

***Streptomyces* ASSOCIADOS A FORMIGAS DA
TRIBO ATTINI E SEUS EFEITOS SOBRE OS
FUNGOS *Escovopsis weberi* E OUTROS
MICROORGANISMOS**

ETIENNE CRISTINA FAVARIN

Orientador: Prof. Dr. Maurício Bacci Junior

Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Carlos

Pagnocca

**Trabalho apresentado ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade Estadual Paulista
"Julio de Mesquita Filho", Campus de Rio
Claro, para obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas (Área de Concentração:
Microbiologia Aplicada)**

**Rio Claro
Estado de São Paulo, Brasil
Outubro de 2005**

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	vii
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	3
1- INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	5
1.1- As formigas cortadeiras.....	6
1.2- A simbiose entre as formigas Attini e seu fungo.....	7
1.3- A relação entre os actinomicetos, as Attini e os fungos contaminantes.....	9
1.4- Os actinomicetos.....	11
1.5- Outros microrganismos associados aos ninhos das Attini.....	14
2- OBJETIVOS.....	16
3- MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1- Isolamento dos <i>Streptomyces</i>	17
3.2- Isolamento dos fungos <i>Escovopsis weberi</i>	18
3.3- Padronização da concentração de conídios para os ensaios de inibição da germinação dos fungos <i>Escovopsis weberi</i>	19
3.4- Obtenção dos filtrados de <i>Streptomyces</i> e determinação da sua atividade sobre os fungos <i>Escovopsis weberii</i> e microrganismos padrão.....	19
3.5- Análise estatística	21
3.6- Identificação das linhagens de <i>Streptomyces</i> através de técnicas moleculares.....	22
4- RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	24
4.1- Ensaio de antibiose.....	25
4.2- Identificação das linhagens através de técnicas moleculares.....	39
5- CONCLUSÕES.....	50

LISTA DE FIGURAS

	Página
<p>Figura 1: Efeito da adição dos filtrados de <i>Streptomyces</i> a 10 % sobre a germinação dos conídios de <i>Escovopsis weberi</i>. Germinação dos conídios nos controles: 100 %. Linhagens de <i>Streptomyces</i>: 1- Cy 103-2.1, 2- Mp 123-3, 3- Mp 123-4, 4- Mt 110-1, 5- Mt 110-2, 6- Ap 103-1, 7- Ap 105-2, 8- Trach 107-2.1, 9- Ac 116-4.2. Linhagens de <i>Escovopsis weberi</i>: A 029, A 031, A 055 e A 086a.....</p>	25
<p>Figura 2: Efeito da adição dos filtrados de <i>Streptomyces</i> a 20 % sobre a germinação dos conídios de <i>Escovopsis weberi</i>. Germinação dos conídios nos controles: 100 %. Linhagens de <i>Streptomyces</i>: 1- Cy 103-2.1, 2- Mp 123-3, 3- Mp 123-4, 4- Mt 110-1, 5- Mt 110-2, 6- Ap 103-1, 7- Ap 105-2, 8- Trach 107-2.1, 9- Ac 116-4.2. Linhagens de <i>Escovopsis weberi</i>: A 029, A 031, A 055 e A 086a.....</p>	26
<p>Figura 3: Efeito da adição dos filtrados de <i>Streptomyces</i> a 30 % sobre a germinação dos conídios de <i>Escovopsis weberi</i>. Germinação dos conídios nos controles: 100%. Linhagens de <i>Streptomyces</i>: 1- Cy 103-2.1, 2- Mp 123-3, 3- Mp 123-4, 4- Mt 110-1, 5- Mt 110-2, 6- Ap 103-1, 7- Ap 105-2, 8- Trach 107-2.1, 9- Ac 116-4.2. Linhagens de <i>Escovopsis weberi</i>: A 029, A 031, A 055 e A 086a.....</p>	27
<p>Figura 4: Efeito da adição dos filtrados de <i>Streptomyces</i> a 40 %</p>	

	sobre a germinação dos conídios de <i>Escovopsis weberi</i> . Germinação dos conídios nos controles: 100%. Linhagens de <i>Streptomyces</i> : 1- Cy 103-2.1, 2- Mp 123-3, 3- Mp 123-4, 4- Mt 110-1, 5- Mt 110-2, 6- Ap 103-1, 7- Ap 105-2, 8- Trach 107-2.1, 9- Ac 116-4.2. Linhagens de <i>Escovopsis weberi</i> : A 029, A 031, A 055 e A 086a.....	28
Figura 5:	Efeito da adição dos filtrados de <i>Streptomyces</i> a 50 % sobre a germinação dos conídios de <i>Escovopsis weberi</i> . Germinação dos conídios nos controles: 100%. Linhagens de <i>Streptomyces</i> : 1- Cy 103-2.1, 2- Mp 123-3, 3- Mp 123-4, 4- Mt 110-1, 5- Mt 110-2, 6- Ap 103-1, 7- Ap 105-2, 8- Trach 107-2.1, 9- Ac 116-4.2. Linhagens de <i>Escovopsis weberi</i> : A 029, A 031, A 055 e A 086a.....	29
Figura 6:	Efeito da adição do filtrado de <i>Streptomyces</i> a 30 % sobre a germinação do fungo <i>Escovopsis weberii</i> (linhagem A 031). A: Ac 116-4.2; B: Mp 123-4; C: Trach 107-2.1; D: Ap 105-2. Placas à esquerda: controle.....	33
Figura 7:	Halos de inibição dos filtrados de <i>Streptomyces</i> testados frente a bactérias Gram positivas e negativas. A: <i>Bacillus subtilis</i> ; B: <i>Escherichia coli</i> ; C: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; D: <i>Staphylococcus aureus</i> . Placa à esquerda: acima, Tetraciclina; no sentido horário: Trach 107-2.1, Mt 110-1, Mp 123-3, no centro Ac 116-4.2. Placa à direita: acima, Mt 110-2; no sentido horário: Mp 123-4, Ap 105-2, Ap 103-1, no centro Cy 103-2.1.....	37
Figura 8:	Halos de inibição dos filtrados de <i>Streptomyces</i> testados frente a leveduras. A: <i>Candida albicans</i> ; B: <i>Cryptococcus laurentii</i> ; C: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; D: <i>Trichosporon cutaneum</i> . Placa à esquerda: acima, Nistatina; no sentido horário: Trach 107-2.1, Mt 110-1, Mp 123-3, no centro Ac	

	116-4.2. Placa à direita: acima, Mt 110-2; no sentido horário: Mp 123-4, Ap 105-2, Ap 103-1, no centro Cy 103-2.1.....	38
Figura 9:	Perfil eletroforético em gel de agarose da amplificação da região 16S: L. Ladder 1,0 kb; 1. Ac 116-4.2; 2. Trach 107-2.1; 3. Mt 110-2; 4. Ap 105-2; 5. Mp 123-4; 6. Cy 103-2.1.....	40
Figura 10:	Perfil eletroforético em gel de agarose de plasmídeos extraídos após clonagem: 1. pGem; 2 e 3. Mt 110-1; 4 e 5. Mt 110-2; 6 e 7. Ac 116-4.2; 8 e 9. Cy 103-2.1; 10 e 11. Mp 123-3; 12 e 13. Mp 123-4; 14 e 15. Ap 105-2; 16 e 17 Ap 103-1; 18 e 19 Trach 107-2.1.....	40
Figura 11:	Alinhamento de 1 a 290 de 1007 bases da região 16S rDNA entre as seqüências das linhagens isoladas de formigas Attini e outras depositadas no GenBank.....	43
Figura 12:	Árvore consenso entre as 12 árvores mais parcimoniosas com 118 caracteres informativos para parcimônia, obtida pelo método de parcimônia utilizando o algoritmo heurístico TBR (SWOFFORD, 1996) implementado pelo programa PAUP* (SWOFFORD, 2000) e a partir de 1007 nucleotídeos previamente alinhados pelo programa ClustalW (THOMPSON et al., 1994), pertencentes à região 16S de 21 actinomicetos. Os números sobre os ramos representam valores de “bootstrap” (FELSENSTEIN, 1985), obtidos a partir de 100 réplicas, que não são mostrados se inferiores a 50%.....	44
Figura 13:	Alinhamento de 1 a 300 de 1142 bases da região 16S rDNA entre as seqüências das linhagens isoladas de formigas Attini e outras depositadas no GenBank.....	46
Figura 14:	Árvore consenso entre as 32 árvores mais parcimoniosas com 167 caracteres informativos para parcimônia, obtida	

pelo método de parcimônia utilizando o algoritmo heurístico TBR (SWOFFORD, 1996) implementado pelo programa PAUP* (SWOFFORD, 2000) e a partir de 1142 nucleotídeos previamente alinhados pelo programa ClustalW (THOMPSON et al., 1994), pertencentes à região 16S de 31 actinomicetos. Os números sobre os ramos representam valores de “bootstrap” (FELSENSTEIN, 1985), obtidos a partir de 100 réplicas, que não são mostrados se inferiores a 50%..... 47

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Distribuição do número de antibióticos produzidos por actinomicetos.....	12
Tabela 2: <i>Streptomyces</i> isolados de formigas da tribo Attini.....	17
Tabela 3: Linhagens do fungo <i>Escovopsis weberi</i>	18
Tabela 4: Culturas padrões de leveduras e bactérias e respectivos códigos.....	21
Tabela 5: Análise de variância fatorial da porcentagem de germinação do fungo <i>Escovopsis weberi</i> frente a diferentes concentrações de filtrados obtidos de linhagens de <i>Streptomyces</i>	30
Tabela 6: Teste de comparações múltiplas de Tukey para concentrações dos filtrados.....	31
Tabela 7: Teste de comparações múltiplas de Tukey para os fungos <i>Escovopsis weberi</i>	31
Tabela 8: Diâmetro dos halos de inibição (em mm) das bactérias Gram-positivas e negativas na presença dos filtrados de	

	<i>Streptomyces</i>	34
Tabela 9:	Diâmetro dos halos de inibição (em mm) das leveduras na presença dos filtrados de <i>Streptomyces</i>	35

RESUMO

A simbiose entre as formigas cortadeiras e seu fungo originou-se a aproximadamente 50 milhões de anos. A diversidade biótica dos formigueiros, no entanto, não se restringe apenas à formiga e ao fungo simbiote. Recentemente foi descoberto um terceiro mutualista, uma bactéria filamentosa do grupo dos actinomicetos, cuja principal função seria a inibição do crescimento de parasitas do jardim de fungos, especialmente o fungo conhecido como *Escovopsis* sp, através da produção de antibióticos.

O presente trabalho teve como objetivos verificar o potencial das linhagens de *Streptomyces*, que foram isoladas de Attini, como produtoras de substâncias antimicrobianas frente aos fungos *Escovopsis weberi* e outros microrganismos e também a caracterização dessas linhagens através de técnicas de biologia molecular. Foram selecionadas nove linhagens de *Streptomyces*, que foram cultivadas em meio SCN líquido, para a obtenção dos filtrados.

Para os ensaios de antibiose envolvendo os fungos *Escovopsis weberi*, foram testadas diferentes concentrações de filtrados adicionadas ao meio A sólido e foi verificada a porcentagem de germinação dos conídios em cada concentração. Para a determinar a atividade dos filtrados frente as bactérias e leveduras, os testes foram realizados pelo método de difusão em agar.

Os resultados mostraram que, mesmo variando os filtrados obtidos das linhagens de *Streptomyces*, a inibição da germinação dos conídios foram muito semelhantes, e todas as linhagens do fungo *Escovopsis weberi* apresentaram uma inibição homogênea frente a mesma concentração de filtrado. Com relação as bactérias e leveduras, os resultados mostraram que houve diferenças na intensidade da resposta. Algumas linhagens inibiram o crescimento de todas as bactérias e leveduras testadas, outras não inibiram

apenas algumas culturas e teve linhagens que não inibiram nenhuma das culturas testadas.

O seqüenciamento da região 16S rDNA mostraram que as linhagens se aproximaram bastante das espécies de *Streptomyces* existentes no GenBank. Através da análise filogenética, foi possível verificar que apesar de existir a formação de grupos distintos, a resposta em relação à inibição da germinação dos fungos *Escovopsis weberi* foi muito forte e homogênea. Com essa informação, pode-se dizer que existem diferentes espécies de *Streptomyces*, isoladas de diferentes gêneros de formigas, apresentando o mesmo potencial inibitório frente aos fungos *Escovopsis weberi*.

ABSTRACT

The symbiotic relationship between leaf-cutting ants (Tribe Attini) and their mutualistic fungus probably arose fifty million years ago. However, these two organisms are at least, part of the biological diversity found in nests of these insects. Recently, it was discovered a third mutualist, an antibiotic-producing actinomycete, which is used by the ants to control the development of garden parasites, specially within the microfungus genus *Escovopsis* sp.

In order to determine which isolates of this actinomycete could affect the growth of *Escovopsis weberi* and other microorganisms; nine strains of *Streptomyces* sp. were grown in liquid SCN and the resultant media (extract) were filtered and used in the experiments. Also, all actinomycete strains were characterized by molecular sequencing of the 16 rDNA region.

In the assays involving *E. weberi*, different extract amounts were added into solid medium (Meio A) and the conidial germination rate were determined after incubation. Disk-difusion method were used to verify the antimicrobial activity of these extracts over a large range of bacteria and yeasts.

In spite of the concentration used in *E. weberi* assays, inhibition of spore germination was achieved and this response was similar among *E. weberi* isolates. On the other hand, bacteria and yeasts demonstrated a high degree variability in this response. Some *Streptomyces* sp. strains inhibited all bacteria and yeasts tested, but other just inhibited a few of them.

The molecular sequencing of the 16S rDNA region have shown that all actinomycete strains used in this work were grouped with other *Streptomyces* species found in GenBank. In spite of phylogenetic analyses have grouped Attini isolates in different clades, the activity of the antimicrobial compounds produced by these bacteria had a high degree of homogeneity over *E. weberi*. In conclusion, it can be noted that there are different species

of *Streptomyces* within Attini genera showing the same inhibitory potential towards the microfungus *E. weberi*.

1– INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

Os insetos sociais, tais como as formigas, são de interesse particular para o entendimento de relações mutualísticas e parasitas, porque desenvolveram numerosas interações com espécies diferentes em vários níveis (BOURSAUX-EUDE; GROSS, 2000). O mutualismo entre insetos e microrganismos é, sem dúvida, um dos aceleradores da evolução dos insetos e representa uma das chaves para o enorme sucesso deste grande número de animais (BOURSAUX-EUDE; GROSS, 2000).

Algumas linhagens de insetos, entre elas, formigas, cupins e besouros, desenvolveram o hábito de cultivar fungos para a alimentação. Dentre estes insetos, destacam-se as formigas da tribo Attini, que tornaram-se dependentes do cultivo de fungos como fonte de alimento (MUELLER; GERARDO, 2002).

A associação entre as formigas e seu fungo simbiote está presente na natureza a mais de 50 milhões de anos (MUELLER et al., 2001) e desde esta descoberta soube-se que a interdependência entre os dois organismos era muito forte (WEBER, 1966; QUINLAN; CHERRETT, 1979).

