coragem de nossas perguntas e pela profundidade de nossas respostas.”

Carl Sagan

RESUMO

As formigas da tribo Attini mantêm uma associação com actinobactérias encontradas nos biofilmes presentes no integumento desses insetos. Dentre as actinobactérias associadas às formigas Attini, os gêneros *Pseudonocardia* e *Streptomyces* são considerados prevalentes. Estudos indicam que essas bactérias auxiliam na defesa do jardim contra patógenos através da secreção de compostos antimicrobianos. Recentemente foi sugerido que tais bactérias podem ser importantes na defesa do próprio inseto, especialmente contra entomopatógenos. Duas teorias principais foram propostas para explicar as interações entre actinobactérias, formigas Attini e o microfungo parasita *Escovopsis*. Uma delas defende a coevolução entre esses organismos e a outra rejeita a existência da mesma, argumentando que a interação formiga-actinobactéria é uma simbiose aberta. Neste trabalho, avaliamos a interação entre actinobactérias e *Escovopsis* em experimentos *in vitro*. Um total de 14 linhagens de actinobactérias, compreendendo 12 de *Pseudonocardia*, uma de *Streptomyces* e uma de *Actinoplanes*, isoladas de *Trachymyrmex* (um gênero de formiga Attini não cortadeira) foram testadas frente a quatro linhagens de *Escovopsis*. Os *Escovopsis* foram isolados tanto de jardins de fungos de formigas *Trachymyrmex* quanto de cortadeiras de folhas (*Acromyrmex* e *Atta*). O crescimento micelial de *Escovopsis* (em cm^2) foi medido na presença e na ausência (controle) das actinobactérias. Os resultados demonstraram que todas as actinobactérias testadas inibiram *Escovopsis*, mas as taxas de inibição foram variáveis dependendo da linhagem da actinobactéria ($p < 0,05$). A linhagem de *Streptomyces* foi a mais efetiva, corroborando dados da literatura que indicam que outros micro-organismos, além de *Pseudonocardia*, também apresentam ação inibitória frente à *Escovopsis*. Além disso, foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) no crescimento micelial entre as quatro linhagens de *Escovopsis* testadas. Especificamente, a maior inibição ocorreu contra um *Escovopsis* isolado de *Acromyrmex*. Estes resultados sugerem que actinobactérias isoladas de formigas *Trachymyrmex* possivelmente secretam substâncias antimicrobianas que são efetivas contra *Escovopsis* de outros gêneros de formigas Attini. Estudos adicionais são necessários para verificar se a ação observada também pode ser encontrada em isolados adicionais de actinobactérias de *Trachymyrmex*.

PALAVRAS CHAVE: Attini, defesa, *Pseudonocardia*, simbiose, recrutamento

SUMÁRIO

Página

1 INTRODUÇÃO 9
2 REVISÃO DA LITERATURA 11
2.1 As formigas da tribo Attini e a associação com fungos 11
2.2 *Escovopsis*: fungo parasita associado às formigas Attini 12
2.3 Formigas Attini e actinobactérias 13
3 OBJETIVOS 16
3.1 Objetivo geral 16
3.2 Objetivos específicos 16
4 MATERIAL E MÉTODOS 17
4.1 Origem dos micro-organismos 17
4.2 Ensaios de antagonismo 17
4.3 Análise dos dados 19
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 20
5.1 Diferenças no crescimento entre as linhagens de *Escovopsis* 20
5.2 Efeito das actinobactérias sobre o crescimento de *Escovopsis* 25
6 CONCLUSÃO 28
PERSPECTIVAS 29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 30

1 INTRODUÇÃO

A agricultura de grande parte do continente americano, principalmente na América do Sul, sofre com os prejuízos causados pela ação das formigas cortadeiras. Esses insetos cortam folhas e flores frescas que utilizam para cultivar fungos como alimento. O fungo mutualista é responsável por hidrolisar esse substrato e gerar nutrientes assimiláveis para as formigas (SILVA et al., 2003).

A tribo Attini é considerada monofilética (SCHULTZ; MEIER, 1995; WETTERER; SCHULTZ; MEIER, 1998; SCHULTZ; BRADY, 2008) e acredita-se que a fungicultura se originou em um único evento há mais de 50 milhões de anos, na região amazônica (MUELLER et al., 2001; SCHULTZ; BRADY, 2008; SOLOMON et al., 2008). O presente trabalho estudou as formigas do gênero *Trachymyrmex* por ser um gênero pouco estudado em relação aos micro-organismos associados. Colônias de *Trachymyrmex* podem abrigar alguns milhares de operárias, e são consideradas de tamanho médio em comparação com as colônias de outras formigas Attini, como é o caso das formigas cortadeiras (*Atta* e *Acromyrmex*). As espécies do gênero *Trachymyrmex* apresentam operárias monomórficas, porém algumas podem apresentar um sutil polimorfismo (BRANDÃO; MAYHÉ-NUNES, 2007). As formigas desse gênero coletam matéria orgânica vegetal em decomposição e restos de insetos como substrato para o fungo mutualista e, em algumas ocasiões, podem coletar também folhas e pétalas frescas para essa finalidade (BRANDÃO; MAYHÉ-NUNES, 2007).

Estudos apontam que os jardins de fungos das formigas Attini é um ambiente que abriga uma microbiota diversa. Dentre os vários micro-organismos aí encontrados, o fungo *Escovopsis* foi descrito como um parasita específico do fungo das formigas (CURRIE; MUELLER; MALLOCH, 1999). *Escovopsis* é considerado um fungo anamórfico (fungos que apresentam somente fase assexuada de reprodução) que pode ocasionar um retardo no crescimento da colônia, ou levar até mesmo a colônia à morte (CURRIE, 2001a). Evidências sugerem que *Escovopsis* é um fungo micoparasita, que se nutre indiretamente das hifas do fungo mutualista (REYNOLDS; CURRIE, 2004). Tal parasita infecta ninhos da maioria dos gêneros da tribo Attini, incluindo as formigas do gênero *Trachymyrmex*.

Para combater *Escovopsis*, vários estudos apontam que esses insetos mantém uma associação com actinobactérias do gênero *Pseudonocardia*. Duas linhas de pensamento tentam explicar a associação dessas actinobactérias com as formigas Attini. A primeira admite que *Pseudonocardia* associadas às formigas Attini são específicas e coevoluiram durante 50 milhões de anos (CURRIE et al., 1999). Estudos apontam que essas actinobactérias produzem

compostos antimicrobianos que agem majoritariamente em *Escovopsis*, tendo baixa atividade em outros organismos, e constituindo evidências de coevolução. A segunda teoria afirma que *Pseudonocardia* seria apenas um dentre os vários outros componentes microbianos presente no integumento das formigas (KOST et al., 2007; MUELLER et al., 2008). Baseados em estudos que contrariam a primeira teoria, estes últimos autores argumentam que os dados utilizados não são suficientes para comprovar tal coevolução, e que essa ideia foi montada em cima de um número amostral muito pequeno dentro das Attini, não podendo ser generalizada para toda a tribo. Admite-se nessa teoria que as actinobactérias são continuamente recrutadas do ambiente, estabelecendo uma simbiose aberta; além disso, seus compostos antimicrobianos apresentariam amplo espectro de ação (MUELLER et al., 2008; MUELLER, 2012). Assim como as *Pseudonocardia*, vários gêneros de actinobactérias, incluindo *Streptomyces* e *Amykolatopsis*, também seriam responsáveis pela proteção contra *Escovopsis* (SEN et al., 2009). Entretanto, hipóteses emergentes sugerem que as actinobactérias do integumento estariam relacionadas com a defesa de eventuais patógenos que possam atacar as operárias, como os micro-organismos entomopatogênicos (MUELLER, 2012).

Embora de visões aparentemente conflitantes, os estudos que suportam as teorias foram realizados, na sua maioria, na América Central e enfatizando o grupo das formigas cortadeiras. Nesse sentido, poucos são os estudos com outras formigas da tribo Attini e em outras regiões do continente americano. Assim, o presente projeto buscou responder as seguintes questões: (i) Actinobactérias associadas às formigas *Trachymyrmex* apresentam atividade antifúngica específica contra *Escovopsis* associados aos ninhos desse gênero de formiga? (ii) Comparado com *Pseudonocardia*, qual é o grau de inibição de outras actinobactérias não-*Pseudonocardia* frente ao parasita *Escovopsis*?

