

RÔMULO AUGUSTO COTTA DÂNGELO

ACTINOMICETOS E FUNGOS SIMBIONTES: IMPLICAÇÕES PARA
FORMIGAS CORTADEIRAS DO GÊNERO *Acromyrmex* MAYR, 1865.

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-graduação em
Entomologia, para obtenção do
título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011

RÔMULO AUGUSTO COTTA DÂNGELO

ACTINOMICETOS E FUNGOS SIMBIONTES: IMPLICAÇÕES PARA
FORMIGAS CORTADEIRAS DO GÊNERO *Acromyrmex* MAYR, 1865.

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-graduação em
Entomologia, para obtenção do
título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 27 de Julho de 2011

Prof. Dr. Danival José de Souza
(Co-orientador)

Prof^a. Dra. Maria Augusta Lima Siqueira

Prof. Dr. Antônio Galvão do Nascimento

Prof^a. Dra. Terezinha M. C. Della Lucia
(Orientadora)

À toda minha família, especialmente aos meus pais, Francisco e Márcia, aos meus irmãos Carlos Henrique e Marco Antônio e ao meu avô José Maria de Almeida Cotta (“*In memoriam*”)...

Dedico

“Todas as vezes que se comprometerem a fazer algo na vida, procurem fazer do melhor modo, com honestidade, sinceridade e, acima de tudo, com bom senso e sensibilidade. Não se curve às críticas insensatas, descomedidas, de pessoas que nem sempre têm consciência do seu momento. Façam de suas vidas uma eterna conquista, rumo ao conhecimento, à grandeza de ser, à autenticidade e serão, sempre, vencedores.”

Mahatma Gandhi

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus, por ter me presenteado com a chance de fazer e concluir o mestrado após dois longos anos de incertezas e muito esforço, após minha graduação.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Entomologia, pela oportunidade de desenvolvimento desse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À minha orientadora, professora doutora Terezinha M.C. Della Lucia, pela amizade e orientação durante esses dois anos. Mais uma vez, obrigado pelos conselhos, broncas, paciência e ajuda nas revisões deste trabalho.

Ao professor doutor Danival José de Souza, que me apresentou ao mundo dos actinomicetos das formigas cortadeiras. Muito obrigado por me co-orientar. Sua amizade, paciência (enorme) e conselhos foram vitais para que esse trabalho fosse concluído.

Ao professor doutor Simon Luke Elliot, pelas idéias e ensinamentos como co-orientador.

Aos meus pais, Francisco e Márcia, pelo carinho e esforço incondicionais, por terem me dado uma vida espetacular, mesmo que nem sempre as condições fossem boas. Agradeço a vocês por terem compreendido minhas necessidades, apesar dos sacrifícios envolvidos. Seus ensinamentos durante toda a minha vida foram essenciais para me tornar o que sou hoje. Muito obrigado.

Aos meus irmãos e amigos, Marco Antônio e Carlos Henrique e à minhas cunhadas Maria Luísa e Adriana, pelo apoio, incentivo e conselhos valiosos durante essa jornada.

Aos amigos remanescentes da “Turma do Bozo” da Biologia 2002, Pablo, Diego, Adolfo, Raphael e Henrique. Menções especiais para meus “irmãos”, Fernanda, Diogo, Camilo e Daniela. Não tenho palavras para agradecer o companheirismo, conselhos e a tudo que me ensinaram durante esses anos.

Aos meus amigos do Santa Clara, Rafael, Diego, Emerson, Marcus, Júlio, Marcel, Vinícius, Bruno, Bruno Paulista, Almiro, Leandro, Luiz, Humberto, Samuel e Evandro. Valeu demais galera, pelo convívio, camaradagem e pelas boas risadas.

Ao pessoal do Insetário, Wágner, Lailla, Joel, Vanessa, Karina, Francielle e Bressane. Menção especial à Myriam Marques Ribeiro pelos conselhos e palpites na vida e na dissertação. Ao Sr. Manoel, por toda a ajuda nas mais diversas tarefas durante esse trabalho e pelos momentos alegres.

Aos amigos do laboratório de Manejo Integrado de Pragas, Júlio, Jander, Gérson, Mateus Chediak, Nílson, Rogério, Ricardo, Tarcísio, Vânia e Adriano, pela grande amizade. Agradeço também aqueles que já se despediram desse laboratório: Leandro Bacci, Flávio Fernandes, Elisangela de Moraes, Ézio Marques, Jardel Pereira, Pablo Gontijo e Mateus Campos.

A todos meus colegas e amigos da Entomologia, com menção especial a Fabrício Rainha Ribeiro, Renan Batista de Queiroz, Hudson Tomé Ventura, Silma Rocha e Luiza Carla Martins, pelos conselhos, risadas e convívio.

Ao Professor Dr. José Eduardo Serrão, pela cessão de seu laboratório e equipamentos para o preparo dos cortes histológicos.

Aos professores Dr. Antônio Galvão do Nascimento e Dr^a. Maria Augusta Lima Siqueira pela participação da banca deste trabalho.

Ao amigo Júlio Cláudio Martins pelo auxílio nas análises estatísticas deste trabalho.

Ao Dr. Harry Evans, pelo auxílio na identificação dos fungos.

À Dr^a. Thais Demarchi Mendes, analista da EMBRAPA Agroenergia, pelo sequenciamento dos actinomicetos deste trabalho.

Finalmente, a todos aqueles que direta ou indiretamente conviveram comigo e me ajudaram durante essa empreitada.

MUITO OBRIGADO

BIOGRAFIA

RÔMULO AUGUSTO COTTA DÂNGELO, terceiro filho de Francisco José Dângelo e Márcia Cotta Dângelo, nasceu em Ouro Preto, Minas Gerais, em 06 de Abril de 1984.

Concluiu o Ensino Médio em Dezembro de 2001, no Colégio Pitágoras em Viçosa, Minas Gerais.