A diversidade biótica dos formigueiros, no entanto, não se restringe apenas à formiga e ao fungo simbiote. Recentemente foi descoberto um terceiro mutualista, uma bactéria filamentosa do grupo dos actinomicetos que estão presentes na cutícula das formigas (CURRIE et al., 1999b). Segundo estes autores, este novo parceiro, através da produção de antibióticos, inibe o crescimento de parasitas do jardim de fungos, especialmente o fungo conhecido como *Escovopsis* sp, auxiliando na manutenção da monocultura fúngica. Bactérias, leveduras e fungos filamentosos também foram encontradas em ninhos de várias espécies de formigas cortadeiras (CRAVEN et al., 1970; BACCI-JR et al., 1995; PAGNOCCA et al., 1996a; FISHER et al., 1996; CARREIRO et al., 1997; CARREIRO et al 2002; RODRIGUES, 2004).

1.1– As formigas cortadeiras

Há aproximadamente 50 milhões de anos, uma solitária espécie de formiga abandonou o seu primitivo hábito de caçadora-coletora (eram originalmente predadoras de insetos, de outros artrópodes e de pequenos animais) e, em um evento extraordinário da sua evolução, adotou um estilo de vida agrário (SCHULTZ, 1999).

Estas formigas pertencem à tribo Attini (Formicidae: Myrmicinae), a qual é constituída por 13 gêneros e pouco mais de 200 espécies (SCHULTZ; MEIER, 1995; BRANDÃO; MAYHÉ-NUNES, 2001), que são obrigatoriamente dependentes da fungicultura para a sua alimentação (CURRIE et al., 1999a; WEBER, 1972). Ocorrem exclusivamente no continente Americano, com distribuição que se estende desde 40° de latitude Norte a 44° de latitude Sul (WEBER, 1966; AUTUORI, 1949).

Weber (1982) classificou a tribo Attini em: primitivas, que compreendem os gêneros *Myrmicocrypta*, *Apterostigma*, *Mycocepurus*, *Mycetarotes*, *Mycetophylax*, *Mycetosoritis* e *Chyphomyrmex*; intermediárias, compostas pelos gêneros *Trachymyrmex* e *Sericomyrmex*; e derivadas, compreendendo os gêneros *Acromyrmex*, *Pseudoatta* e *Atta*. As formigas cultivadoras de fungos são também classificadas em dois grandes grupos filogenéticos (Attini basais e Attini derivadas) definidos através do seqüenciamento do DNA mitocondrial e a morfologia das larvas (SCHULTZ; MEIER, 1995; WETTERER et al. 1998). A maioria dos gêneros encontra-se no primeiro grupo, enquanto que os gêneros *Trachymyrmex*, *Sericomyrmex* e os gêneros de formigas cortadeiras *Atta* e *Acromyrmex* estão classificados no segundo.

Os gêneros *Atta* e *Acromyrmex* são considerados os herbívoros dominantes do Neotrópico (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990), porque cortam e carregam folhas e flores frescas para dentro de seu ninho, onde iram cultivar o fungo simbiote. No Brasil, a espécie que causa mais danos é a *Atta sexdens*, conhecida popularmente como saúva-limão (DELLA LUCIA et al., 1993).

1.2– A simbiose entre as formigas Attini e seu fungo

As formigas atingiram seu ápice evolutivo quando começaram a cultivar seu próprio alimento, um fungo comestível (WEBER, 1966). A associação entre formigas e fungos está presente na natureza há mais de 50 milhões de anos (MUELLER et al., 2001). Desde então, soube-se que a prática do cultivo de jardins de fungos pelas formigas Attini resultou em associações complexas entre as formigas e seu fungo simbiote (CURRIE et al, 1999a). Eles estabeleceram entre si uma interdependência muito forte, sem que um possa sobreviver sem o outro (WEBER, 1966; QUINLAN; CHERRETT, 1979).

Uma das associações entre formigas e fungo é a dependência nutricional, as formigas fornecem substrato para o desenvolvimento do fungo e este fornece o alimento para as larvas e as adultas. As formigas também exercem o papel de proteção dos ninhos, mantendo o interior das colônias livres de microrganismos parasitas e competidores, permitindo, assim, o desenvolvimento do fungo simbiote (QUINLAN; CHERRETT, 1979).

Segundo CURRIE et al. (1999a), dentro da tribo Attini, dois gêneros de formigas cortadoras de folhas, *Atta* e *Acromyrmex*, apresentam um sistema de fungicultura mais complexo, pois estão entre as únicas dentro do reino animal com capacidade de converter grandes quantidades de vegetação fresca em jardim de fungo (WEBER, 1972).

O fungo simbiote é cultivado pelas formigas no interior de câmaras subterrâneas, tendo como substrato fragmentos de folhas e flores frescas, como é o caso das Attini dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*. Os demais gêneros cultivam o fungo sobre fezes de animais, carcaças de insetos e material vegetal em decomposição (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990).

O fungo simbiote produz na extremidade de suas hifas estruturas denominadas gongilídeos, que apresentam a forma de uma bolsa contendo os nutrientes que são oferecidos às larvas e, possivelmente, às operárias para a alimentação (WEBER, 1972).

A grande maioria dos fungos cultivados pelas formigas da tribo Attini pertence ao gênero *Leucocoprinus* e *Leucoagaricus* (família: Lepiotaceae), com exceção dos cultivados pelas formigas do gênero *Apterostigma*, que pertencem a família Tricholomataceae (CHAPELA et al., 1994). A caracterização taxonômica destes fungos é muito difícil, pois as estruturas de origem sexuada (basidiocarpos ou “corpos de frutificação”), utilizadas para a identificação, só aparecem raramente (MUELLER, 2002).

O fungo simbiote é usualmente propagado dos jardins já existentes para os que serão iniciados. Quando a rainha funda um novo ninho, carrega uma pequena porção do fungo retirado do ninho parental para iniciar seu novo jardim (SCHULTZ, 1999).

1.3– A relação entre os actinomicetos, as Attini e os fungos contaminantes

Até pouco tempo, acreditava-se que as relações mutualísticas dentro do formigueiro envolviam apenas dois membros: a formiga e o seu fungo simbiote. Entretanto, esta relação é muito mais complexa e a manutenção do jardim de fungo de forma saudável necessita de um terceiro parceiro,

recentemente descoberto: uma bactéria filamentosa do grupo dos actinomicetos presente no corpo das formigas (CURRIE et al, 1999b).

Em 1999 (b), Currie e seus colaboradores consideraram esta bactéria com um actinomiceto do gênero *Streptomyces*. Porém, após análises moleculares passou a ser agrupada juntamente com os actinomicetos da família Pseudonocardaceae (CURRIE et al. 2003a).

O actinomiceto foi encontrado em todos os gêneros da tribo Attini estudados por Currie et al. (1999b), desde os filogeneticamente mais basais, *Myrmicocrypta* e *Apterostigma*, até os mais derivados, *Atta* e *Acromyrmex*.

A bactéria filamentosa é considerada como um terceiro mutualista dentro da associação formiga-fungo simbiote (CURRIE et al, 1999b; POULSEN et al., 2003), sendo ainda difícil traçar os caminhos de como se originou essa associação (CURRIE, 2002).

Este novo parceiro, segundo CURRIE et al (1999b), auxiliaria na manutenção da monocultura fúngica, que é crítica para a sobrevivência dos ninhos, através da produção de antibióticos que atuam de maneira específica inibindo o crescimento de patógenos do jardim de fungos, especialmente do fungo *Escovopsis* sp.

A bactéria filamentosa atua como uma barreira, protegendo o formigueiro de microrganismos patógenos e pode estimular o crescimento do fungo simbiote e, em troca, as formigas dispersariam o actinomiceto, fornecendo algum tipo de alimento para o seu crescimento (CURRIE et al, 1999b).

O fungo filamentoso do gênero *Escovopsis* (Ascomicota: Hypocreales: Hypocreaceae) foi encontrado associado somente a ninhos das formigas da tribo Attini (CURRIE et al. 1999b; CURRIE et al. 2003b).

KREISEL (1972) descreveu um fungo isolado de ninhos de formigas cortadeiras *Atta insularis* em Cuba e o nomeou de *Phialocladus zsoldii*.

MUCHOVEJ e DELLA LUCIA (1990) alegaram que esta identificação era inválida e então o renomearam como *Escovopsis weberi*. Até o momento, apenas duas espécies desse fungo foram descritas: *Escovopsis weberii*, isolado de um ninho artificial de *Atta* sp (MUCHOVEJ e DELLA LUCIA 1990) e *Escovopsis aspergilloides*, isolado de um ninho de *Trchymyrmex ruthae* (SEIFERT et al. 1995).

O gênero *Escovopsis* tem como características morfológicas conídios subglobosos, vesículas cilíndricas a clavadas e colônias com micélio branco a princípio tornando-se pardo com mais de sete dias de crescimento (MUCHOVEJ e DELLA LUCIA, 1990). Apresenta-se de forma comum, prolífica e persistente nos jardins das formigas Attini, sendo transmitido horizontalmente entre as colônias – infecção espalhada entre colônias estabilizadas (CURRIE et al., 1999a).

Os fungos do gênero *Escovopsis* são considerados patógenos virulentos dos jardins de fungos das formigas Attini, pois sua ocorrência é freqüente nos ninhos, são encontrados, praticamente, em toda a filogenia das Attini e estão espalhados dentro de uma vasta área geográfica (CURRIE et al., 1999a), foram isolados da esponja fúngica e do lixo (BOT et al., 2001), ocasionam um impacto significativo na saúde e sobrevivência dos ninhos e podem devastar os ninhos que não estão sob o controle das operárias em um período de até 24 horas (CURRIE et al., 1999a).

Especula-se que os fungos *Escovopsis* sp podem competir com o fungo simbiote pelo substrato oferecido pelas formigas, embora acredita-se que o fungo parasita retira seus nutrientes do próprio fungo simbiote, atuando como um micoparasita (CURRIE, 2001).

A associação formiga-fungo simbiote-parasita-bactéria filamentosa é uma das mais complexas associações simbióticas já descritas na natureza (CURRIE et al. 2003).

1.4– Os actinomicetos

A ordem Actinomycetales se caracteriza por apresentar uma complexidade morfológica como a dos fungos imperfeitos, e por esta razão, já foram confundidos no passado, por apresentarem graus de ramificação verdadeiras. Constituem um grupo de microrganismos procariotos completamente únicos: apresentam uma diversidade considerável, desde formas bacilares até formas filamentosas ramificadas e são de grande importância quanto a produção de antibióticos (THEILLEUX, 2000).

Os actinomicetos estão bem distribuídos na natureza e podem ser divididos em dois grupos: os oxidativos, encontrados no solo, ambientes marinhos, água doce, alguns representantes termófilos e no ar, na forma de esporos e os fermentativos, representados pelos patógenos vegetais, animais e humanos (LECHEVALIER & LECHEVALIER, 1981; THEILLEUX, 2000). A maioria são estritamente saprófitos, porém alguns formam associações parasíticas ou mutualísticas com plantas e animais (GOODFELLOW & WILLIAMS, 1984).

Durante muitos anos, os actinomicetos foram identificados levando-se em conta apenas as suas características morfológicas, com o passar do tempo, a aplicação de novas técnicas bioquímicas, químicas, genéticas e moleculares foram responsáveis pela rápida mudança na identificação e classificação das bactérias dessa ordem (GOODFELLOW & CROSS, 1984).

As características morfológicas principais são a formação e desenvolvimento do micélio, juntamente com as suas estruturas de reprodução. Através das características químicas, esses microrganismos podem ser divididos em oito tipos, de acordo com os constituintes da parede celular (THEILLEUX, 2000). Recentemente foi adotada a identificação através do emprego de técnicas moleculares, como o estudo de genótipos e métodos

de seqüenciamento da região 16S rRNA (RINTALA, et al., 2001; MONCIARDINI, 2002; BENTLEY, 2002).

Os actinomicetos têm sido descritos como a grande fonte de antibióticos desde que Waksman introduziu os estreptomicetos no seu programa para descoberta de novos antibióticos, em 1940. Eles correspondem a aproximadamente de dois terços dos antibióticos naturais descobertos, incluindo muitos com importância para medicina, como os aminoglicosídeos, as antraciclinas, cloranfenicol, β -lactâmicos e tetraciclinas (OKAMI & HOTTA, 1988).

O gênero *Streptomyces* destaca-se dentre os vários gêneros de actinomicetos por ser o maior produtor de antibióticos (Tabela 1) e por apresentar representantes em todas as classes de antibióticos (MANFIO; LEMOS, 2002).

Tabela 1. Distribuição do número de antibióticos produzidos por actinomicetos (MANFIO; LEMOS, 2002).

Gêneros	Número de antibióticos (a)			
	1974	1980	1984	1988
<i>Streptomyces</i>	1934	2784	3477	4876
<i>Micromonospora</i>	41	129	296	398
<i>Nocardia</i>	45	74	107	262
<i>Actinomadura</i>	0	16	51	164
<i>Actinoplanes</i>	6	40	95	146
<i>Streptoverticillium (b)</i>	19	41	64	138
<i>Streptosporangium</i>	7	20	26	39
<i>Dactylosporangium</i>	0	4	19	31

<i>Microbispora</i>	4	6	6	10
<i>Saccharopolyspora</i>	(c)	4	33	44
<i>Actinosynnema</i>	-	-	5	14
<i>Streptoalloteichus</i>	-	3	4	12
<i>Kitasatosporia</i>	-	-	-	11
<i>Kibdelosporangium</i>	-	-	-	7

(a) Dados de Bérdy (1974, 1984 apud MANFIO & LEMOS, 2002), Nisbet (1982, apud MANFIO & LEMOS, 2002) e Bérdy database (1988 apud MANFIO & LEMOS, 2002).

(b) Os gêneros *Kitasatosporia* e *Streptovercillium* são atualmente considerados sinônimos de *Streptomyces*.

(c) Gêneros não existentes (descritos) até a data referida.

Os representantes do gênero *Streptomyces* têm uma grande importância industrial, graças a sua variada produção de metabólitos secundários, e respondem por cerca de 70% dos antibióticos conhecidos atualmente (PADILHA, 1998). Dentre estes antibióticos produzidos por espécies do gênero *Streptomyces* podemos citar: actinomicina (*S. antibioticus*), estreptotricina (*S. lavendulae*), estreptomina (*S. griseus*), neomicina (*S. fradiae*), cloranfenicol (*S. venezuelae*), tetraciclina (*S. aureofaciens*), eritromicina (*S. erythreus*), vancomicina (*S. orientalis*) e nistatina (*S. noursei*) (WAKSMAN, 1967).

Streptomyces é o principal gênero da família Streptomycetaceae, ordem Actinomycetales (LECHEVALIER; LECHEVALIER, 1981). Caracterizam-se por apresentarem micélio aéreo e micélio de substrato, com grandes cadeias de artrósporos ou conídios que podem se apresentar de forma reta, curva, curtos ou longos, em forma de gancho ou espiralada (SHIRLING & GOTTLIEB, 1966). As colônias são relativamente lisas na superfície, mas com o desenvolvimento elas se tornam exuberantes, com

aspecto de “flocos”, granulares e com textura aveludada, produzindo grande quantidade de pigmentos responsáveis pela coloração do micélio aéreo e vegetativo (CROSS, 1994). São aeróbios, Gram-positivos, possuem parede celular do tipo I (L-DAP e glicina), com alto conteúdo de C+G (cerca de 70%), produzem pigmentos muito variados, têm metabolismo oxidativo e sua temperatura ótima se estende de 25 a 35° C. (THEILLEX, 2000).

1.5– Outros microrganismos associados aos ninhos das Attini

A relação entre a formiga e o fungo simbiote é mais complexa do que se imaginava. Por muitos anos difundiu-se a idéia de que as operárias eram capazes de cultivar seu fungo simbiote livre do crescimento de outros microrganismos que poderiam se beneficiar das condições favoráveis no interior dos ninhos (WEBER, 1955). Além do actinomiceto e do fungo contaminante *Escovopsis* sp, outros microrganismos, tais como bactérias, fungos filamentosos e leveduras (BACCI et al. 1995; FISHER et al. 1996; CARREIRO et al. 1997) podem ser encontrados nos jardins de fungos desses insetos.