Nossos resultados mostraram que a ação das actinobactérias estudadas não se restringe apenas à *Escovopsis* isolados de *Trachymyrmex*, pois a linhagem do parasita mais inibida foi isolada de *Acromyrmex*. Assim, é possível afirmar que não houve especificidade na ação das bactérias frente à *Escovopsis* isolado de diferentes gêneros de Attini. Paralelamente, a linhagem de *Streptomyces* testada foi mais efetiva na inibição de *Escovopsis* em comparação com *Pseudonocardia*. Ainda, a linhagem de *Actinoplanes* apresentou inibição semelhante às *Pseudonocardia*. Esses resultados corroboram a teoria que suporta uma simbiose aberta, visto que não foi observada uma especificidade na ação das *Pseudonocardia*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 As formigas da tribo Attini e a associação com fungos

A tribo Attini compreende 16 gêneros e aproximadamente 297 espécies descritas (BRANDÃO; MAYHÉ-NUNES; SANHUDO, 2011). Os membros dessa tribo são restritos ao continente americano e são encontrados desde o sul da Argentina até o sul dos Estados Unidos (WEBER, 1966, 1972; MAYHÉ-NUNES; JAFFÉ, 1998). A característica principal da tribo é o cultivo de um basiodiomiceto usado para alimentação; por este motivo, tais insetos podem ser classificados como agricultores, pois nutrem e estimulam o crescimento do parceiro fúngico (WEBER, 1972).

O fungo mutualista é cultivado em uma estrutura composta por fragmentos vegetais e micélio do fungo mutualista, de aparência esbranquiçada e que é conhecida como "jardim de fungos". O fungo é o principal alimento das larvas (WEBER, 1972; SILVA et al., 2003) e seu papel dentro do ninho é degradar os substratos vegetais fornecidos pelas formigas, o que resulta em açúcares simples que podem ser usados como alimento pelas operárias (SILVA et al., 2003) e outros micro-organismos presentes (MENDES et al., 2012).

A tribo Attini é monofilética (SCHULTZ; MEIER, 1995; WETTERER; SCHULTZ; MEIER, 1998; SCHULTZ; BRADY, 2008) e acredita-se que a fungicultura originou-se em um único evento há mais de 50 milhões de anos na região amazônica (MUELLER et al., 2001; SCHULTZ; BRADY, 2008; SOLOMON et al., 2008). Schultz e Brady (2008) reconstruíram toda a história evolutiva da tribo e mostraram que ela divergiu em duas clades (denominadas Paleoattini e Neoattini); as primeiras são constituídas por três gêneros (*Mycocepurus*, *Myrmicocrypta* e *Apterostigma*) morfologicamente distintos que formam um grupo monofilético basal na tribo; já as Neoattini podem ser divididas em dois subgrupos também monofiléticos: (i) grupo mais basal, constituído pelos gêneros *Mycetophylax*, *Mycetarotes*, *Mycetosoritis*, *Mycetagroicus*, *Cyphomyrmex*, *Paramycetophylax* e *Kalathomyrmex* (KLINGENBERG; BRANDÃO, 2009) e (ii) grupo derivado que compreende os gêneros *Sericomyrmex* e *Trachymyrmex*, além do grupo mais derivado dentro da tribo Attini, as formigas cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* (SCHULTZ; BRADY, 2008).

O presente trabalho focou a atenção nas formigas do gênero *Trachymyrmex*, por ser um gênero com poucos estudos referentes aos micro-organismos associados. Esse gênero compreende cerca de 50 espécies distribuídas ao longo de todo o continente americano. O gênero é atualmente dividido em seis grupos: Opulentus, Iheringi, Jamaicensis, Urichi,

Septentrionalis e Cornetzi (BRANDÃO; MAYHÉ-NUNES, 2007). Filogeneticamente, este gênero é considerado um grupo de transição na evolução da tribo Attini, sendo o grupo mais próximo às formigas cortadeiras (BRANDÃO; MAYHÉ-NUNES, 2007).

Colônias de *Trachymyrmex* podem apresentar alguns milhares de operárias e podem ser consideradas de tamanho médio em comparação com as colônias de outras formigas Attini, especialmente as cortadeiras; além disso, as operárias são em sua maioria monomórficas, podendo apresentar sutil polimorfismo em alguns casos (BRANDÃO; MAYHÉ-NUNES, 2007). Formigas *Trachymyrmex* coletam matéria orgânica vegetal em decomposição e restos de insetos como substrato para o fungo mutualista e, em algumas ocasiões, podem coletar também folhas e pétalas frescas para essa finalidade (BRANDÃO; MAYHÉ-NUNES, 2007).

2.2 *Escovopsis*: fungo parasita associado às formigas Attini

Vários micro-organismos podem ser encontrados no jardim de fungos, além do fungo mutualista. Assim, foram encontrados nesse substrato fungos filamentosos (RODRIGUES et al., 2008), bactérias (BACCI et al., 1995; RIBEIRO, 2000) e leveduras (CRAVEN; DIX; MICHAELIS, 1970; CARREIRO et al., 1997, RODRIGUES et al., 2009).

Com exceção do fungo mutualista, um dos micro-organismos mais comumente associado aos ninhos dessas formigas é o fungo filamentoso do gênero *Escovopsis* (Ascomycota: Hypocreales). Até o momento, esse fungo foi encontrado associado aos jardins de fungos das formigas Attini e é considerado um parasita específico do fungo mutualista das formigas (CURRIE; MUELLER; MALLOCH, 1999; CURRIE; STUART, 2001; CURRIE et al., 2003a). *Escovopsis* é considerado um fungo anamórfico (fungos que apresentam somente fase assexuada de reprodução) e podem levar a um retardo no crescimento da colônia, ou até a morte da mesma (CURRIE, 2001a). Evidências sugerem que representantes do gênero *Escovopsis* são micoparasitas, que se nutrem indiretamente das hifas do fungo mutualista (REYNOLDS; CURRIE, 2004).

Taerum et. al. (2007) realizaram um estudo taxonômico com *Escovopsis* isolados de ninhos de formigas cortadeiras de diversas regiões da América e concluíram que, mesmo nunca tendo sido observada sua forma sexuada na natureza, o mesmo apresenta variações genéticas consideráveis. Além disso, diferentes linhagens de *Escovopsis* podem ocasionar infecções múltiplas em ninhos de formigas cortadeiras (TAERUM; CAFARO; CURRIE, 2010).

Folgarait et. al. (2011) em bioensaios realizados com *Escovopsis* e o fungo mutualista, demonstraram que tal fungo tem potencial para ser usado como uma opção de controle biológico das formigas cortadeiras. Quando confrontado com o fungo mutualista, o parasita apresentou taxa de crescimento maior que o controle (onde apenas ele foi inoculado na placa), indicando um estímulo de crescimento, provavelmente devido aos compostos químicos secretados pelo fungo mutualista e prontamente reconhecidos pelo fungo *Escovopsis* (GERARDO et al. 2006).

Em estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa (MEIRELLES; PAGNOCCA; RODRIGUES, 2010), foi realizada a caracterização morfológica de vários isolados de *Escovopsis* oriundos de ninhos de formigas cortadeiras de diversas regiões do Brasil; concluímos que o fungo parasita apresenta variações macromorfológicas e na taxa de crescimento, sendo que alguns destes isolados foram utilizados no presente projeto.

2.3 Formigas Attini e actinobactérias

As operárias da tribo Attini geralmente apresentam uma camada esbranquiçada sobre a cutícula ou em outras regiões que, por muitos anos, pensou-se ser apenas uma camada inerte composta por ceras cuticulares (WEBER, 1972). Não encontrada no gênero *Atta*, essa camada foi investigada e concluiu-se que é na verdade um acúmulo de bactérias filamentosas (CURRIE et al., 1999). Inicialmente, tais bactérias foram identificadas como pertencentes ao gênero *Streptomyces* e, posteriormente, reclassificadas como pertencentes ao gênero *Pseudonocardia* (CURRIE et al., 2003b). Em alguns gêneros de formigas da tribo Attini, *Pseudonocardia* também podem ser encontradas na propleura ou na superfície do mesossoma; em tais estruturas foram observadas cavidades (fóveas) às quais estão associadas glândulas exócrinas que provavelmente fornecem nutrientes para o crescimento da bactéria (CURRIE et al., 2006).