Em março de 2002 iniciou o curso de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Viçosa. Em julho de 2007 graduou-se Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas

Em Julho de 2009, ingressou no curso de Mestrado em Entomologia na Universidade Federal de Viçosa, defendendo a dissertação em 27 de Julho de 2011.

Índice

RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xiii
1 – INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 – Formigas Cortadeiras e o gênero <i>Acromyrmex</i>	1
1.2 – Fungos associados a formigas cortadeiras.....	2
1.3 – Estratégias de higiene e defesa contra os fungos pelas formigas cortadeiras.....	5
1.4 – O Actinomiceto <i>Pseudonocardia</i>	6
2 – REFERÊNCIAS.....	9
CAPÍTULO I – Capacidade de inibição de actinomicetos presentes em formigas cortadeiras do gênero <i>Acromyrmex</i> Mayr, 1865.....	13
RESUMO.....	13
ABSTRACT	15
1 – INTRODUÇÃO	16
2 – MATERIAL E MÉTODOS.....	18
2.1 – Avaliação da atividade inibitória de actinomicetos sobre fungos	18
2.1.1 – Coleta das formigas.....	18
2.1.2 – Isolamento de fungos.....	18
2.1.3 – Culturas de actinomicetos.....	20
2.1.4 – Cultura do fungo parasita <i>Escovopsis</i> sp.	20
2.1.5 – Testes de Inibição	21
2.1.6 – Análises estatísticas.....	21
2.2 – Caracterização de bactérias por métodos moleculares	22
2.2.1 – Culturas de actinomicetos.....	22
2.2.2 – Extração de DNA genômico	22
2.2.3 – Amplificação – PCR	23
2.2.4 – Purificação dos produtos de amplificação	23
2.2.5 – Reação de sequenciamento e purificação do produto	24
2.2.6 – Sequenciamento do gene 16S rRNA	24
2.2.7 – Análise filogenética	25
3 – RESULTADOS	26
3.1 – Isolamento de fungos.....	26
3.2 – Testes de inibição	27
3.3 – Caracterização de bactérias por métodos moleculares	38
4 – DISCUSSÃO	39
5 – CONCLUSÕES	45
6 – REFERÊNCIAS.....	46
CAPÍTULO II – Ausência de estruturas especializadas de abrigo de actinomicetos no tegumento de três espécies de <i>Acromyrmex</i> : implicações na defesa	49
RESUMO.....	49
ABSTRACT	51
1 – INTRODUÇÃO	53

2 – MATERIAL E MÉTODOS	55
2.1 – Verificação da presença da estruturas especializadas no tegumento em espécies de Acromyrmex.....	55
2.1.1 – Coleta das formigas	55
2.1.2 – Histologia	55
2.2 – Tamanho da glândula metapleurale em espécies de Acromyrmex	56
3 – RESULTADOS	57
4 – DISCUSSÃO	62
5 – CONCLUSÕES	66
6 – REFERÊNCIAS.....	67
CONCLUSÕES GERAIS.....	69
ANEXOS	72

RESUMO

DÂNGELO, Rômulo Augusto Cotta. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2011. **Actinomicetos e fungos simbiotes: implicações para formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* MAYR, 1865.** Orientadora: Terezinha Maria Castro Della Lucia. Co-orientador: Danival José de Souza.

Insetos sociais estão sujeitos a uma grande variedade de patógenos, sendo que, aqueles que estão constantemente em contato com o solo, como formigas e cupins, são mais susceptíveis a parasitas e doenças. Durante a sua evolução, os insetos sociais desenvolveram vários mecanismos para evitar a contaminação por fungos e outros parasitas. Formigas cortadeiras estão sujeitas a uma variedade de fungos que podem comprometer os indivíduos da colônia ou o fungo simbiote basidiomiceto *Leucoagaricus gongylophorus*, usado como fonte primária de nutrientes para esses insetos. Alguns desses patógenos são fungos parasitas do jardim de fungo do gênero *Escovopsis*. Pesquisas recentes sugerem que as cortadeiras apresentam um segundo grupo de mutualistas, actinomicetos do gênero *Pseudonocardia* que produzem metabólitos secundários com propriedades antimicrobianas específicas contra *Escovopsis*. Ainda segundo esses trabalhos, esses actinomicetos se alojam em estruturas especializadas no tegumento das cortadeiras, onde recebem nutrientes através de glândulas exógenas, o que possibilitaria o desenvolvimento desses microrganismos. Dessa forma, objetivou-se com esse trabalho: 1) isolar linhagens de actinomicetos e avaliar o grau de inibição desses organismos sobre fungos presentes em colônias de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* coletadas em Viçosa-MG; 2) identificar e verificar o grau de similaridade de diferentes linhagens de actinomicetos simbiotes presentes em formigas de mesmo gênero; 3) verificar a presença de estruturas especializadas que poderiam abrigar actinomicetos em três espécies de formigas cortadeiras; e 4) determinar a implicação da ausência dessas estruturas para as cortadeiras. Nos testes de inibição, isolaram-se actinomicetos de cinco espécies de cortadeiras do gênero *Acromyrmex* e mediu-se a inibição contra os quatro fungos encontrados mais frequentemente no corpo dessas mesmas espécies de cortadeiras, além de *Escovopsis* sp., durante 10 dias. Analisando-se diferentes linhagens de actinomicetos simbiotes isolados de