Em estudos recentes, duas novas espécies de leveduras associadas aos ninhos das formigas cortadeiras foram descritas: *Cryptococcus haglerorum* (MIDDELHOVEN et al. 2003) e *Sympodiomyces attinorum* (CARREIRO et al. 2004).

Foi isolada de ninhos de campo de *A. sexdens rubropilosa* a bactéria *Burkholderia* sp, produtora de metabólitos antifúngicos capazes de inibir a germinação de esporos de *Metarhizium anisopliae* e de *Escovopsis* sp (SANTOS et al. 2004), nos mostrando que os actinomicetos não são os únicos capazes de colaborar para manter o ninho livre de patógenos.

Em estudo recente, Rodrigues (2004) verificou que, após submeter ninhos da formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa* a tratamentos com inseticidas, vários fungos filamentosos não simbiotes se desenvolveram nos ninhos, a maior parte deles representantes de fungos comumente encontrados no solo e nas folhas. Dentre eles, duas espécies, *Trichoderma harzianum* e *Syncephalastrum racemosum*, destacaram-se por terem sido encontradas freqüentemente nos ninhos dessa formiga (RODRIGUES et al 2004).

2- OBJETIVOS

1. Verificar o potencial das linhagens de actinomicetos, isoladas de ninhos de formigas da tribo Attini, como produtoras de substâncias antimicrobianas sobre os fungos contaminantes do formigueiro (com ênfase para o gênero *Escovopsis*).

2. Verificar o potencial das linhagens como produtoras de substâncias antimicrobianas frente a culturas padrões de bactérias e leveduras.

3. Classificar e caracterizar as linhagens através do emprego de técnicas de biologia molecular.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Linhagens de *Streptomyces*

As linhagens de *Streptomyces* (Tabela 2) selecionadas para este trabalho foram isoladas e identificadas por Zabotto (2003) e pertencem à coleção do CEIS (Centro de Estudos de Insetos Sociais). A seleção destas linhagens foi baseada nos ensaios preliminares de antibiose realizados por Zabotto (2003). Estes isolados estão sendo mantidos em meio Caldo Nutriente com Glicerol a -80° C.

Tabela 2. *Streptomyces* isolados de formigas da tribo Attini

Código do Isolado	Espécie de formiga	Região do corpo utilizada para o isolamento	Localização dos ninhos
Trach 107-2.1	<i>Trachymyrmex</i> sp	Propleura	Rio Claro – SP
Mp 123-3	<i>Mycocepurus goeldii</i>	Corpo todo	Botucatu – SP
Mp 123-4	<i>Mycocepurus goeldii</i>	Corpo todo	Botucatu – SP
Cy 103-2.1	<i>Cyphomyrmex</i> sp	Propleura	Rio Claro – SP
Ac 116-4.2	<i>Acromyrmex</i> sp	Propleura	Rio Claro – SP
Mt 110-1	<i>Mycetarotis</i> sp	Corpo todo	Rio Claro – SP
Mt 110-2	<i>Mycetarotis</i> sp	Corpo todo	Rio Claro – SP
Ap 103-1	<i>Apterostigma</i> sp	Corpo todo	Rio Claro – SP
Ap 105-2	<i>Apterostigma</i> sp	Corpo todo	Rio Claro – SP

3.2– Linhagens dos fungos oportunistas

Durante os trabalhos com esse grupo de formigas nos últimos anos, algumas linhagens de fungos oportunistas (contaminantes) já foram isoladas e identificadas por Rodrigues (2004) e estão sendo mantidas no laboratório e pertencem à coleção do CEIS (Centro de Estudos de Insetos Sociais). Para este trabalho foram selecionadas quatro linhagens do fungo contaminante *Escovopsis weberi* (Tabela 3).

Tabela 3. Linhagens do fungo *Escovopsis weberi*

Código das Linhagens	Espécie de Formiga	Localização dos Ninhos
A 029	<i>Atta sexdens</i>	Corumbataí – SP
A 031	<i>Acromyrmex rugosus</i> <i>rugosus</i>	Caçador – SC
A 055	<i>Atta sexdens</i>	Corumbataí – SP
A 086a	<i>Atta sexdens</i>	Corumbataí – SP

3.3– Padronização da concentração de conídios para os ensaios de inibição da germinação dos fungos *Escovopsis weberi*

As linhagens dos fungos *Escovopsis weberi* foram cultivadas em meio A (PAGNOCCA et al, 1996): glicose (10,0 g), NaCl (5,0 g), peptona (5,0 g), extrato de malte (10,0 g), ágar (15,0 g), água destilada (1000 mL), pH 6,0-6,5, por um período de 7 dias a 25° C. Após o tempo de incubação, foi feita uma suspensão de conídios em solução salina 0,85 % esterilizada para o ajuste da concentração inicial (10^6 conídios.mL⁻¹), com o auxílio da câmara de Neubauer. Esta suspensão foi diluída até a concentração 10^{-2} conídios.mL⁻¹ e, em seguida, foi inoculado 100 µL desta concentração em placas de Petri contendo 20 mL de meio A, para determinar o número de conídios viáveis.

3.4– Obtenção dos filtrados de *Streptomyces* e determinação da sua atividade sobre os fungos *Escovopsis weberi* e microrganismos padrões

O cultivo em meio líquido de cada linhagem de *Streptomyces* foi realizado em erlenmeyers de 1000 mL, contendo 500 mL do meio de cultura Amido Caseína Nitrato – SCN líquido (KÜSTER e WILLIANS, 1964): amido (10,0 g), caseína livre de vitaminas (0,3 g), KNO₃ (2,0 g), NaCl (2,0 g), K₂HPO₄ (2,0 g), MgSO₄.7H₂O (50 mg), CaCO₃ (20 mg), FeSO₄.7H₂O (10 mg), pH 7,0 – 7,2.

Inicialmente, uma alçada de esporos de cada linhagem a ser testada foi inoculada em erlenmeyers de 100 mL contendo 50 mL de meio SCN líquido, e incubados durante 48 horas a 27° C sob agitação (180 rpm) – “pré-inóculo”. Após o período de incubação, foram inoculados 10 mL do “pré-inóculo” em erlenmeyers de 1000 mL contendo 500 mL de meio SCN líquido, e novamente foram cultivados durante 5 dias a 27° C sob agitação (180 rpm). O crescimento das culturas foi acompanhado através da leitura da densidade óptica (600 nm) com o auxílio de um espectrofotômetro.

Após este período de incubação, o caldo cultivado foi centrifugado a 10000 rpm por 15 minutos para a obtenção do sobrenadante, o qual passou pelo processo de filtração, utilizando membrana Millipore 0,22 µm.

A atividade antifúngica foi determinada através da adição de diferentes concentrações de filtrado (10, 20, 30, 40 e 50 %) ao meio A sólido concentrado, onde foram inoculados 100 µL da suspensão de conídios de cada linhagem dos fungos *Escovopsis weberi*, na concentração 10⁻² conídios. ml⁻¹.

As diluições foram feitas adicionando diferentes proporções de filtrado e de água destilada esterilizada ao meio A sólido concentrado, sendo o volume final 20 mL (Tabela 4).

Tabela 4. Concentrações dos filtrados de *Streptomyces* adicionados ao meio A sólido concentrado

	Meio A (mL)	H ₂ O destilada (mL)	Filtrado de <i>Streptomyces</i> (mL)	Meio SCN (mL)
10%	10	8	2	–
20%	10	6	4	–
30%	10	4	6	–
40%	10	2	8	–
50%	10	–	10	–
Controle Meio A	10	10	–	–
Controle Meio SCN	10	–	–	10

Para determinar a atividade dos filtrados frente as culturas padrões (Tabela 5), alíquotas de 10 µL desses filtrados foram aplicadas aos discos de papel de filtro, utilizando o método de difusão em ágar (BAUER et al., 1966):

A suspensão de microrganismos foi feita utilizando culturas recentes (24 horas para bactérias e 48 horas para leveduras) diluídas em solução salina 0,9 % e correspondendo à 0,5 unidades na escala de McFarland.

Com o auxílio de um “swab” estéril, a suspensão de microrganismos foi espalhada em placas de Petri contendo 15 mL de meio (ágar Miller-Hinton para bactérias e ágar Sabouraud para leveduras). Após 15 minutos, os discos foram distribuídos na superfície do ágar com pinça e levemente pressionados. As placas foram incubadas invertidas (37° C para bactérias e 25° C para leveduras).

Em cada placa foram colocados discos controles contendo 10 µL dos antibióticos: Tetraciclina 30 µg.mL⁻¹ para as bactérias e Nistatina 20 µg.mL⁻¹

para as leveduras. As leituras dos resultados foram realizadas após 24 horas para as bactérias e 48 horas para as leveduras.

Tabela 5. Culturas padrões de leveduras e bactérias e respectivos códigos

Leveduras	
<i>Candida albicans</i>	RJ/ 50008
<i>Cryptococcus laurentii</i>	RJ/ 50359
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CCT 0758
<i>Trichosporon cutaneum</i>	UCD 121
Bactérias	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
<i>Escherichia coli</i>	CCT 1457
<i>Bacillus subtilis</i>	CCT 2471
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15442

3.5– Análise estatística

O procedimento da análise da variância fatorial foi realizado no sistema estatístico SAS, versão 6.12.

3.6– Identificação das linhagens de *Streptomyces* através de técnicas moleculares

As linhagens de estreptomicetos foram semeadas em meio SCN sólido e incubadas a 25° C por 14 dias. Após o crescimento das colônias, uma

foi retirada e transferida para tubos “eppendorf” de 1,5 mL, congelada em nitrogênio líquido e triturada com o auxílio de um pistilo plástico. O DNA genômico foi extraído utilizando solução de TNES (Tris 250mM, pH 7,5; NaCl 2M; EDTA 100mM; SDS 2%) para lise celular. O material foi incubado com esta solução a 55° C por 3 horas e as proteínas foram precipitadas com NaCl 5M. O DNA genômico foi precipitado com isopropanol 100 %, lavado com etanol 70 % e solubilizado em tampão TE.

A amplificação da região 16S foi realizada utilizando os primers universais F27A (AGAGTTTGATCATGGCTCAG) e R1492T (TACGGTTACCTTGTTACGACTT) para a identificação de procariotos (POLZ; CAVANAUGH, 1998).

As amplificações foram realizadas em 25 µL de reação utilizando 100 ng de DNA genômico, 6 pmol de cada iniciador F27A e R1492T e uma porção de reagente para PCR Ready-to-Go (GE Healthcare , 407513-96). A reação incluía uma desnaturação inicial (95° C / 5 minutos) seguida de 35 ciclos de PCR (95° C / 1 minuto, 50° C / 1 minuto, 72° C / 3 minutos) e uma extensão final (72° C / 15 minutos).

Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit UltraClean™ PCR Clean-up DNA Purification Kit (MO BIO Laboratories Inc.), ligados ao vetor (Kit pGem - T Vector System I, Promega A3600) através de incubação a 10° C por 16 horas. Os fragmentos ligados foram utilizados para transformar células competentes de *E. coli* DH10β, por choque térmico, que transferidas para placas de Pétri com meio CG 4 % (Obiogene 3000- 142), acrescido de 0,1 mg.mL⁻¹ de ampicilina, Xgal 1,8 % e IPTG 76 mM. As placas foram incubadas a 37° C por 24 horas. As culturas positivas (brancas) foram transferidas para meio CG 4 % líquido com 0,1 mg.mL⁻¹ de ampicilina e incubadas a 37° C por 22 horas a 220 rpm. Os plasmídeos recombinantes foram purificados por miniprep (SAMBROOK et al., 1989).

Os produtos de extrações, amplificações, purificações e clonagem foram caracterizados em gel de agarose a 1% em TBE 1X, acrescido de

brometo de etídio ($0,5 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$), que permite que o DNA fique visível quando submetido a luz UV. A eletroforese foi realizada utilizando uma cuba horizontal, as amostras de DNA foram carregadas no gel de agarose e submetidas a 100 V e 50 mA por 30 minutos. Em todos os géis foram utilizados marcadores de peso molecular (ladder) de 1 kb.

Para as reações de seqüenciamento foram utilizados 2,5 μL de BigDye (Applied Biosystems 4303153) 2,5 μL de Tampão Save Money (Tris HCl 200 mM, pH 9,0; MgCl_2 5mM), 500 ng de plasmídeos recombinantes, 2,0 μL de iniciadores vetoriais T7 e SP6 ($6,0 \text{ pmol}.\mu\text{L}^{-1}$). A reação incluía uma desnaturação inicial ($96^\circ \text{C} / 90$ segundos), seguida de 25 ciclos de PCR ($96^\circ \text{C} / 12$ segundos, $50^\circ \text{C} / 6$ segundos, $60^\circ \text{C} / 4$ minutos).

Após a reação, os produtos de seqüenciamento foram precipitados com 80 μL de isopropanol 75 %, lavados com etanol 70 % e seqüenciados no seqüenciador ABI 377 (PE Applied Biosystems).

As seqüências resultantes foram comparadas às já depositadas no GenBank, através do aplicativo BLAST e foram alinhadas com suas homólogas pelo aplicativo ClustalW (THOMPSON et al., 1994) e o alinhamento refinado manualmente. As análises filogenéticas foram feitas por distância, utilizando o aplicativo PAUP* 4.0b4a (SWOFFORD, 2000).

4– RESULTADOS E DISCUSSÕES

Tanto para os ensaios de antibiose quanto para as análises moleculares, foram selecionadas nove linhagens de *Streptomyces*, sendo que sete delas pertencem ao grupo das formigas da tribo Attini consideradas primitivas: um isolado de *Cyphomyrmex* (Cy 103–4.5), dois isolados de *Mycocetopus* (Mp 123-3 e Mp 123-4), dois isolados de *Mycetarotis* (Mt 110-1

e Mt 110-2) e dois isolados de *Apterostigma* (Ap 103-1 e Ap 105-2); um isolado de *Trachymyrmex* (Trach 107–2.1) pertencente ao grupo das intermediárias; e um isolado de *Acromyrmex* (Ac 116–4.2) pertencente ao grupo das derivadas.

A escolha das linhagens foi baseada no trabalho de Zabotto (2003), onde foram isoladas e identificadas como pertencentes ao gênero *Streptomyces*, por apresentarem características morfológicas macro e microscópicas relatadas como típicas desse gênero. Todas são Gram-positivas e possuem o micélio aéreo com cadeias longas retas e flexuosas de três ou mais esporos com micromorfologia típica. As colônias apresentam aspecto de “flocos”, são granulares e textura aveludada, produzindo grande quantidade de pigmentos responsáveis pela cor do micélio aéreo e vegetativo. Essas linhagens também apresentaram um amplo espectro de ação, inibindo bactérias Gram-positivas e negativas e fungos não filamentosos (ZABOTTO, 2003).

4.1 – Ensaio de antibiose

Todas as linhagens de *Streptomyces* foram cultivadas em meio SCN líquido, para a obtenção dos filtrados, que foram utilizados nos ensaios de antibiose envolvendo os fungos contaminantes do formigueiro (*Escovopsis weberi*) e bactérias e leveduras padrão.