Segundo Currie e colaboradores (1999), *Pseudonocardia* seria o terceiro membro da simbiose formiga-fungo mutualista. Tal afirmativa se torna ainda mais clara quando outras funções da bactéria foram relatadas; um exemplo é a produção de substâncias que inibem o crescimento de *Escovopsis* (CURRIE et al., 1999). Assim, a presença da *Pseudonocardia* na cutícula das operárias diminuiria a prevalência de *Escovopsis* no jardim de fungo e aumentaria a sobrevivência de ninhos infectados experimentalmente (CURRIE; BOT; BOOMSMA, 2003).

O modo como tais bactérias são adquiridas pelos ninhos ao longo das gerações e seu real papel na relação ainda é motivo de discussão. Existem basicamente duas teorias principais que visam esclarecer o papel dessas bactérias. A primeira seria que tais bactérias são transmitidas principalmente de maneira vertical (de colônia parental para filha), o que implicaria em uma baixa diversidade dessas actinobactérias dentro da tribo Attini e em uma alta especificidade entre formigas Attini - *Pseudonocardia* (CURRIE et al., 1999; CURRIE, 2001b; CURRIE et al. 2006; POULSEN et al., 2007, POULSEN et al., 2010; CAFARO et al., 2011). Segundo essa teoria, as bactérias teriam coevoluído com a tribo Attini e o parasita *Escovopsis*, sendo o gênero *Pseudonocardia* o principal responsável pela defesa do ninho contra o fungo parasita (CURRIE; BOT; BOOMSMA, 2003; CAFARO et al., 2011).

Diversos estudos *in vitro* foram realizados para tentar quantificar a atividade antagônica de linhagens de bactérias *Pseudonocardia* frente ao parasita *Escovopsis* buscando uma melhor compreensão do papel da bactéria no mutualismo das formigas Attini e seus fungos. Poulsen e colaboradores (2007) estudaram diferentes linhagens de *Pseudonocardia* isoladas de ninhos de formigas de praticamente toda a tribo Attini; os resultados reforçam a hipótese de que há apenas uma linhagem da actinobactéria em cada ninho e a relação de especificidade defendida por estes autores. Os autores ainda demonstraram inibição entre diversas *Pseudonocardia*, e tal atividade foi significativa quando os grupos de actinobactérias testados eram distantes filogeneticamente. A explicação dessa atividade antagônica está possivelmente relacionada com a competição existente entre as linhagens de *Pseudonocardia* dentro de um mesmo ninho. Assim, *Pseudonocardia* já estabelecidas nos ninhos produziriam antibióticos que inibiriam outras actinobactérias do mesmo gênero que tentassem competir pelo substrato, e esta atividade antagônica seria maior sobre grupos filogeneticamente distantes (POULSEN et. al., 2007). Quando tratamos do parasita *Escovopsis*, os compostos antimicrobianos responsáveis pela inibição deste fungo e consequente defesa do ninho seriam diferentes dos citados acima. Os artigos do Oh et al. (2009) sugerem quais sejam alguns desses antimicrobianos.

A segunda teoria diz que tal especificidade não existe de maneira tão acentuada; portanto, a transmissão da actinobactéria se daria, principalmente, de maneira horizontal, ou seja, elas provavelmente são adquiridas do ambiente (MUELLER et al. 2008; SEN et al. 2009). Kost e colaboradores (2007) encontraram grande diversidade de actinobactérias associadas à *Acromyrmex octospinosus* e sugeriram que as actinobactérias poderiam ser adquiridas de maneira dinâmica no ambiente, sendo em muitos casos provenientes do solo e/ou ninhos próximos. Mueller et al. (2008) mostrou a presença de actinobactérias não-

Pseudonocardia associadas às formigas. Mendes (2010) também encontrou diversas actinobactérias pertencentes aos gêneros *Pseudonocardia* e *Streptomyces* associadas aos ninhos de formigas *Trachymyrmex* spp.

O trabalho realizado por Sen e colaboradores (2009) contraria a ideia de que *Pseudonocardia* seria membro do mutualismo e reforça dados da segunda teoria. Esses autores relatam que linhagens de *Pseudonocardia* não inibiram *Escovopsis*, mas inibiram o fungo mutualista. Ainda, utilizando métodos dependentes e independentes de cultivo, Ishak et al. (2011) encontraram várias actinobactérias (gêneros *Solirubrobacter*, *Pseudonocardia* e *Microlunatus*) em *Trachyrmymex septentrionalis* (espécie de Attini encontrada na América do Norte). Esses resultados reforçam a ideia que *Pseudonocardia* não é o único gênero de actinobactéria associado às formigas Attini.

Mueller (2012) recentemente sugeriu uma nova interpretação para explicar o papel das actinobactérias associadas ao integumento das formigas Attini. Segundo o autor, tais bactérias seriam responsáveis, principalmente, pela defesa contra patógenos do inseto, como é caso de micro-organismos entomopatogênicos. Portanto, as actinobactérias não atuariam necessariamente na defesa do jardim. O mesmo autor ainda argumenta que a relação existente entre actinobactérias e as formigas Attini é uma simbiose aberta. Nesta, complexos processos de recrutamento de micro-organismos do ambiente para o integumento das formigas, desenvolveriam uma relação dinâmica e não específica com a microbiota presente no biofilme microbiano.

Um estudo que testou a hipótese proposta por Mueller (2012) mostrou que operárias que sofreram a retirada da camada de micro-organismos de seus integumentos por meio de antibióticos se tornaram mais suscetíveis ao fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (MATTOSO; MOREIRA; SAMUELS, 2012).

O presente trabalho buscou verificar a existência de especificidade na relação actinobactéria-*Escovopsis* no gênero *Trachymyrmex* e se baseou nas duas teorias já citadas para discussão dos dados encontrados.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- ✓ Avaliar o antagonismo de linhagens de actinobactérias isoladas de ninhos de *Trachymyrmex* spp. frente ao fungo parasita *Escovopsis*.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar o antagonismo de 12 linhagens de *Pseudonocardia*, uma de *Streptomyces* e uma de *Actinoplanes* isoladas de formigas *Trachymyrmex* frente a linhagens de *Escovopsis* de formigas cortadeiras (*Atta*, n=1; *Acromyrmex*, n=2) e não cortadeiras (*Trachymyrmex*, n=1).

- ✓ Correlacionar os dados encontrados com as duas teorias vigentes sobre a interação entre actinobactérias, formigas Attini e o parasita *Escovopsis.*

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Origem dos micro-organismos

Neste estudo foram utilizadas 12 linhagens de *Pseudonocardia*, uma linhagem de *Streptomyces* e uma linhagem de *Actinoplanes*. Todas as linhagens foram isoladas do integumento de operárias de diferentes espécies de *Trachymyrmex* (Tabela 1) durante o trabalho realizado por MENDES (2010) no campus da UNESP de Rio Claro – SP (GPS: S 22°23'45.96"/ W 47°32'43.2") e na Estação Ecológica do Panga – MG (GPS: S 19°10'22.476"/ W 48°23'48.12"). As linhagens encontram-se armazenadas no Centro de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP), UNESP – Rio Claro. As actinobactérias estão mantidas em tubos (slant) contendo YMA a 10°C e em glicerol 10% a -80°C.

As quatro linhagens do fungo parasita *Escovopsis* utilizados nos testes de antagonismo foram isolados previamente (RODRIGUES et al., 2005; 2008) de formigas dos gêneros *Atta* (n=1), *Acromymex* (n=2) e *Trachymyrmex* (n=1). Eles encontram-se armazenados no mesmo banco de micro-organismos, em tubos com o meio de cultura potato-dextrose agar (PDA, Acumedia) mantidos à 10° C. Além disso, cópias de segurança estão mantidas em glicerol 10% a - 80° C.

Todas as culturas foram repicadas periodicamente para manter a coleção de trabalho durante a realização dos experimentos e foram continuamente checadas quanto a pureza.