cortadeiras, foi verificado que, dependendo dessa estirpe, pode haver um efeito antibiótico ou estimulatório contra fungos, entomopatogênicos ou não. Concluiu-se que acréscimos e decréscimos nas taxas de inibição ao longo dos dias podem estar relacionados ao papel que os metabólitos secundários terão sobre os fungos. Utilizaram-se marcadores moleculares para identificar seis isolados de actinomicetos obtidos de cinco espécies de cortadeiras. Cinco espécies de dois gêneros puderam ser identificadas: uma de *Streptomyces*, isolada da formiga *Ac. balzani* e quatro de *Pseudonocardia*, obtida das outras espécies avaliadas. Finalmente, com o intuito de se verificar a presença de estruturas especializadas que abrigam actinomicetos em *Acromyrmex* e determinar qual a implicação de sua ausência, realizaram-se cortes histológicos de operárias de diferentes tamanhos das espécies *Ac. disciger*, *Ac. subterraneus subterraneus* e da parasita social *Ac. ameliae*. Além disso, comparou-se o tamanho proporcional da glândula metapleurar nessas três espécies. Obteve-se que operárias de diferentes tamanhos de formigas cortadeiras das espécies estudadas não apresentam nenhuma cavidade especializada onde seja possível a alocação de actinomicetos nas regiões da cabeça, tórax ou gáster. Em *Ac. subterraneus subterraneus* é possível que glândulas exócrinas liberem suas secreções diretamente sobre a superfície do tegumento, viabilizando a presença dos actinomicetos nesses locais. Apesar de não possuir uma camada visível de actinomicetos sobre o corpo, *Ac. disciger* apresenta grande quantidade de pelos, além do maior tamanho da glândula metapleurar dentre as espécies analisadas. *Ac. ameliae* também não possui revestimento de actinomicetos sobre o corpo, e, possivelmente, direciona energia em parasitar a colônia e explorar as defesas de sua hospedeira. Assim, pode haver um “trade-off” entre as diferentes estratégias de defesa empregadas pelas cortadeiras.

ABSTRACT

DÂNGELO, Rômulo Augusto Cotta. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, July, 2011. **Actinomicetes and symbiotic fungi: implications for leaf-cutting antes of the genus *Acromyrmex* MAYR, 1865.** Advisor: Terezinha Maria Castro Della Lucia. Co-advisor: Danival José de Souza.

Social insects are subjected to a great variety of pathogens, and those who is constantly in contact with the soil, as the ants and the térmites, are more susceptible to parasites and diseases. During the course of the evolutionary history, social insects developed many machanisms to avoid the contamination by fungi and other parasites. Leaf-cutting ants are sojected to a variety off ungi that can affect individuals of the colony or the symbiotic basidiomycete fungus *Leucoararicus gongylophorus*, which is used as the primary source of nutrients for these insects. Some of these pathogens are parasitic fungi of the fungus garden of the genus *Escovopsis*. Recent reseach suggests that these ants show a second mutualist group, actinomycetes of the genus *Pseudonocardia* that produce secondary metabolites with specific antimicrobial properties against *Escovopsis*. Also, according with these studies, these actinomycetes are housed in specialized structures in the integument of the leaf-cutting ants, where they receive nutrients through exogenous glands, which would allow the development of these microorganisms. Thus, the objectives of this work were: 1) isolate actinomycetes strains and evaluate the degree of inhibition of these organisms on the fungi present in colonies of leaf-cutting ants of the genus *Acromyrmex* collected in Viçosa-MG; 2) identify and verify the similarity degree of different strains of symbiotic actinomycetes present in ants of the same genus; 3) verify the presence of specialized structures that could harbor actinomycetes in three species of leaf-cutting ants; e 4) determine the implication of the absence of these structures for these ants. In the inhibition tests, actinomycetes of five species of the genus *Acromyrmex* was isolated and inhibition was measured against the four more common fungi found in the body of these same kinds of ants, as well as *Escovopsis* sp., during 10 days. Analyzing different symbiotic actinomycetes strains isolated from leaf-cutting ants, it was found that, depending on this strain, there may be na an antibiotic or a stimulatory effect against fungi,

entomopathogenic or not. It was concluded that increases and decreases in the rates of inhibition throughout the days may be related to the role that secondary metabolites have on fungus. Molecular markers were used to identify six actinomycetes obtained from five species of leaf-cutting ants. Five species of two genera of these microorganisms could be identified: *Streptomyces*, isolated from the ant *Ac. balzani* and four different *Pseudonocardia* strains, obtained from other species evaluated. Finally, in order to verify the presence of specialized structures that could harbor actinomycetes and determine the implications of its absence, histological sections were performed on workers of different sizes of the species *Ac. disciger*, *Ac. subterraneus subterraneus* and social parasite *Ac. ameliae*. In addition, the proportional size of the metapleural gland in these three species was compared. It was found that workers of different sizes of the species of leaf-cutting ants studied do not have any specialized cavity where it is possible the allocation of actinomycetes in the head, thorax or gaster. In the specie *Ac. subterraneus subterraneus* is possible that exocrine glands release their secretions directly in the surface of the tegument, allowing the presence of the actinomycetes in these locations. Although *Ac. disciger* does not have a visible layer of actinomycete on the body, this specie feature lots of hair, as well as the largest metapleural gland among the analyzed species. *Ac. ameliae*, also, has no coat of actinomycetes on the body, and possibly direct its energy in parasite the colonies and explore the defenses of its host. Thus, there may be a trade off between the different defense strategies employed by the leaf-cutting ants.

1 – INTRODUÇÃO GERAL

1.1 – Formigas Cortadeiras e o gênero *Acromyrmex*

As formigas cultivadoras de fungo (Formicidae: Myrmicinae, Attini) são um grupo que abrange mais de 250 espécies, divididas entre 15 gêneros, sendo a maioria delas neotropicais com algumas poucas espécies ocorrendo na região Neoártica (Mayhé–Nunes & Jaffé, 1995; Schultz & Meier, 1995; Schultz *et al.*, 2005). São consideradas indivíduos eussociais, uma vez que apresentam cuidado parental com a prole, divisão do trabalho reprodutivo e sobreposição de gerações dentro do ninho. Esse tipo de organização social, unindo-se ao fato de esses insetos dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* possuírem o hábito de cortarem e transportarem folhas e flores para seus ninhos faz com que as cortadeiras sejam consideradas uma das pragas predominantes em ecossistemas tropicais (Cherrett, 1986; Della Lucia & Fowler, 1993).