As figuras 1 a 5, apresentam os resultados dos ensaios de inibição da germinação dos conídios de *Escovopsis weberi*, submetidos a diferentes concentrações dos filtrados obtidos das nove linhagens de *Streptomyces*.

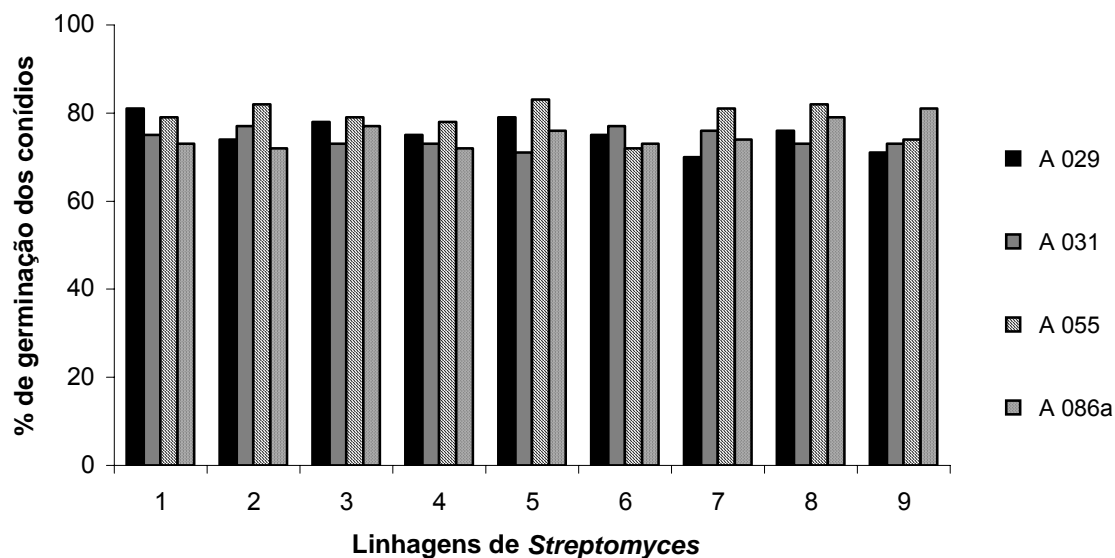


Figura 1. Efeito da adição dos filtrados de *Streptomyces* a 10 % sobre a germinação dos conídios de *Escovopsis weberi*. Germinação dos conídios nos controles: 100 %. Linhagens de *Streptomyces*: 1- Cy 103-2.1, 2- Mp 123-3, 3- Mp 123-4, 4- Mt 110-1, 5- Mt 110-2, 6- Ap 103-1, 7- Ap 105-2, 8- Trach 107-2.1, 9- Ac 116-4.2. Linhagens de *Escovopsis weberi*: A 029, A 031, A 055 e A 086a.

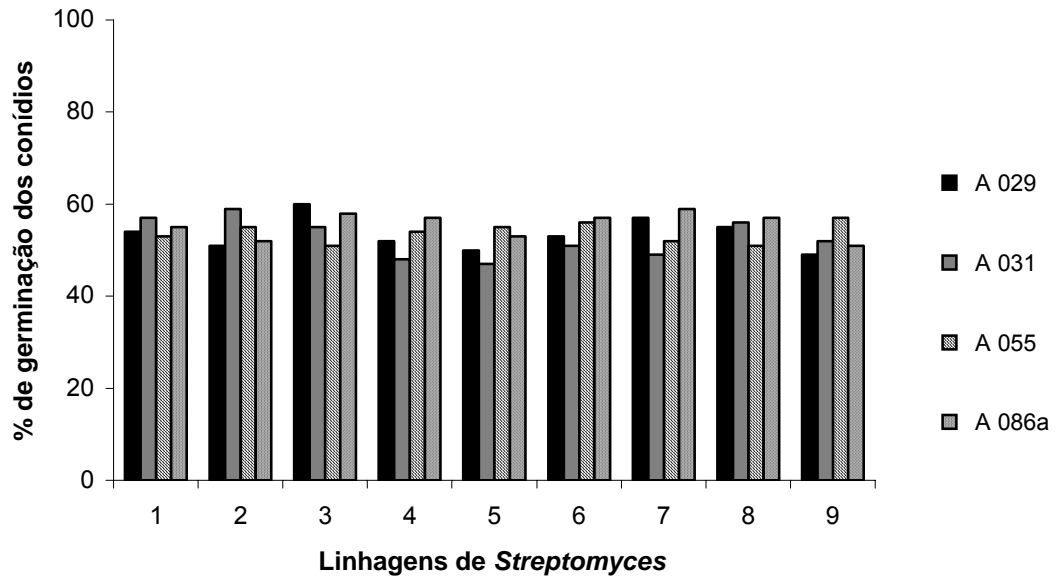


Figura 2. Efeito da adição dos filtrados de *Streptomyces* a 20 % sobre a germinação dos conídios de *Escovopsis weberi*. Germinação dos conídios nos controles: 100 %. Linhagens de *Streptomyces*: 1- Cy 103-2.1, 2- Mp 123-3, 3- Mp 123-4, 4- Mt 110-1, 5- Mt 110-2, 6- Ap 103-1, 7- Ap 105-2, 8- Trach 107-2.1, 9- Ac 116-4.2. Linhagens de *Escovopsis weberi*: A 029, A 031, A 055 e A 086a.

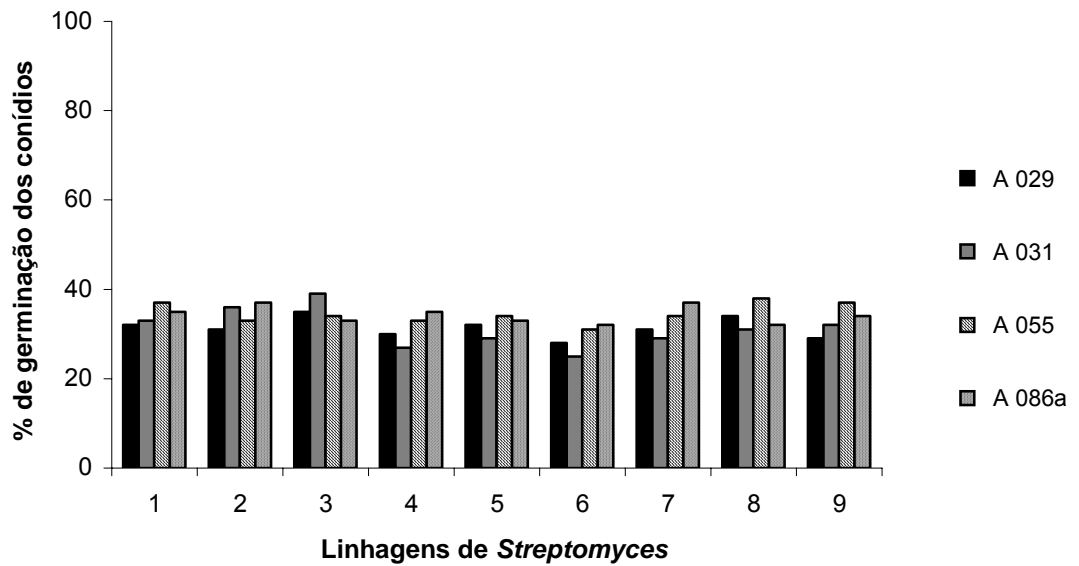


Figura 3. Efeito da adição dos filtrados de *Streptomyces* a 30 % sobre a germinação dos conídios de *Escovopsis weberi*. Germinação dos conídios nos controles: 100%. Linhagens de *Streptomyces*: 1- Cy 103-2.1, 2- Mp 123-3, 3- Mp 123-4, 4- Mt 110-1, 5- Mt 110-2, 6- Ap 103-1, 7- Ap 105-2, 8- Trach 107-2.1, 9- Ac 116-4.2. Linhagens de *Escovopsis weberi*: A 029, A 031, A 055 e A 086a.

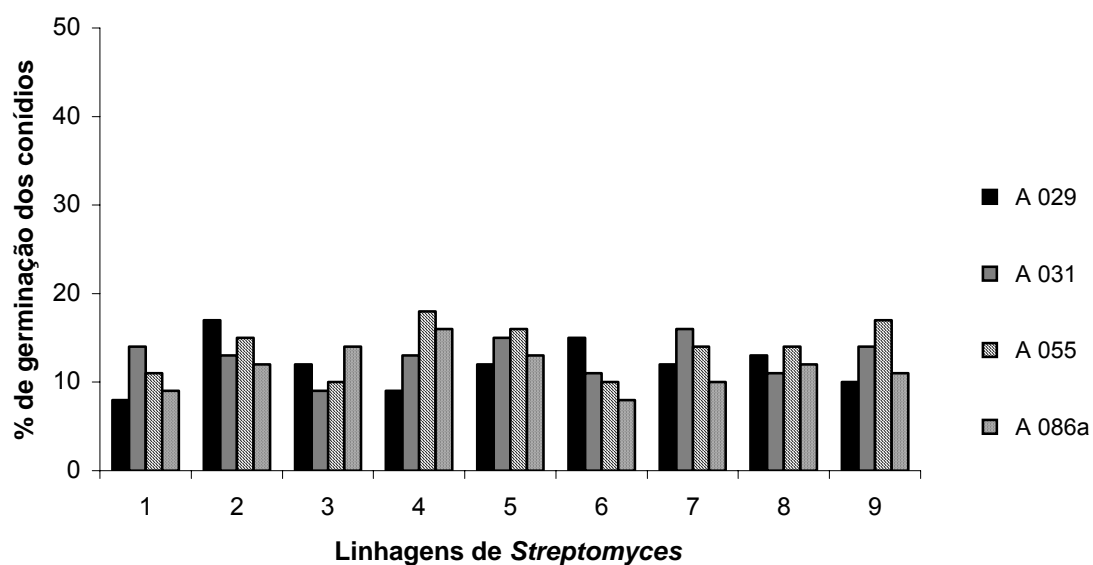


Figura 4. Efeito da adição dos filtrados de *Streptomyces* a 40 % sobre a germinação dos conídios de *Escovopsis weberi*. Germinação dos conídios nos controles: 100%. Linhagens de *Streptomyces*: 1- Cy 103-2.1, 2- Mp 123-3, 3- Mp 123-4, 4- Mt 110-1, 5- Mt 110-2, 6- Ap 103-1, 7- Ap 105-2, 8- Trach 107-2.1, 9- Ac 116-4.2. Linhagens de *Escovopsis weberi*: A 029, A 031, A 055 e A 086a.

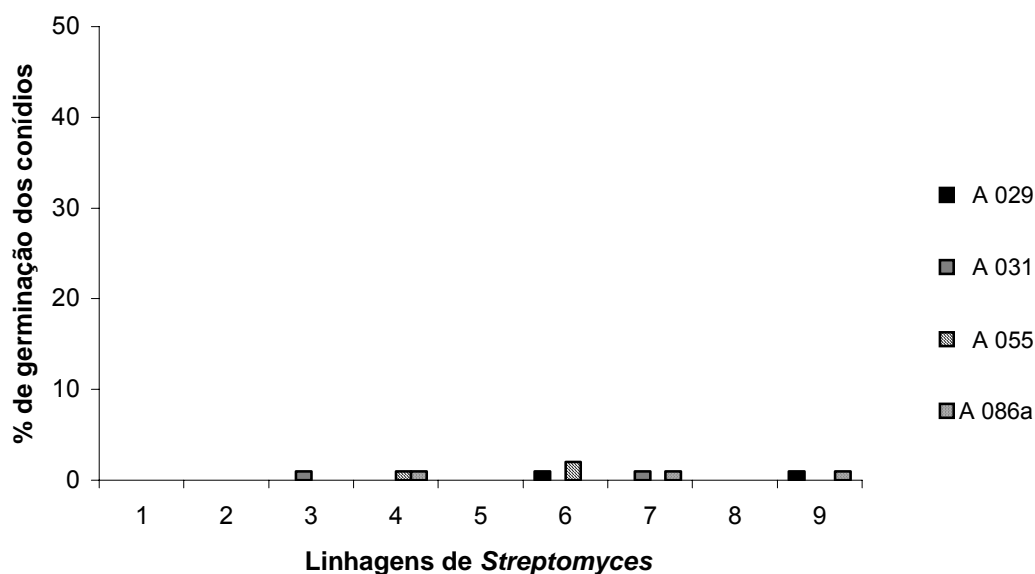


Figura 5. Efeito da adição dos filtrados de *Streptomyces* a 50 % sobre a germinação dos conídios de *Escovopsis weberi*. Germinação dos conídios nos controles: 100%. Linhagens de *Streptomyces*: 1- Cy 103-2.1, 2- Mp 123-3, 3- Mp 123-4, 4- Mt 110-1, 5- Mt 110-2, 6- Ap 103-1, 7- Ap 105-2, 8- Trach 107-2.1, 9- Ac 116-4.2. Linhagens de *Escovopsis weberi*: A 029, A 031, A 055 e A 086a.

Foi possível verificar que mesmo variando os filtrados obtidos das linhagens de *Streptomyces*, os resultados de inibição da germinação dos conídios foram muito semelhantes, e todas as linhagens do fungo *Escovopsis weberi* apresentaram uma inibição homogênea frente a mesma concentração de filtrado. Houve inibição da germinação dos conídios até mesmo com a adição da menor concentração dos filtrados que foi testada, ou seja, para uma proporção de 10 % do filtrado, temos cerca de 80 % de germinação dos conídios, e com o aumento da concentração dos filtrados incorporados ao meio de cultivo, a porcentagem de germinação dos conídios diminui, sendo totalmente inibidos quando testados com a adição da maior concentração de filtrados, 50 %.

A análise estatística foi realizada para os ensaios envolvendo os fungos *Escovopsis weberi* e os filtrados de *Streptomyces*. Os modelos estatísticos elaborados para esses experimentos foram reunidos conforme a tabela 6.

Tabela 6. Análise de variância fatorial da porcentagem de germinação do fungo *Escovopsis weberi* frente a diferentes concentrações de filtrados obtidos de linhagens de *Streptomyces*.

CV	GL	SQ	QM	F	Pr > F
CONC	4	134736,5333	33684,1333	4749,12	0,0001
STREP	8	70,9000	8,8625	1,25	0,2792
ESCOV	3	116,8222	38,9407	5,49	0,0016
CONC x STREP	32	229,7666	7,1802	1,01	0,4639
CONC x ESCOV	12	146,4000	12,2000	1,72	0,0742
STREP x ESCOV	24	196,8777	8,2032	1,16	0,3017
Resíduo	96	680,9000	7,0927		
Total	179	136178,2000			

Legenda: Fonte de variação (FV); grau de liberdade (GL); soma dos quadrados (SQ); média dos quadrados (QM); valor da estatística (F); Probabilidade maior que o valor da estatística (Pr > F). Onde R² = 0.995000 e CV = 7.587504

Modelo do tipo fatorial considerando como fatores de variação CONC (5 = 10%, 20%, 30%, 40% e 50%), STREP (9 = 1- Cy 103-2.1, 2- Mp 123-3, 3- Mp 123-4, 4- Mt 110-1, 5- Mt 110-2, 6- Ap 103-1, 7- Ap 105-2, 8- Trach 107-2.1, 9- Ac 116-4.2) e ESCOV (4 = 1- A 029, 2- A 031, 3- A 055, 4- A 086a).

Foi possível concluir que, pela análise estatística, existem diferenças entre as concentrações dos filtrados e entre as linhagens do fungo *Escovopsis weberi*, não havendo diferenças entre as linhagens de *Streptomyces*. As diferenças entre as concentrações e os fungos *Escovopsis weberi* foram analisadas pelo teste de comparações múltiplas de Tukey (Tabelas 7 e 8).