4.2 Ensaios de antagonismo

Para avaliação da atividade antagonista das linhagens de *Pseudonocardia*, *Streptomyces* e *Actinoplanes* frente ao fungo parasita, as actinobactérias foram inoculadas a 1,0 cm da borda das placas contendo meio *Yeast Malt Extract Agar* (YMA). Apenas uma linhagem foi inoculada por placa. Após a inoculação, as placas foram incubadas a 25° C, no escuro, por 25 dias, para o desenvolvimento das actinobactérias. Um bloco de 5 mm de diâmetro de *Escovopsis*, cultivado previamente em PDA por 10 dias, foi inoculado no centro de cada placa e estas foram incubadas por mais 14 dias nas mesmas condições. Para cada confronto actinobactéria - *Escovopsis* (um total de 56 confrontos) foram realizadas seis réplicas.

Blocos de 5 mm de linhagens de *Escovopsis* também foram inoculadas em placas de YMA, à 25º C no escuro, sem a presença das bactérias (controle do experimento); nestes,

também foram utilizadas seis réplicas e foi realizada uma análise das taxas de crescimento de cada uma das quatro linhagens com medidas realizadas nos dias: 3, 5, 7, 9, 11 e 14.

As placas foram digitalizadas em scanner (Genius, modelo HR7x) e a área de crescimento (em cm^2) foi medida utilizando o software ImageJ v.1.45 (ABRAMOFF et al., 2004).

Tabela 1: Linhagens de actinobactérias utilizadas no presente trabalho

Código do isolado	Código do Ninho	Formiga	Local da coleta
***Pseudonocardia* sp.**			
TD001[1]	SES080402-05	*Trachymyrmex* sp.	UNESP - Rio Claro, SP
TD002[1]	SES080402-05	*Trachymyrmex* sp.	UNESP - Rio Claro, SP
TD003	SES080419-02	*Trachymyrmex* sp.	UNESP - Rio Claro, SP
TD004[2]	SES080419-04	*Trachymyrmex* sp.	UNESP - Rio Claro, SP
TD006[3]	SES080419-03	*Trachymyrmex* sp.	UNESP - Rio Claro, SP
TD007[3]	SES080419-03	*Trachymyrmex* sp.	UNESP - Rio Claro, SP
TD008[2]	SES080419-04	*Trachymyrmex* sp.	UNESP - Rio Claro, SP
TD009	SES080420-04	*Trachymyrmex* sp.	UNESP - Rio Claro, SP
TD010	SES080420-05	*Trachymyrmex* sp.	UNESP - Rio Claro, SP
TD012	SES080420-06	*Trachymyrmex* sp.	UNESP - Rio Claro, SP
TD014	SES080420-07	*Trachymyrmex* sp.	UNESP - Rio Claro, SP
TD031[4]	ARTD080903-04	*Trachymyrmex* sp.	UNESP - Rio Claro, SP
***Actinoplanes* sp.**			
TD028[4]	ARTD080903-04	*Trachymyrmex* sp.	UNESP - Rio Claro, SP
***Streptomyces* sp.**			
TD049	SES080922-03	*Trachymyrmex* sp.	Estação Ecológica do Panga, Uberlândia, MG

[1,2,3,4] indicam linhagens de actinobactérias provenientes do mesmo ninho

Tabela 2: Linhagens de *Escovopsis* utilizadas nos testes de antagonismo.

Código do isolado	Código do ninho	Formiga de origem		Local de coleta	GPS
		Gênero	Espécie		
SES005	SES080922-03	*Trachymyrmex*	sp.	Estação Ecológica do Panga, Uberlândia, MG	S 19° 10' 22.476" W 48° 23' 48.12"
NL007	N68	*Atta*	*sexdens*	Botucatu, SP	S 22º 50' 77.4" W 48º 26' 16"
RS076	AOMB130904-04	*Acromyrmex*	*coronatus*	Vacaria, RS	S 28° 27' 51.7" W 50° 53' 7"
RS055	AOMB110904-07	*Acromyrmex*	*heyeri*	Chuvisca, RS	S 30° 50' 10.2" W 51º 55' 10.4"

4.3 Análise dos dados

Os dados de área de crescimento micelial de *Escovopsis* foram normalizados; em outras palavras, a área de crescimento final de *Escovopsis* frente às actinobactérias foi dividida pela área de crescimento média do *Escovopsis* crescendo na ausência das actinobactérias (controle). Essa normalização foi necessária, pois os quatro *Escovopsis* apresentam diferentes taxas de crescimento. Estes dados foram utilizados em testes estatísticos, sendo a análise de variância de 2-fatores (ANOVA) aplicada para avaliar a influência das linhagens de actinobactérias no crescimento do parasita. Diferenças entre as médias de crescimento radial foram avaliadas com nível de significância de 0,05, utilizando o teste de Bonferroni com o auxílio do software Biostat 2009 (AnalystSoft) .

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A maioria dos estudos sobre atividade antimicrobiana de *Pseudonocardia* utilizou bactérias isoladas de várias espécies de *Acromyrmex*, especialmente aquelas encontradas na América Central (POULSEN et al., 2007; 2010). No entanto, poucos são os estudos que avaliaram a atividade antimicrobiana de *Pseudonocardia* e *Streptomyces* de formigas do gênero *Trachymyrmex* (SEN et al., 2009; CAFARO et al., 2011). Dentre esses poucos estudos, os realizados por Sen et al. (2009) e Cafaro et al. (2011) demonstraram que linhagens de *Pseudonocardia* isoladas de *Trachymyrmex*, bem como outras actinobactérias isoladas de formigas do mesmo gênero e também do solo, são capazes de inibir o fungo *Escovopsis*. Esses trabalhos relataram que *Pseudonocardia* isoladas de *Trachyrmyrmex* podem inibir também *Escovopsis* que infectam os jardins de outros gêneros de Attini. Entretanto, o foco desses dois estudos não estava voltado para mensurar a atividade de actinobactérias em *Escovopsis* de diferentes gêneros de formigas da tribo Attini. Nesse contexto, o presente estudo procurou avaliar sistematicamente a atividade antimicrobiana de actinobactérias isoladas de *Trachymyrmex* frente à *Escovopsis* de três gêneros de formigas Attini.

5.1 Diferenças no crescimento entre as linhagens de *Escovopsis*

Considerando que cada linhagem de *Escovopsis* apresenta taxa de crescimento distinta, na análise estatística, utilizamos os valores da área de crescimento de cada linhagem frente às actinobactérias, normalizados pelo controle (ver item 4.3.). Houve diferença significativa no crescimento micelial entre todos os isolados de *Escovopsis* estudados ($F = 150,8994$; $p = 0,00$; Tabela 3; Figura 1). A tabela 4 ilustra as diferenças entre os quatro *Escovopsis*, representadas pelas médias das seis réplicas do crescimento do fungo (valores normalizados) frente a cada actinobactéria, nos 56 ensaios realizados.

No geral, as médias totais de crescimento foram significativamente diferentes para cada um dos *Escovopsis* testados ($p < 0,05$; Tabela 4). Ainda com base nessas médias, é possível calcular a porcentagem de inibição que cada *Escovopsis* sofreu pela ação das actinobactérias (Figura 2). As porcentagens de inibição seguiram a seguinte ordem: a linhagem de *Escovopsis* mais inibida foi RS055 (isolado de *Acromyrmex heyeri*), seguida por SES005 (*Trachymyrmex* sp.), RS076 (*Acromyrmex coronatus*) e NL007 (*Atta sexdens*) (Figura 2). Em alguns casos, esta linhagem NL007 cresceu e esporulou sobre a colônia da actinobactéria (Figura 1 – 1B).

Tabela 3. Comparação entre as médias das áreas de crescimento em ensaios de antibiose de actinobactérias frente à *Escovopsis* (ANOVA – 2 fatores)

Origem de variação	*SS*	*d.f.*	*MS*	*F*	*p-nível*	*Crit. F*	*Omega quadr.*
Fator #1 (Escovopsis)	18,0403	3	6,0134	150,8994	0,00	2,6368	0,4692
Fator #2 (Actinobactéria)	5,5769	13	0,429	10,7651	0,00	1,7552	0,1325
Fator #1 + #2 (Interação)	3,3761	39	0,0866	2,1723	0,0002	1,4428	0,0477
Dentro de grupos	11,1582	280	0,0399				
Total	38,1515	335	0,1139				

Tabela 4. Valores normalizados de crescimento de *Escovopsis* para cada um dos 56 ensaios actinobactéria-fungo parasita.