Uma das características marcantes desse grupo é o hábito de cultivarem um fungo e se alimentarem dele. O material vegetal coletado, geralmente fresco, é transportado em pequenos fragmentos pelas formigas operárias para o ninho, onde é utilizado como substrato para o crescimento do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* (Möller, 1893). Esse fungo é a fonte primária de nutrientes para os indivíduos jovens e fonte de açúcares hidrolisados de plantas para os adultos (Weber, 1972; Hölldobler & Wilson, 1990; Silva *et al.*, 2003).

Formigas do gênero *Acromyrmex* possuem colônias compostas de dezenas de milhares de indivíduos e podem ocupar uma área de ninho de até 20 m² (Hölldobler & Wilson, 1990; Della Lucia & Moreira, 1993; Wetterer, 1999).

Cortadeiras desse gênero, também conhecidas como quem-quéns, possuem como característica principal a presença de quatro ou mais pares de espinhos dorsais e são consideradas indivíduos generalistas quanto ao corte. São próprias da América do Sul, ocorrendo na grande maioria dos países desse continente (Gonçalves, 1961; Mariconi, 1970). Somente no Brasil são encontradas 20 espécies desse gênero (Mayhé-Nunes, 1991), desde o extremo norte até o sul do País.

1.2 – Fungos associados a formigas cortadeiras

Insetos sociais estão sujeitos a uma grande variedade de patógenos, sendo que, aqueles que estão constantemente em contato com o solo, como formigas e cupins, são mais susceptíveis a parasitas e doenças (Boomsma *et al.*, 2005). Os parasitas podem ser divididos em grupos seguindo alguns critérios, como por exemplo, seu tamanho (microparasitas e macroparasitas) e seus hospedeiros (generalistas e especialistas) (Boomsma *et al.*, 2005).

O tamanho pequeno, o tempo de geração curto e as altas taxas de crescimento são fatores de fundamental importância para os microparasitas, pois podem levá-los a vencer a corrida armamentista evolutiva contra seus hospedeiros (Anderson & May, 1979; Anderson & May, 1981; Hoffmann *et al.*, 2008). O tamanho reduzido dos microparasitas, como vírus, bactérias, protozoários e fungos, está diretamente relacionado com as vias utilizadas para penetração no hospedeiro. A transmissão pode ocorrer via oral, através de compartilhamento de alimento regurgitado e ingestão de excrementos, ou

penetração através da cutícula, e de outras aberturas do corpo como os espiráculos das traquéias (Andreadis, 1987; Boomsma *et al.*, 2005).

O estilo de vida social aumenta a susceptibilidade à patógenos. O fato de indivíduos de uma colônia viverem muito próximos possibilita que tanto a quantidade de recursos a ser explorada pelos parasitas quanto a facilidade de transmissão para outros hospedeiros seja garantida (Schmid-Hempel, 1998; Baer *et al.*, 2005; Boomsma *et al.*, 2005; Begon *et al.*, 2007). Além disso, numa colônia onde há baixa diversidade genética entre seus membros, haverá maior facilidade de adaptação do parasita a uma variedade de genótipos mais restrita do hospedeiro (Schmid-Hempel, 1998; Hughes & Boomsma, 2006; Cremer *et al.*, 2007).

Infecções especificamente realizadas por fungos podem ser visíveis quando as hifas crescem sobre o tegumento de insetos. Em condições de alta umidade e temperatura, seus esporos, presentes no solo, iniciam ciclos epidemiológicos que afetam sucessivas gerações de insetos sociais (Schmid-Hempel, 1998). Em formigas, de forma geral, existem certas evidências de que esses fungos são bastante virulentos e comuns (Evans, 1982; Evans & Samson, 1984; Schmid-Hempel, 1998). Alguns desses patógenos, inclusive, têm o potencial para explorar vários hospedeiros, enquanto outros podem apresentar comportamento multimodal, ou seja, capacidade de alternância de sua atividade biológica (Lopez-Llorca & Jansson, 2007; Roy *et al.*, 2009). Fungos endofíticos, por exemplo, podem tanto atuar como patógenos, serem benéficos para formigas cortadeiras e/ou para o jardim de fungo ou ainda serem hóspedes transitórios com nenhuma consequência para as formigas (Poulsen & Currie, 2006; Van Bael *et al.*, 2009).

Os fungos entomopatogênicos são um dos principais inimigos naturais das formigas. Este grupo pertence, em sua maioria, às ordens Hypocreales (dentro do filo Ascomycota) e Entomophthorales (Humber, 2008; Blackwell, 2010). Eles são capazes de infectar e causar doenças em insetos e várias espécies de ácaros, auxiliando, dessa forma, no controle de pragas com baixos efeitos negativos sobre o ambiente (Vestergaard *et al.*, 2003). Utilizando-se dessas características, a indústria de pesticidas tem voltado sua atenção para a produção de inseticidas biológicos formulados à base dos fungos entomopatogênicos. Segundo De Faria & Wraight (2007), no ano de 2006, 129 tipos de micoinseticidas já estavam disponíveis para comercialização no mundo. A maioria dos fungos usados nesses produtos são ascomicetos incluindo *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria fumosorosea* e *Lecanicillium* sp.

As formigas cortadeiras também possuem como antagonistas, porém de forma indireta, fungos que sobrevivem à custa do micélio de outros fungos, denominados micoparasitas. O jardim de fungo das formigas cortadeiras é hospedeiro de fungos especialistas do gênero *Escovopsis* (Currie *et al.*, 1999a). Esses parasitas são capazes de desenvolver um estado de infecção contínuo, reduzindo as taxas de crescimento do fungo cultivado pelas formigas, até devastá-lo completamente (Currie *et al.*, 1999a; Currie, 2001). Essa forma de infecção caracteriza *Escovopsis* spp. como sendo fungos necrotróficos, ou seja, parasitas que matam seus hospedeiros e, posteriormente, consomem suas biomassas mortas (Reynolds & Currie, 2004).