Tabela 7. Teste de comparações múltiplas de Tukey para concentrações dos filtrados.

Concentrações	Média	Tukey
10	75,9444	A
20	53,8333	B
30	32,8333	C
40	12,6111	D
50	0,2778	E

Tabela 8. Teste de comparações múltiplas de Tukey para os fungos *Escovopsis weberi*.

<i>Escovopsis weberi</i>	Média	Tukey
A 055	36.2889	A
A 086a	35.3778	A B
A 029	34.4889	B
A 031	34.2444	B

A interpretação do teste de comparações múltiplas de Tukey, com base na estatística, diz que para letras iguais, respostas iguais e para letras diferentes, respostas diferentes. Com isso, foi verificado que todas as concentrações dos filtrados apresentaram resposta diferentes e com relação aos fungos *Escovopsis weberi*, as linhagens A 055 e A 031 apresentaram respostas diferentes.

Através da contagem do número de conídios que germinaram nas placas controle, foi possível verificar que o percentual de germinação é muito baixo, em torno de 3,5 %, ou seja, nas placas onde foram inoculados 5000 conídios, apenas 200 germinaram. Os fatores que estão relacionados com esta baixa viabilidade podem ser devido a tensão superficial entre os conídios, deixando-os agrupados, dificultando a contagem do número exato de conídios através da câmara de Neubauer. O meio de cultivo utilizado também pode ter influenciado na não germinação dos conídios *in vitro*, mas, como o percentual de germinação nas placas controle foi muito baixo para todas as linhagens de *Escovopsis weberi*, pode-se dizer que estes fungos apresentam baixa viabilidade.

Nas placas controle contendo meio A concentrado + meio SNC líquido, o número de conídios que germinaram foi semelhante aos que germinaram na placa controle contendo meio A concentrado + água destilada. Através deste controle foi descartada a dúvida de que os componentes do meio SCN líquido poderiam estar influenciando na inibição da germinação dos conídios.

Na figura 6, observa-se a inibição da germinação dos conídios da linhagem A 031 de *Escovopsis weberi* quando submetida à 30 % do filtrado das linhagens Ac 116-4.2, Mp 123-4, Trach 107-2.1 e Ap 105-2. Nota-se que houve uma forte inibição, comparando o número de colônias que germinaram nas placas controles com o número de colônias que germinaram nas placas contendo filtrado a 30 %.

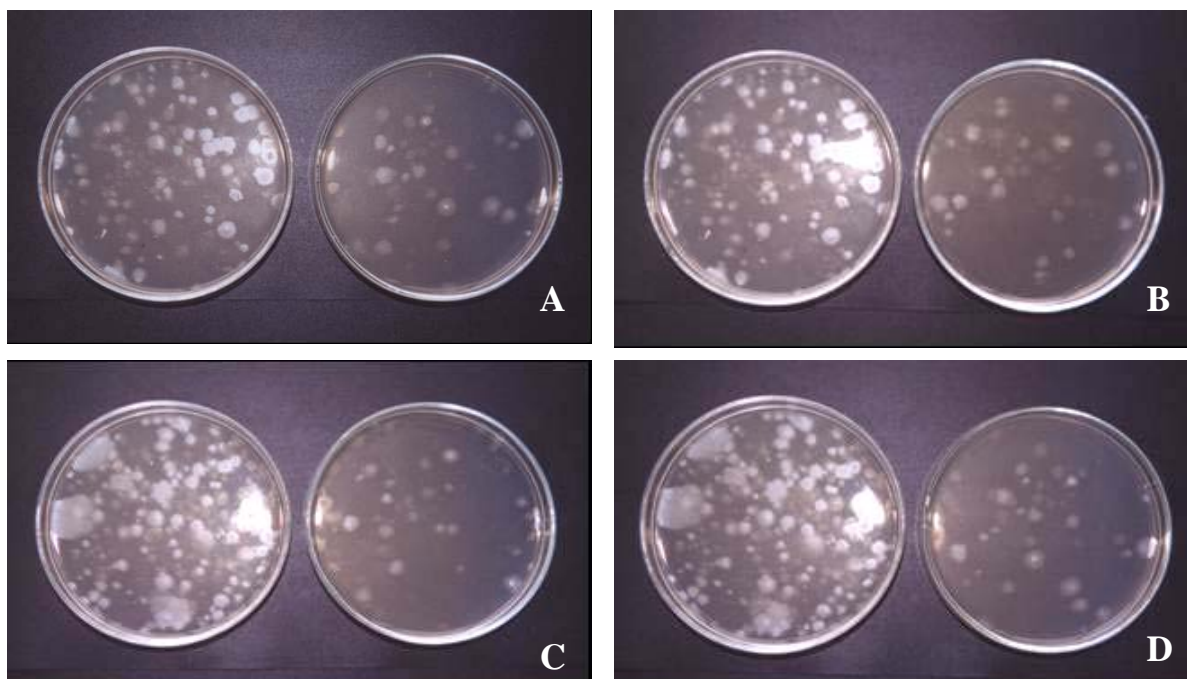


Figura 6. Efeito da adição do filtrado de *Streptomyces* a 30 % sobre a germinação do fungo *Escovopsis weberi* (linhagem A 031). A: Ac 116-4.2; B: Mp 123-4; C: Trach 107-2.1; D: Ap 105-2. Placas à esquerda: controle.

O potencial de inibição dos filtrados sobre bactérias e leveduras foi bastante amplo, e, ao contrário dos ensaios envolvendo os fungos *Escovopsis weberi*, houve diferenças na intensidade da resposta. Em algumas das culturas de microrganismos formaram-se halos de inibição evidentes na presença dos filtrados. Em outros formaram halos discretos e em alguns não houve a formação do halo. Para efeito de resultado, foi considerado apenas se houve ou não a inibição, independente do tamanho do halo de inibição formado.

Foram testadas bactérias Gram-positivas e negativas (Tabela 9, Figura 7). As linhagens Mt 110-1 e Mt 110-2 inibiram o crescimento de todas as bactérias. As linhagens Mp 123-3, Mp 123-4, Ap 103-1, Ap 105-2 e Trach 107-2.1 só não inibiram o crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* e as linhagens Cy 103-2.1 e Ac 116-4.2 não inibiram qualquer das bactérias.

Em relação às leveduras (Tabela 10, Figura 9), todas foram inibidas pelas linhagens Mt 110-1, Mt 110-2 e Trach 107-2.1. A linhagem Mp 123-3 não inibiu o crescimento de *Cryptococcus laurentii* e *Saccharomyces cerevisiae*. Apenas *Cryptococcus laurentii* não foi inibido pelas linhagens Mp 123-4, Ap 103-1 e Ap 105-2, enquanto as linhagens Cy 103-2.1 e Ac 116-4.2 não inibiram o crescimento de qualquer das leveduras testadas.

Os filtrados das linhagens Mt 110-1 e Mt 110-2 foram os únicos que inibiram o crescimento de todas as bactérias e leveduras. *Saccharomyces cerevisiae* não foi inibido pela linhagem Mp 123-3, mas foi inibido pela linhagem Mp 123-4. Os filtrados foram obtidos de duas linhagens isoladas de um mesmo ninho, porém de indivíduos diferentes, o que pode sugerir a ocorrência de mais de uma espécie de *Streptomyces* no mesmo ninho ou cepas da mesma produzindo metabólitos diferentes.

Tabela 9. Diâmetro dos halos de inibição (em mm) das bactérias Gram-positivas e negativas na presença dos filtrados de *Streptomyces*.

Linhagens	Gram Positivas		Gram Negativas	
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Cy 103-2.1	SH	SH	SH	SH
Mp 123-3	19	11	12	SH
Mp 123-4	18	12	17	SH
Mt 110-1	17	14	10	9
Mt 110-2	21	16	18	7
Ap 103-1	20	15	16	SH
Ap 105-2	17	7	12	SH
Trach 107-2.1	19	15	11	SH
Ac 116-4.2	SH	SH	SH	SH
Controle	28	20	24	13
Tetraciclina (30 µg.mL ⁻¹)				

Tabela 10. Diâmetro dos halos de inibição (em mm) das leveduras na presença dos filtrados de *Streptomyces*.

Linhagens	Leveduras			
	<i>C. albinans</i>	<i>C. laurentii</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. cutaneum</i>
Cy 103-2.1	SH	SH	SH	SH
Mp 123-3	7	SH	SH	7
Mp 123-4	12	SH	9	12
Mt 110-1	11	11	15	15
Mt 110-2	13	13	16	18
Ap 103-1	8	SH	7	13
Ap 105-2	10	SH	10	11
Trach 107-2.1	12	9	12	16
Ac 116-4.2	SH	SH	SH	SH
Controle	21	17	14	24
Nistatina (20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)				

Dentre os actinomicetos, o gênero *Streptomyces* destaca-se devido a sua grande importância industrial com sua variada produção de metabólitos secundários. Por esta razão, estreptomicetos estão sendo isolados de diferentes habitats e testados, visando a busca por novas drogas com maior espectro de ação antibiótica.

Três novos antibióticos (irumamicina, X-14952B e 17-hidroxi-venturicidina A), obtidos de *Streptomyces* isolados do solo de oásis na Tunísia, apresentam atividade antibiótica contra bactérias Gram-positivas e negativas e fungos (FOURATI-BEN et al, 2005). Um novo antifúngico produzido da linhagem K99-5278 de *Streptomyces* sp apresenta atividade contra *Aspergillus niger*, *Mucor racemosus*, *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* (KIM et al., 2003). Dois novos antifúngicos, 3874 H1 e 3874 H3, produzidos da linhagem HAG 003874 de *Streptomyces* sp

apresentaram atividade contra dermatófitos, leveduras e fungos filamentosos (VERTESY et al., 1998). Uma nova oleandomicina derivada de *Streptomyces antibioticus* apresenta atividade antibacteriana contra *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* (KIM et al., 2005).

O espectro de ação dos filtrados obtidos das linhagens de *Streptomyces*, isolados das formigas da tribo Attini, foi bastante amplo, inibindo o crescimento tanto de bactérias quanto de fungos filamentosos e não filamentosos, indicando o grande potencial destas bactérias como produtoras de substâncias antimicrobianas.

Segundo CURRIE e seus colaboradores (1999a), o actinomiceto presente no corpo das formigas Attini produz substâncias antibióticas dirigidas para suprimir o crescimento de patógenos no jardim de fungo, especialmente o gênero *Escovopsis*. A total inibição da germinação dos fungos *Escovopsis weberi* na presença dos filtrados de *Streptomyces*, sugere que essas linhagens devem produzir metabólitos secundários voltados para esse gênero de fungo.

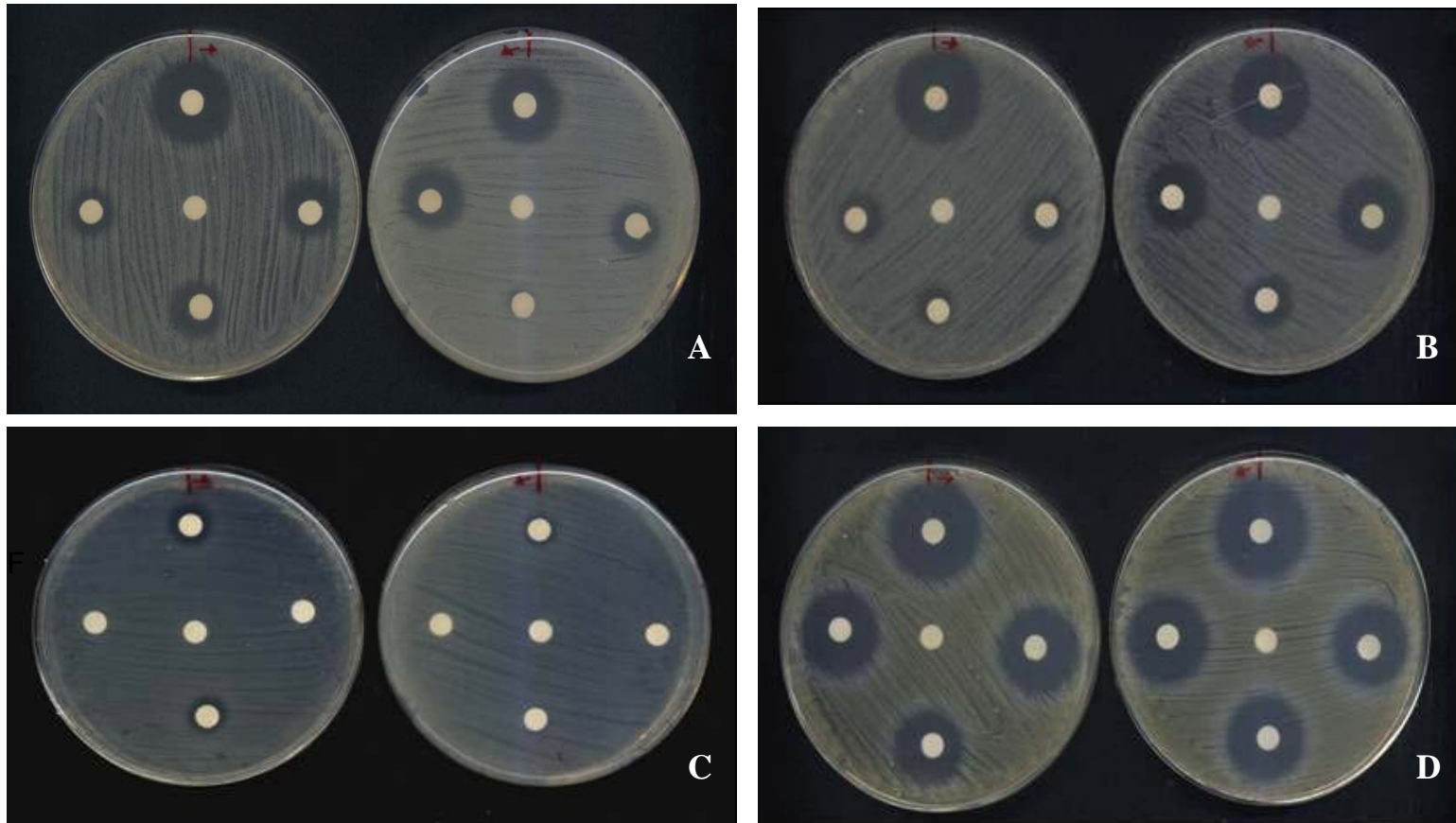


Figura 7. Halos de inibição dos filtrados de *Streptomyces* testados frente a bactérias Gram positivas e negativas. A: *Bacillus subtilis*; B: *Escherichia coli*; C: *Pseudomonas aeruginosa*; D: *Staphylococcus aureus*. Placa à esquerda: acima, Tetraciclina; no sentido horário: Trach 107-2.1, Mt 110-1, Mp 123-3, no centro Ac 116-4.2. Placa à direita: acima, Mt 110-2; no sentido horário: Mp 123-4, Ap 105-2, Ap 103-1, no centro Cy 103-2.1.