Actinobactérias	***Atta* (NL007)**	***Acromyrmex* (RS076)**	***Trachymyrmex* (SES005)**	***Acromyrmex* (RS055)**
***Pseudonocardia* sp.**				
TD001[1]	0,8542a*	0,5862a	0,1132b	0,0917b
TD002[1]	0,7874a	0,6351a	0,1132b	0,1132b
TD003	0,6114a	0,5034a	0,2023b	0,2183b
TD004[2]	0,7131a	0,5675a	0,1759b	0,1394b
TD006[3]	0,8174a	0,7346ab	0,4813b	0,0617c
TD007[3]	0,8836a	0,5166b	0,1135c	0,0388c
TD008[2]	0,7966a	0,4673b	0,1652bc	0,13c
TD009	0,7874a	0,5101ab	0,2658b	0,2228b
TD010	0,7585a	0,5542ab	0,2544bc	0,2194c
TD012	0,7836a	0,5102ab	0,3807b	0,2867b
TD014	0,7787a	0,5045a	0,4887a	0,1537b
TD031[4]	0,9984a	0,7148ab	0,5323b	0,2245c
***Actinoplanes* sp.**				
TD028[4]	0,6765a	0,6526a	0,133b	0,1707b
***Streptomyces* sp.**				
TD049	0,0083a	0,0099a	0,0095a	0,0083a
TOTAL	**0,7325a**	**0,5334b**	**0,2449c**	**0,1485d**

* letras iguais na mesma linha indicam que não houve diferença estatística entre os valores segundo Teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

[1,2,3,4] indicam linhagens de actinobactérias provenientes do mesmo ninho.

Obs: quanto maior o valor normalizado, menor a ação da actinobactéria; valor = 1 significaria que o crescimento do *Escovopsis* foi igual ao seu crescimento no controle (ausência da bactéria).

Figura 1. Testes de antagonismo entre as actinobacterias (TDs) frente a quatro linhagens de *Escovopsis*. Nas linhas 1, 2, 3 e 4 temos os resultados dos ensaios com *Escovopsis* NL007, RS076, SES005 e RS055, respectivamente. **1A** = Controle NL007 (sem actinobactéria); **1B** = NL007 x TD031 (seta branca indica local onde está a actinobactéria); **1C** = NL007 x TD014; **2A** = Controle RS076; **2B** = RS076 x TD001; **2C** = RS076 xTD028; **3A** = Controle SES005; **3B** = SES005 x TD007; **3C** = SES005 x TD008; **4A** = Controle RS055; **4B** = RS055 x TD049; **4C** = RS055 x TD031. Para detalhes sobre os micro-organismos ver Tabelas 1 e 2.

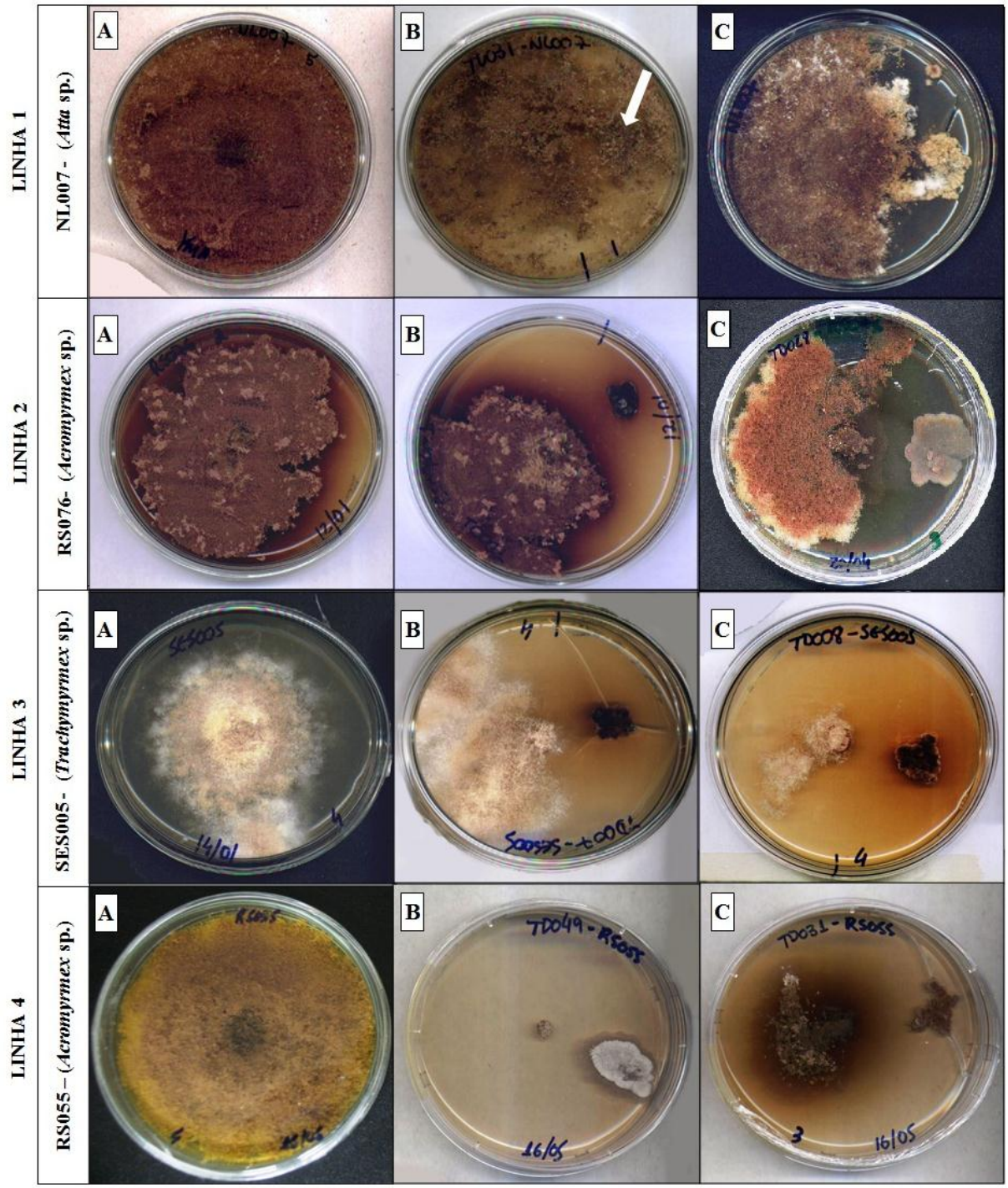
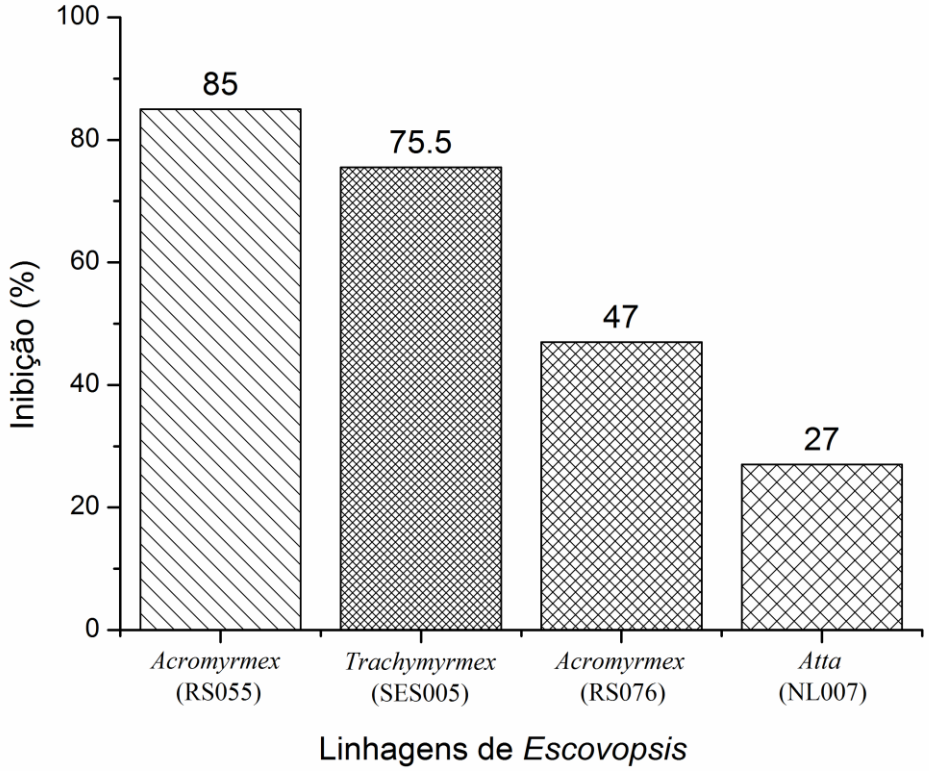


Figura 2. Porcentagens de inibição para cada um dos *Escovopsis* testados com relação ao seu crescimento no controle. Os dados foram convertidos para porcentagem de inibição utilizando os valores normalizados presentes na Tabela 4.