1.3 – Estratégias de higiene e defesa contra os fungos pelas formigas cortadeiras

Durante a sua evolução, os insetos sociais desenvolveram vários mecanismos para evitar a contaminação por fungos e outros parasitas. As formigas cortadeiras possuem relativamente poucas doenças, pois são dotadas de defesas comportamentais e fisiológicas eficientes que, além de protegê-las, evitam que o fungo simbiote seja comprometido (Hölldobler & Wilson, 1990; Schmid-Hempel, 1998; Poulsen *et al.*, 2006). O “grooming” (lambadura) constitui um exemplo de estratégia comportamental utilizada pelas formigas cortadeiras, que auxilia na remoção externa de parasitas, esporos e outros estágios infecciosos do próprio corpo (“autogrooming”) ou de uma companheira de ninho (“alogrooming”) (Schmid-Hempel, 1998; Hughes *et al.*, 2002). Ademais, formigas cortadeiras possuem a habilidade de remover patógenos potencialmente danosos ao jardim de fungos por meio de sua lambadura (“fungus grooming”) (Currie & Stuart, 2001).

Uma das principais defesas fisiológicas utilizadas pelas formigas cortadeiras é a produção de secreções antimicrobianas, destacando-se aquelas advindas da glândula metapleurale que está situada no fim da região posterolateral do mesossoma (Bot *et al.*, 2002; Poulsen *et al.*, 2002; Fernández-Marín *et al.*, 2006). Tal glândula, exclusiva das formigas, é composta por estruturas pares que formam um abaulamento pronunciado com uma fenda para o exterior do corpo da formiga (Hölldobler & Engel-Siegel, 1984). Outra medida empregada para prevenir a transmissão de patógenos é o sistema imune inato do hospedeiro (Cremer *et al.*, 2007). A sua ativação ocorre através de um processo de reconhecimento de

antígeno específico capaz de detectar os diferentes componentes de microrganismos (de Souza *et al.*, 2008).

Estudos recentes demonstraram que formigas cortadeiras possuem estratégias de defesa em que são utilizadas associações com bactérias produtoras de antibióticos, os quais protegem as colônias contra gêneros específicos de fungos (Currie *et al.*, 1999b; Currie *et al.*, 2003a). Dentre essas bactérias, o actinomiceto predominante é do gênero *Pseudonocardia*. Esse actinomiceto será abordado com maiores detalhes no próximo tópico. Além desse gênero, outros microrganismos potencialmente produtores de antibióticos estão presentes tanto em formigas cortadeiras quanto em seus ninhos. São eles as bactérias *Amycolatopsis*, *Streptomyces*, *Gordonia*, *Mycobacterium*, *Microlunatus*, *Dermococcus*, e *Burkholderia* sp. (Santos *et al.*, 2004; Mueller *et al.*, 2008; Haeder *et al.*, 2009; Sen *et al.*, 2009), leveduras associadas ao jardim de fungos (Rodrigues *et al.*, 2009), dentre vários outros.

1.4 – O Actinomiceto *Pseudonocardia*

Formigas cortadeiras exibem uma complexa relação simbiótica com diversos microrganismos. Além do jardim de fungo e o fungo parasita *Escovopsis*, Currie *et al.* (1999b) descreveram que formigas cortadeiras apresentam sobre seu tegumento um revestimento esbranquiçado, formado por actinomicetos. Estes foram inicialmente classificados como sendo do gênero *Streptomyces*, porém, utilizando-se técnicas de filogenia, o gênero foi reclassificado para *Pseudonocardia* (Cafaro & Currie, 2005). Esses organismos secretam antibióticos específicos que inibem o crescimento do fungo parasita *Escovopsis* (Currie *et al.*,

1999b); somente há poucos anos foi caracterizado o primeiro antibiótico produzido por *Pseudonocardia*: o depsipeptídeo Dentigerumicina (Oh *et al.*, 2009). Segundo Currie *et al.* (2003b), colônias com actinomiceto possuem menor prevalência de *Escovopsis* e perdem menos biomassa do jardim de fungo em comparação com colônias nas quais *Pseudonocardia* está ausente, demonstrando que esse microrganismo desempenha papel crucial dentro do formigueiro.

Aparentemente, as *Pseudonocardia* se hospedam em modificações cuticulares especializadas das formigas denominadas fôveas e recebem nutrientes através de secreções da glândula epicuticular bicelular (Currie *et al.*, 2006). Currie *et al.* (1999b) descreveram que esse actinomiceto é transmitido de forma vertical, ou seja, entre uma colônia e a sua descendente, no momento da revoada. Segundo esses autores, as rainhas adquirem o inóculo da bactéria da sua colônia natal e o depositam em sua cavidade bucal, juntamente com uma pequena quantidade do jardim de fungo. Após a revoada, quando há a formação do novo formigueiro, as rainhas regurgitam o conteúdo bucal, iniciando-se a nova colônia de *Pseudonocardia* e de *Leucoagaricus gongylophorus*. No entanto, alguns trabalhos vêm contrapondo essa idéia. Sen *et al.* (2009) encontraram em machos de formigas cortadeiras quantidades significativas de *Pseudonocardia* das mesmas espécies daquelas encontradas em operárias do mesmo ninho. Essas bactérias seriam derivadas diretamente tanto dessas operárias quanto de uma fonte comum como o solo ou plantas. Isso seria um indício de que tanto machos, no momento do acasalamento, quanto as operárias, quando estão forrageando, podem ser potenciais vetores de *Pseudonocardia*, caracterizando dessa forma a transmissão horizontal desse actinomiceto.