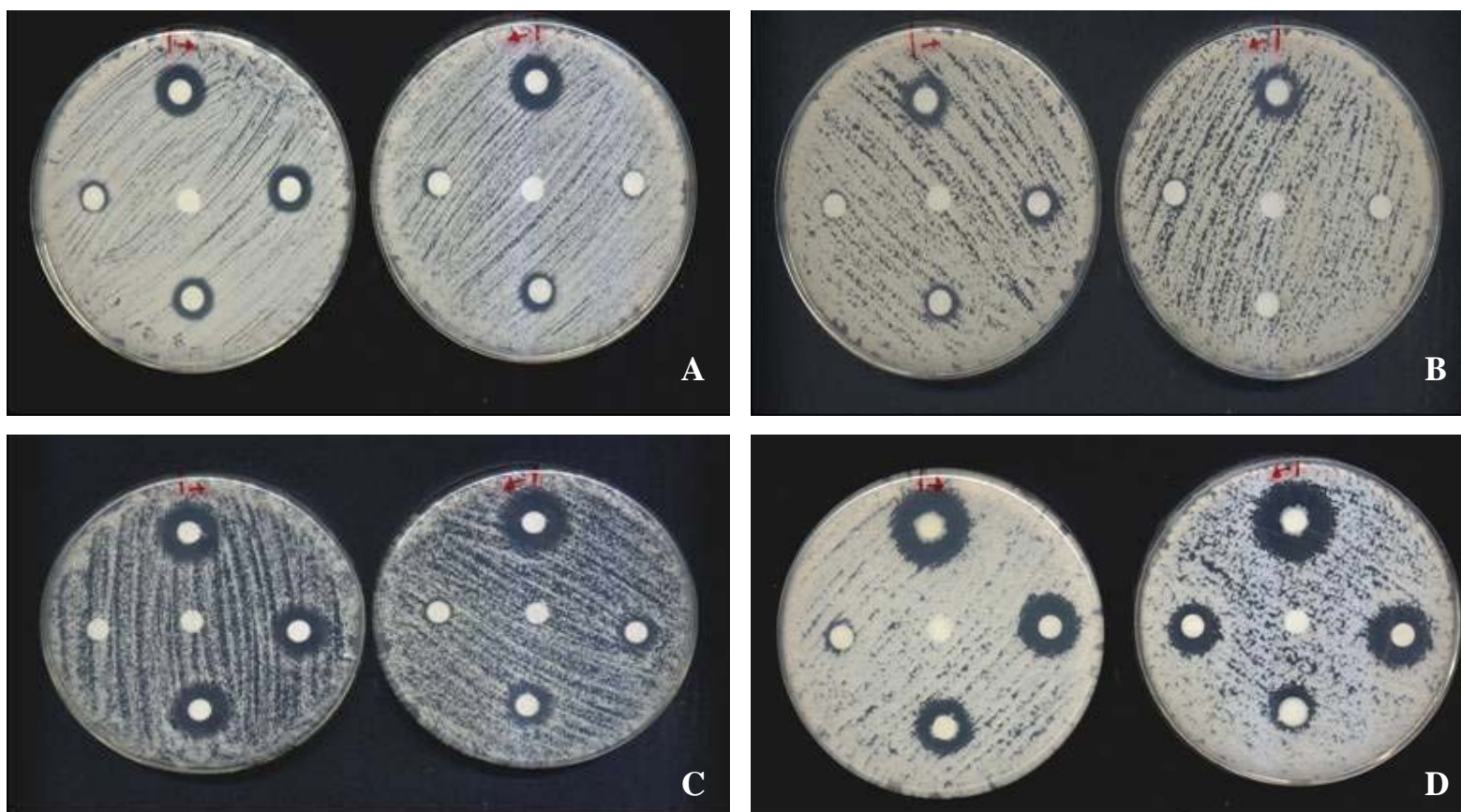


Figura 8. Halos de inibição dos filtrados de *Streptomyces* testados frente a leveduras. A: *Candida albicans*; B: *Cryptococcus laurentii*; C: *Saccharomyces cerevisiae*; D: *Trichosporon cutaneum*. Placa à esquerda: acima, Nistatina; no sentido horário: Trach 107-2.1, Mt 110-1, Mp 123-3, no centro Ac 116-4.2. Placa à direita: acima, Mt 110-2; no sentido horário: Mp 123-4, Ap 105-2, Ap 103-1, no centro Cy 103-2.1.

4.2– Identificação das linhagens através de técnicas moleculares

As nove linhagens selecionadas para este trabalho foram identificadas com o auxílio de técnicas moleculares. A região 16S destas linhagens foi amplificada, clonada e seqüenciada.

Optamos em utilizar os primers universais: F27A (AGAGTTTGATCATGGCTCAG) e R1492T (TACGGTTACCTTGTTACGACTT) (POLZ & CAVANAUGH, 1998), que foram desenhados para amplificar a região 16S de procariotos. Essa escolha ocorreu devido a dúvida que surgiu durante a realização desse trabalho, após a correção publicada por Currie e seus colaboradores (2003a), que através de análises moleculares consideraram o actinomiceto, presente no corpo das Attini, pertencendo a família Pseudonocardiaceae.

Durante seu trabalho em 2003, Zabotto identificou, através de técnicas moleculares, as linhagens de *Streptomyces* isoladas das formigas Attini. Para esta identificação foram utilizados primers desenhados especialmente para amplificar a região 16S de estreptomicetos e após o seqüenciamento foi verificado que todas eram pertencentes ao gênero *Streptomyces*.

Foram realizadas clonagens de todos os amplicons obtidos, tanto os que apresentaram várias bandas quanto aqueles em que os géis de verificação acusaram apenas uma única banda de amplificação. Como os primers utilizados amplificam o material de procariotos, através da clonagem foi possível verificar se as linhagens isoladas eram mesmo pertencentes ao gênero *Streptomyces* ou a família Pseudonocardiaceae, ou ainda se em uma mesma cultura isolada poderíamos encontrar ambos.

As amplificações e as purificações dos plasmídeos recombinantes foram verificadas em gel de agarose. Na figura 9, verificamos as

amplificações com o tamanho esperado, aproximadamente 1,5 kb e, na figura 10, verificamos a presença dos plasmídeos.

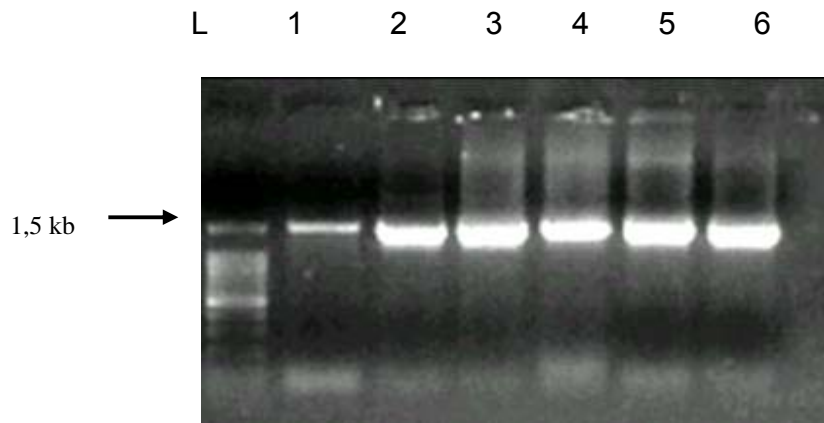


Figura 9. Perfil eletroforético em gel de agarose da amplificação da região 16S: L. Ladder 1,0 kb; 1. Ac 116-4.2; 2. Trach 107-2.1; 3. Mt 110-2; 4. Ap 105-2; 5. Mp 123-4; 6. Cy 103-2.1

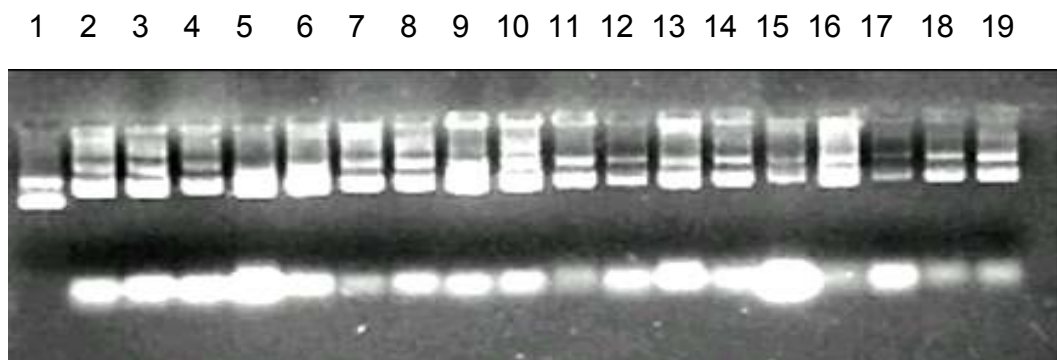


Figura 10. Perfil eletroforético em gel de agarose de plasmídeos extraídos após clonagem: 1. pGem; 2 e 3. Mt 110-1; 4 e 5. Mt 110-2; 6 e 7. Ac 116-4.2; 8 e 9. Cy 103-2.1; 10 e 11. Mp 123-3; 12 e 13. Mp 123-4; 14 e 15. Ap 105-2; 16 e 17 Ap 103-1; 18 e 19 Trach 107-2.1

Após a clonagem, o seqüenciamento foi realizado utilizando os primers T7 e SP6, específicos para clones. A quantidade de clones seqüenciados foi a mesma para cada uma das linhagens, 5 clones. As seqüências, de todos os clones de cada linhagem, foram comparadas através do aplicativo Blast com as seqüências já depositadas no GenBank, e posteriormente foram alinhadas juntamente com as seqüências de *Streptomyces* e *Pseudonocardia* depositadas no GenBank. Nesse alinhamento foi verificado que os 5 clones de cada linhagem eram semelhantes, e então, um representante de cada linhagem foi escolhido para as análises.

Foi possível notar, pelo alinhamento das seqüências, que todas apresentaram uma maior semelhança com o gênero *Streptomyces* do que com o gênero *Pseudonocardia* (Figura 11). Através dessas semelhanças somadas às características morfológicas macro e microscópicas estudadas por Zabotto (2003), torna-se possível a identificação dessas linhagens como pertencentes ao gênero *Streptomyces*.

O alinhamento das seqüências resultou em 1007 caracteres dos quais 860 eram constantes. Foi possível encontrar diferentes grupos gênicos de *Streptomyces* (Figura 12). Nota-se a formação de três grupos (A, B e C). O grupo A é composto de dois subgrupos, A1 e A2. Pertencem ao subgrupo A1 *Streptomyces lavendulae*, Mt 110-1, Mt 110-2, Mp 123-4 e *Streptomyces subrutilus*. No subgrupo A2 estão *Streptomyces venezuelae*, Ap 105-2 e Cy 103-2.1. O grupo B também é composto por dois subgrupos, B1 e B2. Em B1 estão *Streptomyces griseus*, Mp 123-3 e Ac 116-2.1 e em B2 estão Trach 107-2.1, Ap 103-1 e *Streptomyces argenteolus*. O grupo C também é composto por dois subgrupos, C1 e C2. No subgrupo C1 estão localizados *Streptomyces tendae*, *Pseudonocardia chlorethenvorans*, *Pseudonocardia* sp e *Pseudonocardia dioxanivorans*. Em C2 estão *Streptomyces sanglieri* e *Streptomyces setonii*.

Analisando a árvore, é possível verificar que a seqüência de *Streptomyces tendae* encontra-se no mesmo subgrupo filogenético das *Pseudonocardia*. E as seqüências de *Streptomyces sanglieri* e *Streptomyces setonii* estão muito mais próximas das seqüências de *Pseudonocardia* do que das outras seqüências de *Streptomyces*.

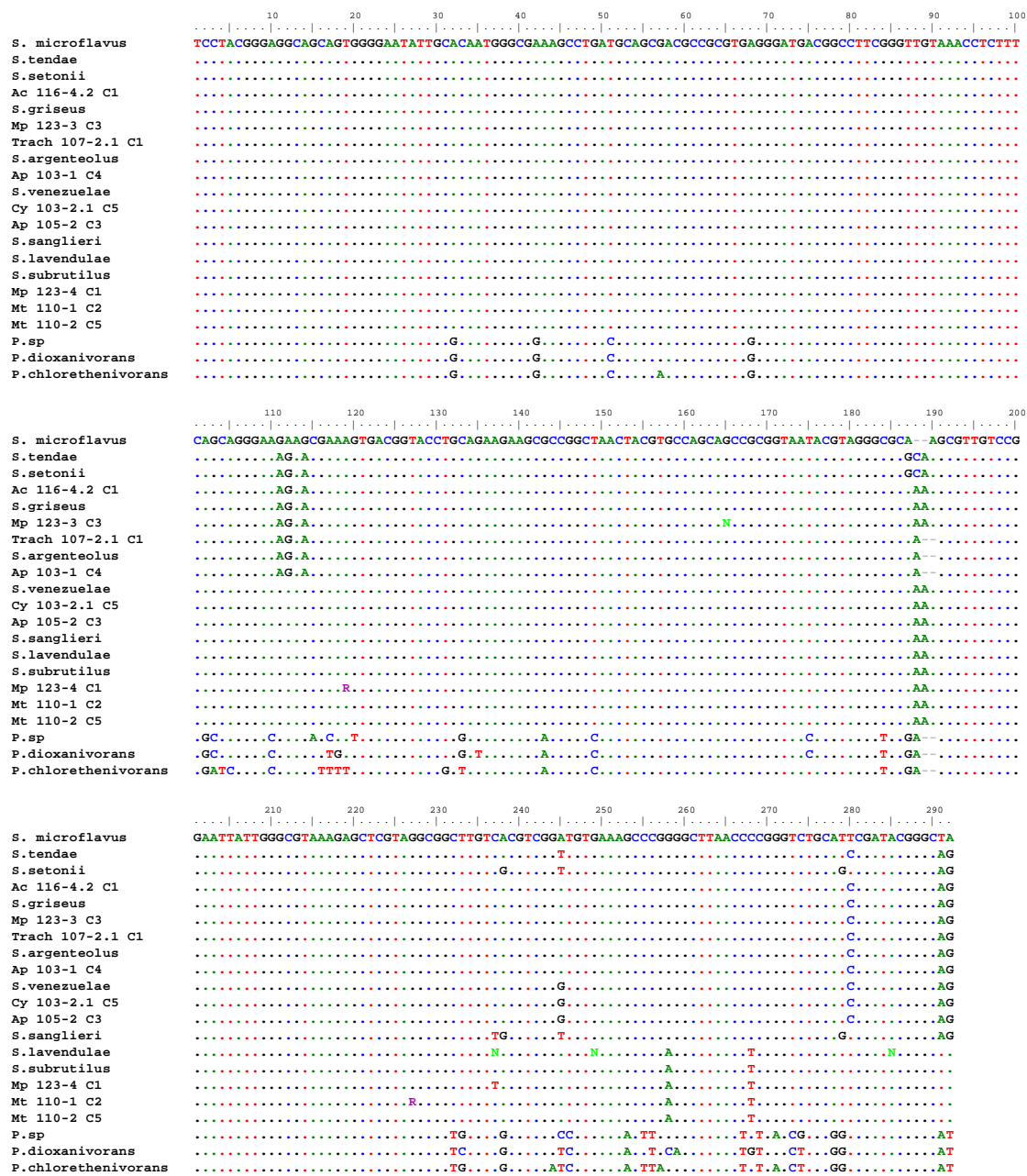


Figura 11. Alinhamento de 1 a 290 de 1007 bases da região 16S rDNA entre as seqüências das linhagens isoladas de formigas Attini e outras depositadas no GenBank.