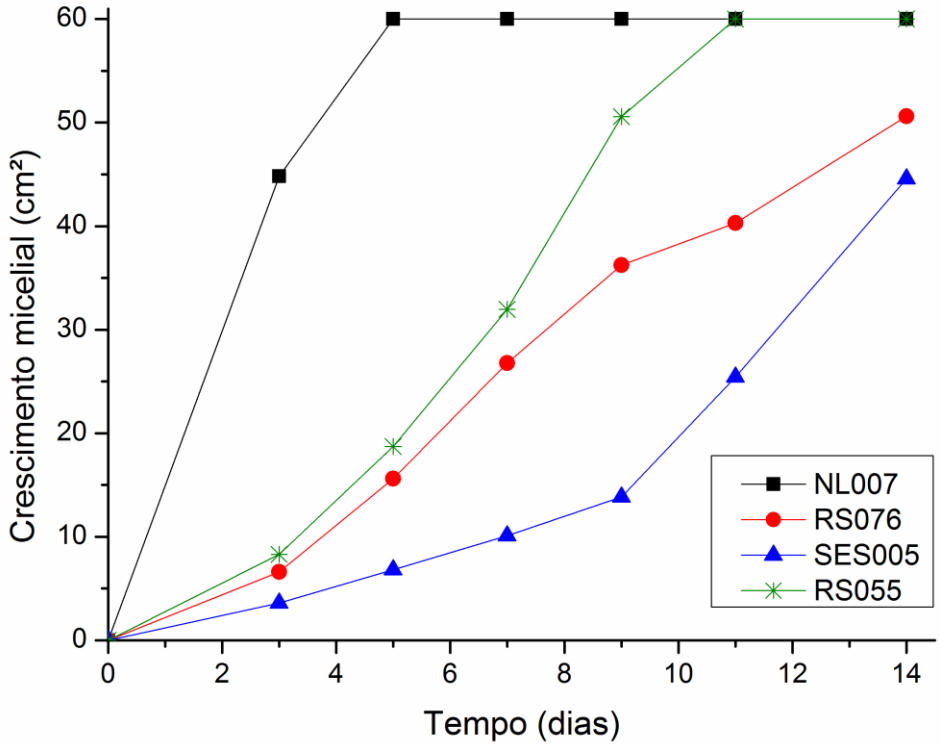
Currie et al. (1999), Currie (2001b), Currie et al. (2003a) sugerem que *Pseudonocardia* teria coevoluído com as formigas para proteger os jardins de fungos do parasita *Escovopsis*. Os autores propuseram um modelo de evolução "armamentista" (*arms race*), ou seja, não apenas deveria haver a produção de compostos cada vez mais efetivos por *Pseudonocardia*, como também deveria haver linhagens de *Escovopsis* cada vez mais resistentes. Tal cenário levaria a linhagens de *Escovopsis* e de *Pseudonocardia* cada vez mais específicas dentro de cada grupo de formiga da tribo Attini. Partindo dessa premissa, espera-se uma maior ação das *Pseudonocardia* sobre as linhagens de *Escovopsis* isoladas de ninhos de formigas filogeneticamente relacionadas aos ninhos de origem das actinobactérias. Logo, sendo as actinobactérias isoladas de formigas *Trachymyrmex*, linhagens do fungo parasita oriundas do mesmo gênero de formiga deveriam apresentar maior suscetibilidade aos compostos produzidos pelas mesmas. Os resultados apresentados na Tabela 4 e Figura 2 mostraram que as actinobactérias não somente apresentaram ação sobre *Escovopsis* não isolados de *Trachymyrmex*, como também tal ação foi mais efetiva em uma linhagem do fungo parasita isolada de formiga cortadeira (*Acromyrmex*). Esses resultados contradizem observações de outros autores (CURRIE et al. 1999; CURRIE, 2001b) que demonstram que

os compostos produzidos pelas actinobactérias são cada vez mais dirigidos para determinadas linhagens de *Escovopsis.*

Paralelamente, observamos que a linhagem de *Escovopsis* que foi menos inibida (NL007) apresenta características fisiológicas interessantes. Este isolado apresenta uma taxa de crescimento mais elevada, quando comparada às demais linhagens (Figura 3). Especificamente, a taxa de crescimento é, no mínimo, cinco vezes maior quando comparada com os outros *Escovopsis* estudados nas mesmas condições experimentais, confirmando estudos preliminares, nos quais observamos que algumas linhagens de *Escovopsis* isolados de *Atta* apresentam taxas de crescimento significativamente maiores do que linhagens do parasita oriundas de formigas *Acromyrmex* (MEIRELLES; PAGNOCCA; RODRIGUES, 2010). Portanto, a menor inibição observada sobre a linhagem NL007 do parasita pode ser devido à capacidade que ela apresenta de crescer mais rapidamente, o que faz com que a ação dos compostos inibidores sobre ela seja de menor impacto.

Além da ação inibitória dos compostos produzidos por *Pseudonocardia* sobre o fungo parasita, Sen e colaboradores (2009) relataram que esses compostos também podem ser nocivos ao fungo mutualista; por esse motivo, os autores sugeriram que os compostos só poderiam ser utilizados pelas formigas em locais específicos do jardim, isto é, apenas onde estejam ocorrendo as infecções por *Escovopsis*. Caso esse crescimento vigoroso observado *in vitro* também ocorra em condições naturais, talvez o padrão de crescimento rápido demonstrado pelo isolado NL007 poderia ser vantajoso ao parasita, pois a infecção rapidamente se disseminaria no jardim de fungos, dificultando a aplicação dos compostos antimicrobianos das actinobactérias pelas formigas.

Figura 3. Taxas de crescimento de *Escovopsis* na ausência da bactéria (controle).



5.2 Efeito das actinobactérias sobre o crescimento de *Escovopsis*

Houve diferença significativa na capacidade de inibição de *Escovopsis* entre as linhagens de actinobactérias (F = 10,7651; p = 0,00; Tabela 3). O teste de Bonferroni mostrou diferenças significativas na ação inibitória das actinobactérias estudadas (Tabela 5), sugerindo que variedades ou até mesmo espécies distintas destas podem estar associadas às formigas *Trachymyrmex*.

As linhagens TD001 e TD002 são provenientes do mesmo ninho, o que também ocorre para as linhagens TD004 e TD008 e TD006 e TD007. Conforme esperado, foram observados valores semelhantes de crescimento do parasita entre os pares, sem diferenças estatísticas significativas (Tabela 5). Entretanto, no caso das linhagens TD031 e TD028, apesar de ambas terem sido isoladas de operárias do mesmo ninho, verificamos que pertencem a gêneros de actinobactérias distintos. Assim, a linhagem TD028, identificada como *Actinoplanes* (Figura 1 – 2C) foi significativamente mais efetiva que a linhagem TD031 (Tabela 5), identificada como *Pseudonocardia*.