Na tentativa de resolver essa divergência, trabalhos vêm se utilizando dos avanços da biologia molecular, notadamente das novas técnicas de sequenciamento, para sequenciar e comparar o gene 16S rRNA e o gene do fator de alongação Tu. No entanto, não existe um consenso sobre a especificidade da relação simbiote-hospedeiro e sobre as formas de transmissão do simbiote. Trabalhos como Cafaro & Currie (2005) e Cafaro *et al.* (2010) concluíram que há uma relação restrita entre linhagens de *Pseudonocardia* e formigas cortadeiras. Já outros como Mueller *et al.* (2008) e Mueller *et al.* (2010) descrevem que não há especificidade na relação entre os organismos, apontando que as linhagens de bactérias são transmitidas de forma horizontal. Assim, os objetivos deste trabalho foram: 1) isolar linhagens de actinomicetos e avaliar o grau de inibição desses organismos sobre fungos presentes em colônias de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* coletadas em Viçosa-MG; 2) identificar e verificar o grau de similaridade de diferentes linhagens de actinomicetos simbiotes presentes em formigas de mesmo gênero; 3) verificar a presença de estruturas especializadas que poderiam abrigar actinomicetos em três espécies de formigas cortadeiras; e 4) determinar a implicação da ausência dessas estruturas para as cortadeiras.

2 – REFERÊNCIAS

- Anderson RM, May RM (1979). Population biology of infectious diseases. Part I. *Nature* 280:361-367.
- Anderson RM, May RM (1981). The population dynamics of microparasites and their invertebrate hosts. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 291:451-524.
- Andreadis TG (1987). Transmission. In: Fuxa JR, Tanada Y (eds.). *Epizootiology of insect diseases*. Wiley, New York. pp. 159-176.
- Baer B, Krug A, Boomsma JJ, Hughes WOH (2005). Examination of the immune responses of males and workers of the leafcutting ant *Acromyrmex echinator* and the effect of infection. *Insectes Sociaux* 52:298-303.
- Begon M, Townsend CR, Harper J (2007). *Ecologia: de indivíduos a ecossistemas*. Artmed, Porto Alegre. 752 pp.
- Blackwell M (2010). Fungal evolution and taxonomy. *BioControl* 55:7-16.
- Boomsma JJ, Schmid-Hempel P, Hughes WOH (2005). Life histories and parasite pressure across the major groups of social insects. In: Fellowes MHG, Rolff J (eds.). *Insect evolutionary ecology*. CABI, Oxon, UK. pp. 139-176.
- Bot ANM, Ortiús-Lechner D, Finster K, Maile R, Boomsma JJ (2002). Variable sensitivity of fungi and bacteria to compounds produced by the metapleural glands of leaf-cutting ants. *Insectes Sociaux* 49:363-370.
- Cafaro MJ, Currie CR (2005). Phylogenetic analysis of mutualistic filamentous bacteria associated with fungus-growing ants. *Canadian Journal of Microbiology* 51:441-446.
- Cafaro MJ, Poulsen M, Little AEF, Price SL, Gerardo NM, Wong B, Stuart BL, Abbot P, Currie CR (2010). Specificity in the symbiotic association between fungus-growing ants and protective *Pseudonocardia* bacteria. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. Published online before print November 24, 2010, doi:10.1098/rspb.2010.2118.
- Cherrett JM (1986). History of the leaf-cutting ant problems. In: Lofgren CS, Vander Meer RK (eds.). *Fire ants and leaf cutting ants: biology and management*. Boulder, Westview Press. pp.10-17.
- Cremer S, Armitage SA, Schmid-Hempel P (2007). Social immunity. *Current Biology* 17:R693-702.
- Currie CR, Mueller UG, Malloch D (1999a). The agricultural pathology of ant fungus gardens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)* 96:7998-8002.
- Currie CR, Scott JA, Summerbell RC, Malloch D (1999b). Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *Nature* 398:701-704.
- Currie CR (2001). Prevalence and impact of a virulent parasite on a tripartite mutualism. *Oecologia* 128:99-106.

Currie CR, Stuart AE (2001). Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 263:339-344.

Currie CR, Wong B, Stuart AE, Schultz TR, Rehner SA, Mueller UG, Sung GH, Spatafora JW, Straus NA (2003a). Ancient tripartite coevolution in the attine ant-microbe symbiosis. *Science* 299:386-388.

Currie CR, Bot ANM, Boomsma JJ (2003b). Experimental evidence of a tripartite mutualism: bacteria protect ant fungus gardens from specialized parasites. *Oikos* 101(1):91-102.

Currie CR, Poulsen M, Mendenhall J, Boomsma JJ, Billen J (2006). Coevolved crypts and exocrine glands support mutualistic bacteria in fungus-growing ants. *Science* 311, 81-83.

de Faria MR, Wraight SP (2007). Mycoinsecticides and Mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control* 43:237-256.

de Souza DJ, Van Vlaenderen J, Moret Y, Lenoir A (2008). Immune response affects ant trophallactic behaviour. *Journal of Insect Physiology* 54:828-832.

Della Lucia TMC, Fowler HG (1993). As formigas cortadeiras. In: Della Lucia TMC. As formigas cortadeiras. Viçosa: Imprensa Universitária, 264 pp.

Della Lucia TMC, Moreira DDO (1993). Caracterização de ninhos. In: Della Lucia TMC. As formigas cortadeiras. Viçosa: Imprensa Universitária, 264 pp.

Evans HC (1982). Entomogenous fungi in tropical forest ecosystems: An appraisal. *Ecological Entomology* 7:47-60.

Evans HC, Samson RA (1984). *Cordyceps* spp. and their anamorph pathogenic on ants (Formicidae) in tropical forest ecosystems. I. The *Cephalotes* (Myrmicinae) complex. *Transactions of the British Mycological Society* 79:431-453.