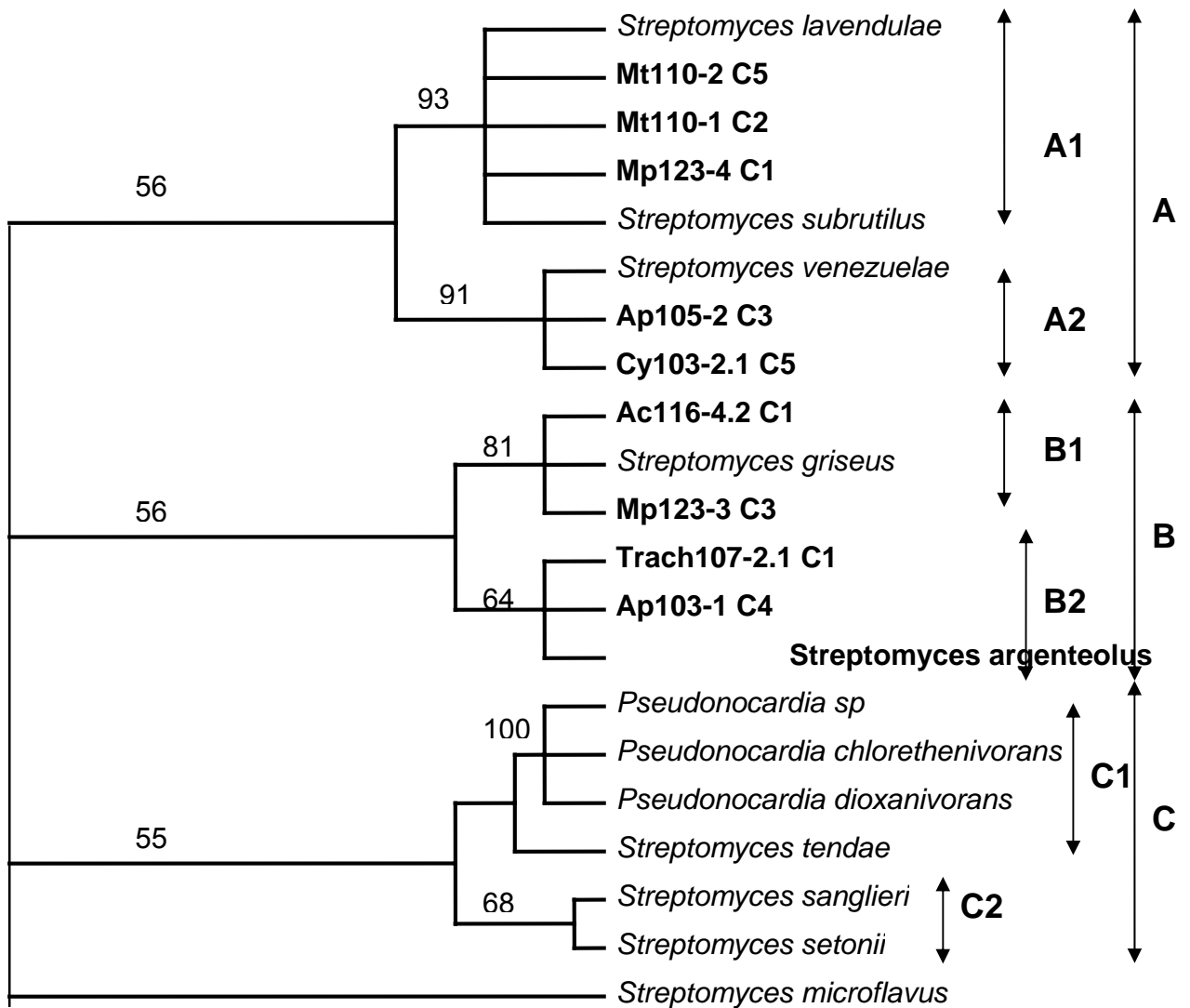
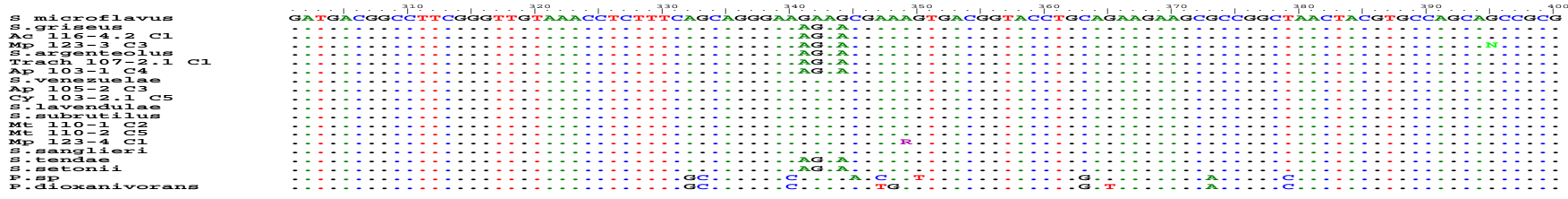
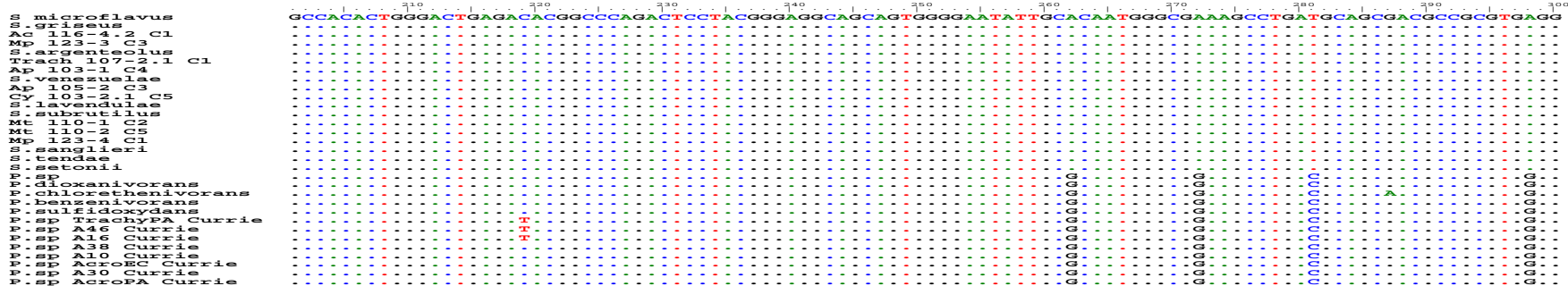
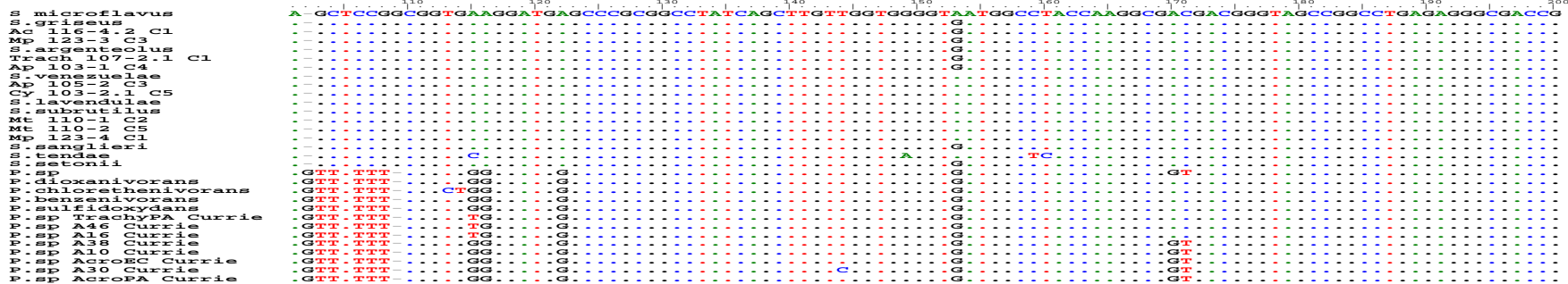
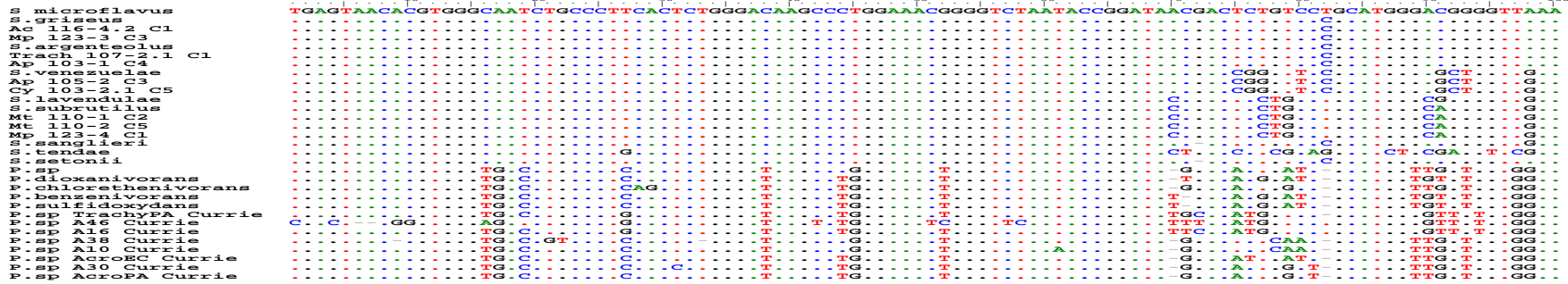


Figura 12. Árvore consenso entre as 12 árvores mais parcimoniosas com 118 caracteres informativos para parcimônia, obtida pelo método de parcimônia utilizando o algoritmo heurístico TBR (SWOFFORD, 1996) implementado pelo programa PAUP* (SWOFFORD, 2000) e a partir de 1007 nucleotídeos previamente alinhados pelo programa ClustalW (THOMPSON et al., 1994), pertencentes à região 16S de 21 actinomicetos. Os números sobre os ramos representam valores de “bootstrap” (FELSENSTEIN, 1985), obtidos a partir de 100 réplicas, que não são mostrados se inferiores a 50%

Para tentar esclarecer a dúvida gerada, as seqüências obtidas das linhagens de *Streptomyces* isoladas em nosso laboratório por Zabotto (2003), também foram alinhadas com as seqüências das linhagens de *Pseudonocardia* identificadas por Currie e seus colaboradores, já depositadas no GenBank, ambas isoladas de formigas da tribo Attini (Figura 12). Através deste alinhamento, notou-se que as seqüências das linhagens isoladas em nosso laboratório continuaram apresentando uma maior semelhança com as seqüências de *Streptomyces* do que com as de *Pseudonocardia*.

O alinhamento das seqüências isoladas de formigas Attini com outras seqüências de *Pseudonocardia* e de *Streptomyces* resultou em 1142 caracteres, dos quais 920 eram constantes. Através da análise filogenética (Figura 13) destas seqüências, verificou-se a formação de 3 grupos gênicos, A, B e C. No grupo A encontram-se todas as *Pseudonocardia*, tanto as obtidas por Currie e seus colaboradores (*P. sp* Trachy PA, *P. sp* A 16, *P. sp* A 46, *P. sp* A 30, *P. sp* Acro PA, *P. sp* A 38, *P. sp* A 10 e *P. sp* Acro EC) quanto as outras (*P. dioxanivorans*, *P. sulfidoxydnas*, *P. benzenivornas*, *P. sp* e *P. chlorethenivorans*) e algumas linhagens de *Streptomyces*. No grupo B e C estão todas as linhagens isoladas em nosso laboratório e outras linhagens de *Streptomyces*.



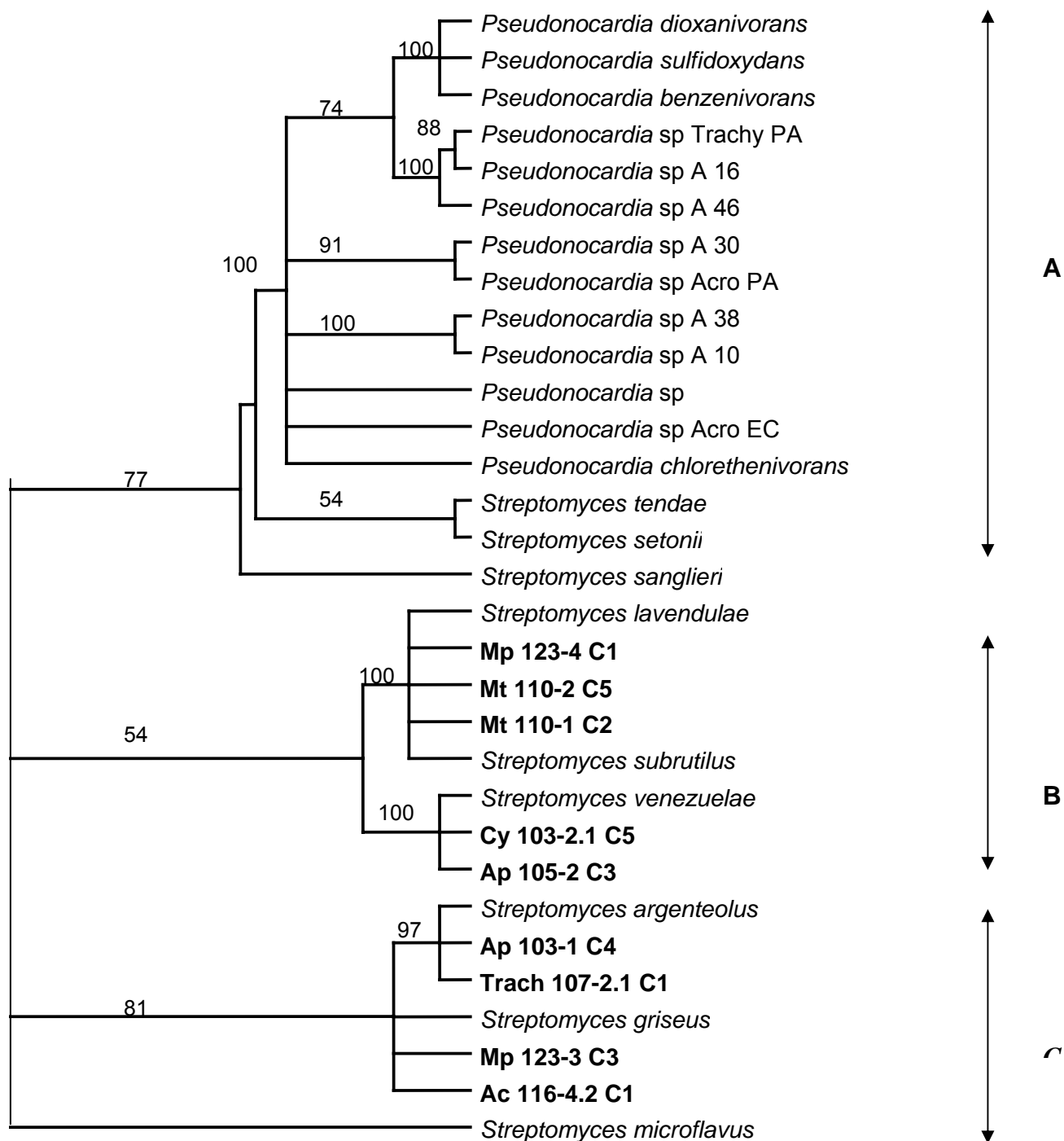


Figura 14. Árvore consenso entre as 32 árvores mais parcimoniosas com 167 caracteres informativos para parcimônia, obtida pelo método de parcimônia utilizando o algoritmo heurístico TBR (SWOFFORD, 1996) implementado pelo programa PAUP* (SWOFFORD, 2000) e a partir de 1142 nucleotídeos previamente alinhados pelo programa ClustalW (THOMPSON et al., 1994), pertencentes à região 16S de 31 actinomicetos. Os números sobre os ramos

Comparando as linhagens seqüenciadas com os ensaios de antibiose, foi

observado que apesar de existir a formação de grupos distintos, a resposta em relação à inibição da germinação dos fungos *Escovopsis weberii* foi muito forte e homogênea. Com essa informação, pode-se dizer que existem diferentes linhagens de *Streptomyces*, isoladas de diferentes gêneros de formigas, apresentando o mesmo potencial inibitório frente aos fungos *Escovopsis weberii*. Como esses fungos representam uma maior ameaça aos ninhos, as formigas Attini devem ter selecionado linhagens produtoras de metabólitos dirigidos mais para os fungos *Escovopsis* sp do que para bactérias e leveduras, apesar destas também serem atingidas.