Ainda, *Pseudonocardia* TD031 foi a linhagem que menos inibiu o crescimento de *Escovopsis*, apresentando diferenças estatísticas no crescimento do parasita quando

comparada com outras linhagens estudadas (Tabela 5). Esta actinobactéria não apresentou ação sobre *Escovopsis* NL007, sendo o crescimento do parasita praticamente igual ao controle (valor normalizado = 0,9984, Tabela 4; Figura 1 – 1B). Sen et al. (2009) também demonstraram que algumas linhagens de *Pseudonocardia* isoladas de *Trachymymex zeteki* e *Trachymyrmex setentrionalis* não apresentaram efeitos inibitórios sobre o crescimento de uma linhagem de *Escovopsis* isolada de *T. zeteki*. Aqui, mostramos que a ausência de ação de *Pseudonocardia* de *Trachymyrmex* se estende para outras linhagens do parasita associadas a outros gêneros de formigas.

Streptomyces TD049 foi a linhagem mais efetiva nesse estudo, pois inibiu totalmente todos as linhagens de *Escovopsis* (Tabelas 4 e 5; Figura 1 – 4B). Estes dados corroboram relatos da literatura de que compostos de outras actinobactérias podem ser eficientes no controle do parasita (KOST et al., 2007; HAEDER et al., 2009; MENDES, 2010). Além disso, os resultados suportam a segunda teoria proposta a respeito da relação entre actinobactérias, *Escovopsis* e formigas da tribo Attini, mostrando que as formigas podem se associar com vários micro-organismos em uma simbiose aberta (MUELLER, 2012). Muitos desses micro-organismos podem ser efetivos na defesa contra o parasita *Escovopsis*, não sendo essa ação específica do gênero *Pseudonocardia*.

Uma segunda dedução importante deste estudo e que contraria a teoria da coevolução, está relacionada com o fato de não termos observado antibiose específica, isto é, a actinobactéria *Streptomyces* TD049 isolada do mesmo ninho do *Escovopsis* SES005 (Tabelas 1 e 2), inibiu totalmente todos os outros *Escovopsis* testados e, não especificamente esta linhagem do parasita.

Segundo a análise estatística, foi ainda encontrada diferença significativa na interação entre os *Escovopsis* e actinobactérias testados ($F = 2,1723$; $p = 0,0002$; Tabela 3), indicando que o crescimento das linhagens de *Escovopsis* nos testes dependeu da linhagem de actinobactéria com que o fungo foi desafiado. Isto pode ser facilmente visualizado nas tabelas 4 e 5.

Devido ao fato de ser um parasita específico dos jardins de fungos das formigas da tribo Attini, *Escovopsis* surge como um possível agente de controle biológico destes insetos (FOLGARAIT et al. 2011). Contudo, antes que tal propriedade possa ser explorada de modo prático e com sucesso, muitas outras barreiras naturais precisam ser contornadas, pois as formigas são dotadas de várias e bem sucedidas estratégias de sobrevivência. É também necessário um maior entendimento sobre as relações ecológicas entre os micro-organismos presentes nos ninhos, incluindo o real papel das actinobactérias na defesa destes. Assim, este

trabalho acrescentou dados importantes sobre a interação entre estes micro-organismos à literatura; porém, são necessários estudos adicionais para testar as novas hipóteses que vêm sendo propostas para essa complexa relação.

Tabela 5. Diferenças estatísticas significativas encontradas no Teste de Bonferroni entre cada uma das actinobactérias com base no valor normalizado de crescimento dos *Escovopsis*

Actinobactérias	**Linhagens com as quais apresentaram diferenças estatísticas**	**Valor normalizado***
***Pseudonocardia* sp.**		
TD001[1]	TD031 (p = 0,0364) e TD049 (p = 0,00)	0.4113
TD002[1]	TD031 (p = 0,0385) e TD049 (p = 0,00)	0.4122
TD003	TD031 (p = 0,0058) e TD049 (p = 0,00)	0.3839
TD004[2]	TD031 (p = 0,0162) e TD049 (p = 0,00)	0.399
TD006[3]	TD049 (p = 0,00)	0.5238
TD007[3]	TD031 (p = 0,0077) e TD049 (p = 0,00)	0.3881
TD008[2]	TD031 (p = 0,0087) e TD049 (p = 0,00)	0.3898
TD009	TD049 (p = 0,00)	0.4465
TD010	TD049 (p = 0,00)	0.4466
TD012	TD049 (p = 0,00)	0.4903
TD014	TD049 (p = 0,00)	0.4814
TD031[4]	TD001; TD002; TD003; TD004; TD007; TD008; TD028 e TD049 (valores de "p" indicados acima).	0.6175
***Actinoplanes* sp.**		
TD028[4]	TD031 (p = 0,0298) e TD049 (p = 0,00)	0.4082
***Streptomyces* sp.**		
TD049	Apresentou diferença estatística frente a todas as outras (p = 0,00)	0.009

* médias dos valores de crescimento normalizados dos quatro *Escovopsis*. Os valores separados de cada *Escovopsis* estão representados na tabela 4.
[1,2,3 e 4] indicam linhagens isoladas do mesmo ninho

6 CONCLUSÃO

O estudo do microbioma associado aos ninhos de formigas Attini intensificou-se nos últimos doze anos. Está relativamente claro que essas formigas mantêm uma relação restrita com seu fungo mutualista. Já, o fungo *Escovopsis*, mantém uma relação íntima de parasitismo com o fungo das formigas. Porém, quando são analisados dados sobre como as actinobactérias são adquiridas e sua real função, estes se apresentam controversos. Diferentes visões foram elaboradas a respeito do papel das actinobactérias encontradas no integumento desses insetos. O presente trabalho mostrou que a ação das actinobactérias não se restringe ao fungo *Escovopsis* relacionado ao gênero de formiga do qual a bactéria foi isolada. Tal resultado é uma evidência de ausência de especificidade na capacidade de ação destas bactérias contra o parasita. Adicionalmente, corroboramos dados da literatura que mostram que outras actinobactérias podem ser mais efetivas que as *Pseudonocardia* na ação contra *Escovopsis*. Os dados apontam a teoria da simbiose aberta entre actinobactérias e formigas Attini, como a que melhor se encaixa para o gênero *Trachymyrmex*, indicando que esta simbiose é uma relação não específica.

PERSPECTIVAS

Ao propor novas hipóteses sobre o real papel das actinobactérias encontradas nos biofilmes presentes no integumento das formigas da tribo Attini, Mueller (2012) abriu novas janelas de pesquisa. Estas buscarão entender melhor o porquê desses micro-organismos estarem associados a esses insetos. O novo contexto argumentado pelo autor sugere que micro-organismos presentes no integumento da formiga auxiliam na defesa do inseto, ao invés de auxiliar na defesa do jardim de fungos; no entanto, isso necessita ser testado experimentalmente. O autor levanta no trabalho perguntas interessantes, dentre elas destacam-se: (i) seriam os micro-organismos presentes no integumento responsáveis pela defesa do inseto contra as suas próprias doenças (fungos entomopatogênicos e endoparasitas)? (ii) seriam os micro-organismos encontrados nos jardins aqueles responsáveis por controlar patógenos deste local (como o próprio *Escovopsis*, ou ainda o fungo *Syncephalastrum* ou fungos endofíticos invasores do jardim)? Certamente, a tendência das pesquisas sobre os micro-organismos associados às formigas Attini tentarão responder essas perguntas.

Os resultados do presente trabalho corroboram, em partes, essa tendência, pois demonstramos a existência de uma baixa especificidade na interação *Pseudonocardia-Escovopsis*. Trabalhos futuros deverão testar linhagens de *Pseudonocardia* isoladas do jardim de fungos frente ao fungo parasita do gênero *Escovopsis*.

.

REFERÊNCIAS

ABRAMOFF, M. D.; MAGALHÃES, P. J.; RAM, S. J. Image Processing with ImageJ. **Biophotonics International**, South Molton, v. 11, n. 7, p. 36-42, 2004.

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

BRANDÃO, C. R. F.; MAYHÉ-NUNES, A. J. A phylogenetic hypothesis for the *Trachymyrmex* species groups, and the transition from fungus-growing to leaf-cutting in the Attini. In SNELLING, R. R.; FISHER, B. L.; WARD, P. S. (eds). **Advances in ant systematics (Hymenoptera: Formicidae): homage to E. O. Wilson – 50 years of contributions.** Gainesville: American Entomological Institute, 2007. p. 72-88.