Fernández-Marín H, Zimmerman JK, Rehner SA, Wcislo WT (2006). Active use of metapleural glands by ants in controlling fungal infection. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 273:1689-1695.

Gonçalves CR (1961). O Gênero *Acromyrmex* no Brasil. *Studia Entomologica* 1:113-180.

Haeder S, Wirth R, Herz H, Spiteller D (2009). Candidicin-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 (PNAS)* 106: 4742-4746.

Hoffman EA, Kovacs JL, Goodisman MAD (2008). Genetic structure and breeding system in a social wasp and its social parasite. *BMC Evolutionary Biology* 8: Art. 239.

Hölldobler B, Engel-Siegel H (1984). On the metapleural gland of ants. *Psyche* 91:201-24.

Hölldobler B, Wilson EO (1990). *The Ants*. Harvard University Press, Cambridge, MA. 782 pp.

Hughes WOH, Boomsma JJ (2006). Does genetic diversity hinder parasite evolution in social insect colonies? *Journal of Evolutionary Biology* 19:132-143.

Hughes WOH, Eilenberg J, Boomsma JJ (2002). Trade-offs in group living: transmission and disease resistance in leaf-cutting ants. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 269:1811-1819.

Humber RA (2008). Evolution of entomopathogenicity in fungi. *Journal of Invertebrate Pathology* 98:262-266.

Lopez-Llorca LV, Jansson HB (2007). Fungal parasites in invertebrates: multimodal biocontrol agents? In: Robson GD, van Vest P, Gadd GM (eds.). *Exploitation of Fungi*. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 310-335.

Mariconi FAM (1970). *As saúvas*. Agronômica Ceres. São Paulo. 167pp.

Mayhé-Nunes AJ (1991). Estudo de *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae) com ocorrência constatada no Brasil: subsídios para uma análise filogenética. Dissertação (Mestrado) - Entomologia. Viçosa: UFV. 122 pp.

Mayhé-Nunes AJ, Jaffé K (1995). Filogenia dos Attini. In: Encontro de Mirmecologia, 12, São Leopoldo. Anais. São Leopoldo: Unisinos. pp. 55-59.

Möller A (1893). Die Pilzgärten einiger südamerikanischer Ameisen. *Botanische Mitteilungen aus den Tropen* 6:1-127.

Mueller UG, Dash D, Rabeling C, Rodrigues A (2008). Coevolution between Attine ants and actinomycete bacteria: A reevaluation. *Evolution* 62:2894-2912.

Mueller UG, Ishak H, Lee JC, Sen R, Gutell RR (2010). Placement of attine ant-associated *Pseudonocardia* in a global *Pseudonocardia* phylogeny (Pseudonocardiaceae: Actinomycetales): a test of two symbiont-association models. *Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology* 98:195-212.

Oh DC, Poulsen M, Currie CR, Clardy J (2009). Dentigerumycin, the bacterially produced molecular mediator of a fungus-growing ant symbiosis. *Nature Chemical Biology* 5:391-393.

Poulsen M, Bot ANM, Nielsen MG, Boomsma JJ (2002). Experimental evidence for the costs and hygienic significance of the antibiotic metapleural gland secretion in leaf-cutting ants. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 52:151-157.

Poulsen M, Currie CR (2006). Complexity of insect–fungal interactions: exploring the influence of microorganisms on attine ant–fungus associations. In: Bourtzis K, Miller TA (eds.). *Insect symbiosis v. 2*. CRC Press. Boca Raton, FL. pp. 57-77.

Poulsen M, Hughes WOH, Boomsma JJ (2006). Differential resistance and the importance of antibiotic production in *Acromyrmex echinator* leaf-cutting ant castes towards the entomopathogenic fungus *Aspergillus nomius*. *Insectes Sociaux* 53:349-355.

Reynolds HT, Currie CR (2004). Pathogenicity of *Escovopsis*: the parasite of the attine ant-microbe symbiosis directly consumes the ant cultivated fungus. *Mycologia* 96:955-959.

- Rodrigues A, Cable RN, Mueller UG, Bacci M, Pagnocca FC (2009). Antagonistic interactions between garden yeasts and microfungal garden pathogens of leaf-cutting ants. *Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology* 96:331-342.
- Roy HE, Hails RS, Hesketh H, Roy DB, Pell JK (2009). Beyond biological control: non-pest insects and their pathogens in a changing world. *Insect Conservation and Biodiversity* 2:65-72.
- Santos AV, Dillon RJ, Dillon VM, Reynolds SE, Samuels RI (2004). Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leafcutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *FEMS Microbiology Letters* 239:319-323.
- Schultz TR, Meier R (1995). A phylogenetic analysis of the fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini) based on morphological characters of the larvae. *Systematic Entomology* 20:337-370.
- Schultz TR, Mueller UG, Currie CR, Rehner SA, Vega F, Blackwell M (2005). Reciprocal illumination: A comparison of agriculture in humans and ants. In: Vega F, Blackwell M (eds). *Ecological and Evolutionary Advances in Insect-Fungal Associations*. Oxford Univ Press, New York. pp. 149-190.
- Schmid-Hempel P (1998). *Parasites in social insects*. Princeton University Press, Princeton. 409 pp.
- Sen R, Ishak HD, Estrada D, Dowd SE, Hong E, Mueller UG (2009). 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 (PNAS)* 106:17805-17810.
- Silva A, Bacci Jr. M, Siqueira CG, Bueno OC, Pagnocca FC, Hebling MJA (2003). Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. *Journal of Insect Physiology* 49:307-313.
- Van Bael SA, Fernández-Marín H, Valencia MC, Rojas EI, Wcislo WT, Herre EA. (2009). Two fungal symbioses collide: endophytic fungi are not welcome in leaf-cutting ant gardens. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 276:2419-2426.
- Vestergaard S, Cherry A, Keller S, Goettel M (2003). Safety of hyphomycete fungi as microbial control agents. In: Hokkanen HMT, Hajek AE (eds.). *Environmental impacts of microbial insecticides*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp 35-62.
- Weber NA (1972). *Gardening ants: The Attines*. American Philosophical Society, Philadelphia. 146pp.
- Wetterer JK (1999). The ecology and evolution of worker size-distribution in leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology* 34:119-144.