Com relação às bactérias e leveduras as respostas foram diferentes. As linhagens Mt 110-1 e Mt 110-2 inibiram o crescimento de todas as bactérias e leveduras testadas, foram isoladas de um mesmo ninho e pertencem a um mesmo grupo filogenético. Também isoladas de um mesmo ninho, as linhagens Mp 123-4 inibiu o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*, enquanto Mp 123-3 não inibiu e estão localizadas em grupos distintos. Já as linhagens Ap 103-1 e Ap 105-2 foram isoladas do mesmo gênero de Attini mas ninhos diferentes, apresentaram resposta semelhante quanto aos ensaios envolvendo bactérias e leveduras e estão localizadas em grupos filogenéticos distintos. Isso provavelmente se deve ao fato de a produção de antibióticos é cepa-específica e não espécie-específica (PADILHA, 1998), ou seja, existem cepas que de uma mesma espécie que produzem antibióticos diferentes, e cepas de espécies diferentes que produzem o mesmo antibiótico (OKAMI; HOTTA, 1988).

A caracterização química das linhagens de *Streptomyces* isoladas das formigas Attini deve ser estudada, uma vez que, pode-se encontrar um novo composto antimicrobiano. Através da análise da árvore filogenética, foi verificada a formação de grupos onde estavam localizadas linhagens de *Streptomyces*, já conhecidas como produtoras de substâncias antimicrobianas, tais como *Streptomyces lavendulae* (estreptotricina), *Streptomyces venezuelae* (cloranfenicol) e *Streptomyces griseus* (estreptomicina) e as linhagens de *Streptomyces* selecionadas para esse trabalho.

Com base nos resultados obtidos nesse, novas pesquisas envolvendo as linhagens de *Streptomyces* isoladas das Attini podem ser realizadas, Po e apresentarem um possível potencial econômico e terapêutico.

5- CONCLUSÕES

Os filtrados obtidos, das nove linhagens de *Streptomyces* isoladas de formigas da tribo Attini, apresentaram um alto potencial de inibição frente aos microrganismos testados.

Todas as linhagens de *Streptomyces* inibiram, de forma homogênea, a germinação dos conídios dos fungos *Escovopsis weberi*. Pela análise estatística, foi possível concluir que existem diferenças entre as concentrações dos filtrados e entre as linhagens do fungo *Escovopsis weberi*, não havendo diferenças entre as linhagens de *Streptomyces*.

Quanto aos microrganismos padrões, o potencial de inibição dos filtrados foi bastante amplo, ao contrário dos ensaios envolvendo os fungos *Escovopsis weberi*, houve diferenças na intensidade da resposta. As linhagens Mt 110-1 e Mt 110-2 inibiram o crescimento de todas as bactérias gram positivas e negativas e de todas as leveduras. Mp 123-3, Mp 123-4, Ap 103-1, Ap 105-2 e Trach 107-2.1 só não inibiram *Pseudomonas aeruginosa*. Trach 107-2.1 inibiu todas as leveduras. Mp 123-3 só não inibiu o crescimento de *Cryptococcus laurentii* e *Saccharomyces cerevisiae*. Apenas *Cryptococcus laurentii* não foi inibido pelas linhagens Mp 123-4, Ap 103-1 e Ap 105-2. As linhagens Cy 103-2.1 e Ac 116-4.2 não inibiram o crescimento de qualquer das bactérias e leveduras testados.

O seqüenciamento da região 16S rDNA permitiu a identificação dessas linhagens, pois o seu alinhamento se aproximou mais das linhagens de *Streptomyces* dos que das linhagens de *Pseudonocardia*.

Através da análise filogenética, foi possível verificar que linhagens que apresentaram o mesmo comportamento, quanto aos ensaios de antibiose, estavam inseridas tanto em grupos distintos quanto em um mesmo grupo. Isso pode sugerir que existem diferentes linhagens de *Streptomyces*, isoladas de diferentes gêneros de formigas, apresentando o mesmo potencial inibitório.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUTUORI, M. Investigações sobre a biologia da saúva. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 1, n. 1/2, p. 4-12, 1949.

BACCI-JUNIOR.; M., RIBEIRO; S. B., CASAROTTO; M. E. F.; PAGNOCCA, F. C. Biopolymer-degrading bacteria from nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 28, n. 1 p. 79-82, 1995.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **The American J. Clinical Pathology**, Philadelphia, v. 45, n.4, p. 493-496, 1966.

BENTTLEY,S.D.; CHATER,K.F.;CERDEÑO-TARRAGA; CHALLIS,G.L.; THOMSON,N.R.; JAMES,K.D.; HARRIS,D.E.; QUALL,M.A.; KLESER,H.; HARPER,D.; BATEMAN,A.; BROWN,S.; CHANDRA,G.; CHEN,C.W.;COLLINS,M.; CRONIN,A.; FRASER, A.; GOBLE,A.; HIDALGO,J.; HORNSBY, T.; HOWARTH,S.; HUANG, C.H.; KLESER, T.; LARKE, L.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; O’NELL, S.; RABBINOWITSCH, E.; RAJANDREAM, M.A.; RUTHERFORD, K.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SHARP, S.; SQUARES, R.; TAYLOR, K.; WARREN, T.; WLETZORREK, A.; WOODWARD, A.; BARRELL, B.G.; PARKHILL, J.; HOPWOOD, D.A. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Nature**, London, v. 417, p. 141-147, 2002.

BOT, A. N. M.; CURRIE, C. R.; HART, A. G.; BOOMSMA, J.J. Waste management in leaf-cutting ants. **Ethology, Ecology &Evolution**, Florence, v. 13, n. 3, p. 225-237, 2001.

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

BRANDÃO, C. R. F.;MAYHÉ-NUNES, A. J. A new fungus-growing ant genus, *Mycetagroicus* gen. n., with the description of three new species and comments on the monophyly of the Attini (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, Chico, v. 38, n. 3B, p.639-665, 2002.

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

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

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

CRAVEN, S. E.; DIX, M. W.; MICHAELS, G. E. Attine fungus gardens contain yeasts. **Science**, Washington, v. 169, n. 3941,p. 184-186, 1970.

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, 1999a.

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

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, 2001.

CURRIE, C. R. Ants, agriculture and antibiotics: A quadripartite symbiosis. In: SECKBACH, J. (ed.) **Symbiosis: mechanisms and model systems**. Dordrecht, Boston & London: Kluwer Academic Publisher, 2002, 796p.

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, 2003a.

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 Attini ant-microbe symbiosis. **Science**, Washington, v. 299, n. 5605, p. 386-388, 2003b.

DELLA LUCIA, T. M. C.; FOWLER, H. G. As formigas cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. **As formigas cortadeiras**. Viçosa, Editora folha de Viçosa, 1993, p. 1-3.

FELSENTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: na approach using the bootstrap. **Evolution: International Journal of Organic Evolution**, Boulder, v. 39, p. 783-791, 1985.

FISHER, P. J.; STRADLING, D. J.; SUTTON, B. C.; PETRINI, L. E. Microfungi in the fungus gardens of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*: a preliminary study. **Mycological Research**, Cambridge, v. 100, n. 5, p. 541-546, 1996.

FOURATI-BEN FGUIRA L., FOTSO S., BEN AMEUR-MEDHI R., MELLOULI L., LAATSCH H. Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp strain US80. **Research in Microbiology**, v.156, n. 3, p. 341-347, 2005.

GOODFELLOW, M.; CROSS, T. Classification. In: GOODFELLOW, M.; MORDARSKI, M.; WILLIAMS, S.T., **The Biology of the Actinomycetes**. Orlando: Academic Press, 1984. cap. 2; p. 7-164.

GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S.T.; MORDARSKI, M. Introduction to and importance of Actinomycetes. In: GOODFELLOW, S.T.; MORDARSKI, M; WILLIAMS M **The Biology of the Actinomycetes**. Orlando: Academic Press, 1984. cap. 1, p. 1-6.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. The ants. In: HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The fungus growers**. Cambridge: Harvard University. Press, 1990. cap. 17, p. 596-608.

KIM, Y. P.; TOMODA, H.; IIZIMA, K., FUKUDA, T.; MATSUMOTO, A.; TAKAHASHI, Y.; OMURA, S. Takanawaenes, novel antifungal antibiotics produced by *Streptomyces* sp K99-5278-I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. **Journal of Antibiotics**, ????, v. 56, n. 5, p. 448-453, 2003.

KIM, B. S.; OH, H.; KIM, S. Y.; PARK, J. A.; YOON, Y. J.; LEE, S. K., KIM, B. Y.; AHN, J. S. Identification and antibacterial activity of a new oleandomycin derivative from *Streptomyces antibioticus*. **Antibiot**, ????, v. 58, n. 3, p. 196-201, 2005.

VERTESY, L.; ARETZ, W.; EHLERS, E.; HAWSER, S.; ISERT, D.; KNAUF, M.; KURZ, M.; SCHIELL, M.; VOGEL, M.; WINK, J. 3874 H1 and H3, novel antifungal

heptaene antibiotics produced by *Streptomyces* sp HAG 003874. **Journal of Antibiotics**, ?????, v. 51, n. 10, p. 921-928, 1998.

KREISEL, H. Pilze aus pilzgärten von *Atta insularis* in Kuba. **Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie**, Berlin, v. 12, n. 8, p. 643-654, 1972.

KÜSTER, E.; WILLIAMS, S. T. Selection of media for isolation of *Streptomyces*. **Nature**, London, v. 202, p. 928-29, 1964.

LECHEVALIER, H. A.; LECHEVALIER, M. P. Introduction to the Order Actinomycetales. In: STARR, M.P.; STOLP, H.; TRÜPER, H.G.; BALOWS, A.; SCHLEGEL, H.G. **The Prokariotes, a handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria**. New York: Springer-Verlag, 1981. vol. II, cap. 147, p. 1915-1922.

MANFIO, G.P.; LEMOS, M.F. Biodiversidade: Microrganismos e Aplicações Industriais. Disponível em: <http://www.bdt.fat.org.br/publicacoes/padct/bio/cap9/4/gilson.html> . Acesso em: 15 de Setembro de 2004.

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

MONCIARDINI, P.; SOSIO, M.; CAVALETTI, L.; CHIOCCHINI, C.; DONADIO, S. New PCR primers for the selective amplification of 16S rDNA from different groups of actinomycetes. **FEMS Microbiology Ecology**. Amsterdam, v. 42, n. 3, p. 419-429, 2002.

MUCHOVEJ, J. J.; DELLA LUCIA, T. M. C. *Escovopsis*, a new genus from leaf cutting ant nests to replace *Phialocladus* nomem invalidum. ***Mycotaxon***, Ithaca, v. 37, p. 191-195, 1990.

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

MUELLER, U. G. Ant versus fungus versus mutualism: ant-cultivar conflict and the deconstruction of the attine ant-fungus symbiosis. ***American Naturalist***, Chicago, v. 160, suppl., p. S67-98, 2002.

MUELLER, U. G.; GERARDO, N. Fungus-farming insects: Multiple origins and diverse evolutionary histories. ***Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America***. Washington, v. 99, n. 24, p. 15247-15249, 2002.

OKAMI, Y.; HOTTA, K. Search and discovery of new antibiotics, In: GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S.T.; MORDARSKI, M. ***Actinomycetes in biotechnology***, San Diego: Academic Press, 1988. cap. 2, p. 33-68.

PADILHA, G. Biologia molecular de *Streptomyces* e aplicações industriais. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. ***Ecologia Microbiana***, Jaguariúma: EMBRAPA-CNPMA, 1998. cap. 13, p. 327-350.

PAGNOCCA, F. C.; CARREIRO, S. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J.; SILVA, O. A.; Microbiological changes in the nests of leaf-cutting ants fed on sesame leaves. ***Journal of Applied Entomology***, Hamburg, Alemanha, v. 120, p. 317-320, 1996.

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

POULSEN, M.; BOT, A. N. M.; CURRIE, C. R.; NIELSEN, M. G.; BOOSMSMA, J. J. Within-colony transmission and the cost of a mutualistic bacterium in the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus*. **Functional Ecology**, Oxford, v. 17, n. 2, p. 260-269, 2003.

QUINLAN, R. J.; CHERRETT, J. M. The role of fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.). **Ecological Entomology**, London, v. 4, p. 151-160, 1979.

RINTALA, H.; NEVALAINEN, A.; RÖNKÄ, E. SUUTARI, M. PCR primers targeting the 16S rRNA gene for the specific detection of streptomycetes. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 15, p. 337-347, 2001.

RODRIGUES, A. Ocorrência de fungos filamentosos em ninhos de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae) submetidos a tratamentos com iscas tóxicas. 2004. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 2004.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning. A laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANTOS, A. V.; DILLON, R. J.; DILLON, V. M.; REYNOLDS, S. E.; SAMUELS, R. I. Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **FEMS Microbiology Letters**, 2004 (no prelo).

SAS Institute Inc. 1996 SAS/STAT User's Guide Version 6, Fourth Edition. Volumes 1 e 2, Cary, NC: SAS Institute Inc.

SCHULTZ, T. R. Ants, plants and antibiotics. **Nature**, London, v. 398, n. 6730, p. 747-748, 1999.

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.

SEIFERT, K. A.; SAMSON, R. A.; CHAPELA, I. H. *Escovopsis aspergilloides*, a rediscovered hyphomycete from leaf-cutting ant nests. **Mycologia**, Bronx, v. 87, n. 3, p. 407-413, 1995.

SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D. Methods for Characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**. Washington, v. 16, p. 313-340, 1966.

SWOFFORD, D. L.; OLSEN, G. J.; WADDELE, P. J.; HILLIS, D. M. Phylogenetic inference. In: HILLS, D. M.; MORITIZ, C.; MABLE, B. K. **Molecular Systematics**. 2nd. Sunderland: Sinauer, 1996. p. 407-514.

SWOFFORD, D. L. Phylogenetic Analysis Using Parsimony, Version 4.0b4a. Champaign: Illinois Natural History Survey, 2000.

THEILLEUX, J. Los Actinomicetos. In: LEVEAU, J.Y.; BOUIX, M. **Microbiologia Industrial: Los Microorganismos de Interés Industrial**. Zaragoza: Acribia, 2000. cap. 6, p. 417-478.

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

WEBER, N. A. Pure cultures of fungi produced by ants. **Science**, Washington, v. 121, n. 3134, p. 109, 1955.

WEBER, N. A. Fungus-growing ants. **Science**, Washington, v. 121, n. 3763, p. 587-604, 1966.

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

WEBER, N. A. Fungus ants. In: HERMAN, H. R. (Ed). **Social Insects**, New York: Academic Press, v. 4, 1982. p. 255- 363.

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.

ZABOTTO, E. C. Isolamento e identificação de *Streptomyces* spp associados a ninhos de formigas do grupo Attini. 2003. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2003.