BRANDÃO, C. R. F.; MAYHÉ-NUNES, A. J.; SANHUDO, C. E. D. Taxonomia e filogenia das formigas cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. **Formigas Cortadeiras**: da Biotecnologia ao Manejo. 1ª edição. Viçosa: Ed. UFV, 2011. p. 27-48.

CAFARO, M. J.; POULSEN, M.; LITTLE, A. E. F.; PRICE, S. L.; GERARDO, N. M.; WONG, B. STUART, A. E.; LARGET, B.; ABBOT, P.; CURRIE, C. R. Specificity in the symbiotic association between fungus-growing ants and protective *Pseudonocardia* bacteria. **Proceedings of The Royal Society B-Biological Sciences**, London, v. 278, n. 1713, p. 1814-1822, 2011.

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

CRAVEN S. E.; DIX, M. W.; MICHAELIS, G. E. Attini fungus garden contain yeasts. **Science**, Washington, v. 169, n. 3941, p. 184-189, 1970.

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

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

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

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

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

CURRIE, C. R.; WONG, B.; STUART, A. E.; SCHULTZ, T. R.; REHNER, S. A.; MUELLER, U. G.; SUNG, Gi-Ho; SPATAFORA, J. W.; STRAUS, N. A. Ancient tripartite coevolution in the Attine ant-microbe symbiosis. **Science**, Washington, v. 299, n. 5605, p. 386-388, 2003a.

CURRIE, C. R.; SCOTT, J. A.; SUMMERBELL, R. C.; MALLOCH, D. Corrigendum: Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. **Nature**, London, v. 423, n. 6938, p. 461, 2003b.

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

CURRIE, C. R.; POULSEN, M.; MENDENHALL, J. BOOMSMA, J. J.; BILLEN, J. Coevolved crypts and exocrine glands support mutualistic bacteria in fungus-growing ants. **Science,** Washington, v. 311, n. 81, p. 81-83, 2006.

FOLGARAIT, P.; GOROSITO, N.; POULSEN, M.; CURRIE, C. R. Preliminary in vitro insights into the use of natural fungal pathogens of leaf-cutting ants as biocontrol agents. **Current Microbiology**, New York, v. 63, n. 3, p. 250-258, 2011.

GERARDO, N. M.; JACOBS, S. R.; CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G. Ancient host-pathogen associations maintained by specificity of chemotaxis and antibiosis. **PLoS Biology**, California, v. 4, n. 8, e 235, 2006.

HAEDER, S.; WIRTH, R.; HERZ, H.; SPITELLER, D. 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,** Washington, v. 106, n. 12, p. 4742-4746, 2009.

ISHAK, H. D.; MILLER, J. L.; SEN, R.; DOWD, S. E.; MEYER, E.; MUELLER, U. G. Microbiomes of ant castes implicate new microbial roles in the fungus-growing ant *Trachymyrmex septentrionalis*. **Scientific Reports,** London, v. 1, 2011 (doi:10.1038/srep00204).

KLINGENBERG, C.; BRANDÃO, C.R.F. Revision of the fungus-growing ant genera *Mycetophylax* Emery and *Paramycetophylax* Kusnezov rev. stat., and description of *Kalathomyrmex* n. gen. (Formicidae: Myrmicinae: Attini). **Zootaxa**, Auckland, v. 2052, n. 3, p. 1-31, 2009.

KOST, C.; LAKATOS, T.; BÖTTCHER, I.; ARENDHOLZ, W-R.; REDENBACH, M.; WIRTH, R. Non-specific association between filamentous bacteria and fungus-growing ants. **Naturwissenschaften,** New York, v. 94, n. 10, p. 821-828, 2007.

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

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**, London, v. 8, n. 3, p. 461-464, 2012.

MEIRELLES, L. A.; PAGNOCCA, F. C.; RODRIGUES, A. Caracterização morfológica de *Escovopsis* sp.: fungo parasita associados ao ninhos das formigas cortadeiras. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNESP, 22., 2010, Marília. **Publicação dos trabalhos apresentados.** Disponível em: <http://prope.unesp.br/xxii_cic/trabalhos_fase2.php>. Acesso em: 12/08/2012.

MENDES, T. D.; **Atividade antimicrobiana de actinobactérias isoladas de formigas attini (hymenoptera: formicidae)**. 2010. 47 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.

MENDES, T. D.; RODRIGUES, A.; DAYO-OWOYEMI, I.; MARSON, F. A. L.; PAGNOCCA, F. C. Generation of Nutrients and Detoxification: Possible Roles of Yeasts in Leaf-Cutting Ant Nests. **Insects**, Basel, v. 3, n. 1, p. 228-245, 2012.

MUELLER, U. G.; SCHULTZ, T. R.; CURRIE, C. R.; ADAMS, R. M. M.; MALLOCH, D. The origin of the attine ant-fungus mutualism. **Quartely Review of Biology**, Chicago, v. 76, n. 2, p. 169-197, 2001.

MUELLER, U. G.; DASH, D.; RABELING, C.; RODRIGUES, A. Coevolution between attine ants and actinomycete bacteria: a reevaluation. **Evolution,** Lawrence, v. 62, n. 11, p. 2894-2912, 2008.

MUELLER, U. G. Symbiont recruitment versus ant-symbiont co-evolution in the attine ant–microbe symbiosis. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 15, n. 3, p. 269-277, 2012.

OH, D. C.; POULSEN, M.; CURRIE, C. R.; CLARDY, J. Dentigerumycin: a bacterial mediator of an ant-fungus symbiosis. **Nature Chemical Biology,** London, v. 5, n. 6, p. 391-393, 2009.

POULSEN, M.; ERHARDT, D. P.; MOLINARO, D. J.; LIN, T. L.; CURRIE, C. R. Antagonistic bacterial interactions helps shape host-symbiont dynamics within fungus-growing ant-microbe mutualism. **PLoS One**, California, v. 2, n. 9, e960, 2007 (doi:10.1371/journal.pone.0000960).

POULSEN, M.; CAFARO, M. J.; ERHARDT, D. P.; LITTLE, A. E. F.; GERARDO, N. M.; TEBBETS, B.; KLEIN, B. S.; CURRIE, C. R. Variation in *Pseudonocardia* antibiotic defence helps govern parasite-induced morbidity in Acromyrmex leaf-cutting ants. **Environmental Microbiology Reports**, Oxford, v. 2, n. 4, p. 534-540, 2010.

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**, New York, v. 96, n. 5, 955-959, 2004.

RIBEIRO, S. B. **Caracterização de espécies bacterianas encontradas em ninhos de Atta sexdens L. e isolamento de *Streptomyces* de formigas da tribo Attini**. 2000. 132 f. Tese

(Doutorado em Microbiologia Aplicada), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2000.

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

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

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

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

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

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,** Oxford, v. 20, n. 4, p. 337-370, 1995.

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**, Washington, v. 105, n. 14, p. 5435-54401, 2008.

SOLOMON, S. E.; BACCI, M. Jr.; MARTINS, J. Jr.; VINHA, G. G.; MUELLER, U. G. Paleodistributions and comparative molecular phylogeography of leaf-cutter ants (*Atta* sp.) provide new insight into the origins of amazonian diversity. **PLoS One**, California, v. 3, n.7, e. 2738, 2008. (doi:10.1371/journal.pone.0002738).

TAERUM, S. J.; CAFARO, M. J.; LITTLE, A. E. F.; SCHULTZ, T. R.; CURRIE, C. R. Low host-pathogen specificity in the leaf-cutting ant-microbe symbiosis. **Proceedings of The Royal Society B-Biological Sciences**, Inglaterra, v. 274, n. 1621, p. 1971-1978, 2007.

TAERUM, S. J.; CAFARO, M. J.; CURRIE, C. R. Presence of multiparasite infections within individual colonies of leaf-cutter ants. **Environmental Entomology**. College Park, v. 39, n. 1, p. 105-113, 2010.

WEBER, N. A. Fungus-growing ants. **Science**, Washington, v. 153, n. 3763, p. 587-604, 1966.

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

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

_____

Lucas Andrade Meirelles – Aluno

_____

Prof. Dr. André Rodrigues – Orientador

_____

Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca – Co-orientador