CAPÍTULO I

Capacidade de inibição de actinomicetos presentes em formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* Mayr, 1865

RESUMO

Formigas cortadeiras têm uma simbiose obrigatória com o fungo *Leucoagaricus gongylophorus*, utilizado como a principal fonte de alimento para esses insetos. Contudo, diversos fungos não-mutualísticos considerados danosos ao jardim de fungo ou às próprias formigas podem ser encontrados no interior do ninho, como por exemplo, fungos parasitas do jardim de fungo pertencentes ao gênero *Escovopsis*. Actinomicetos do gênero *Pseudonocardia* são um segundo mutualista dessa rede simbiótica. Cogita-se que esses microrganismos produzam metabólitos secundários com propriedades antimicrobianas específicas contra o fungo necrotrófico *Escovopsis*. Assim, os objetivos deste trabalho foram: 1) isolar linhagens de actinomicetos e avaliar o grau de inibição desses organismos sobre fungos presentes em colônias de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex*; e 2) identificar e verificar o grau de similaridade de diferentes linhagens de actinomicetos simbiotes presentes em formigas de mesmo gênero. Isolaram-se actinomicetos de cinco espécies de cortadeiras do gênero *Acromyrmex* e mediu-se a inibição contra os quatro fungos encontrados mais frequentemente sobre as mesmas espécies de cortadeiras, além de *Escovopsis* sp., durante 10 dias. Marcadores moleculares foram utilizados para identificar seis linhagens de actinomicetos obtidos de cinco espécies de cortadeiras. Verificou-se que dependendo da linhagem, actinomicetos simbiotes podem ter papel protetor ou estimulatório sobre diversos fungos em contato com formigas cortadeiras, e não somente *Escovopsis*. Concluiu-se que variações nas taxas de inibição durante os dias podem estar relacionadas ao papel que os metabólitos secundários terão sobre os fungos. Além disso, constatou-se que linhagens de actinomicetos

isolados de cada uma das espécies de cortadeiras constituíam espécies diferentes e não sequenciadas anteriormente. O isolado da formiga *Acromyrmex balzani* foi identificado como do gênero *Streptomyces*, enquanto os demais, obtidos das outras espécies, foram identificados como diferentes linhagens de actinomicetos pertencentes ao gênero *Pseudonocardia*.

Capacity of inhibition of actinomycetes present in the leaf-cutting ants genus *Acromyrmex* Mayr, 1865

ABSTRACT

Leaf-cutting ants have an obligatory symbiosis with the fungus *Leucoagaricus gongylophorus*, used as a primary source of food for these insects. However, several non-mutualistic fungi considered harmful to the fungus garden or to the ants may be found inside the nest, such as the parasitic fungi of the fungus garden, *Escovopsis*. Actinomycetes of the genus *Pseudonocardia* are a second mutualist of this symbiotic network. These microorganisms are discussed as producers of secondary metabolites with antimicrobial properties against specific necrotrophic fungus *Escovopsis*. The objectives of this study were: 1) isolate actinomycetes strains and evaluate the degree of inhibition of these organisms on fungi present in colonies of leaf-cutting ants of the genus *Acromyrmex*, and 2) identify and verify the degree of similarity of different strains of actinomycetes symbionts present in ants of the same genus. Actinomycetes were isolated from five species of ants of the genus *Acromyrmex* and inhibition was measured against the four fungi found more frequently on the same kinds of ants, as well as *Escovopsis* sp. for 10 days. Molecular markers were used to identify six strains of actinomycetes obtained from five species of ants. It was found that depending on the strain, actinomycete symbionts may have stimulatory or protective role of several fungi in contact with leaf-cutting ants, and not only *Escovopsis*. It was concluded that variations in the rates of inhibition during the days may be related to the role that secondary metabolites have on the fungus. Moreover, it was found that strains of actinomycetes isolated from each species of ant constitute different species not sequenced before. The isolate from the ant *Acromyrmex balzani* has been identified as the genus *Streptomyces*, while the others obtained from other species were identified as different strains of actinomycetes belonging to the genus *Pseudonocardia*.

1 – INTRODUÇÃO

Formigas cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae: Attini) possuem uma associação obrigatória com o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* (Família Lepiotaceae) que se originou entre 50 e 65 milhões de anos (Wilson, 1971; Mueller *et al.*, 2001, Schultz & Brady, 2008). Essas formigas praticam uma forma de agricultura, na qual o fungo é cultivado como uma espécie de jardim, dentro do ninho. Nessa relação mutualística, o fungo é utilizado como a principal fonte de alimento para as larvas, enquanto os adultos consomem açúcares de plantas hidrolisados pelo fungo (Silva *et al.*, 2003). Já as formigas fornecem folhas de plantas como substrato para o crescimento, além de um ambiente propício para o desenvolvimento de seu simbiote (Currie, 2001a). Esse complexo comportamento auxilia as formigas cortadeiras a se estabelecerem como herbívoros dominantes em florestas neotropicais e como causadoras de perdas na agricultura na América do Sul (Cherrett, 1986; Hölldobler e Wilson, 1990).

Diversos fungos não-mutualísticos, considerados danosos ao jardim de fungo das formigas cortadeiras, podem ser encontrados no interior do ninho (Rodrigues *et al.*, 2005; Rodrigues *et al.*, 2008), sendo o *Escovopsis* (Ascomycota: anamórfico Hypocreales), especialista do jardim, um dos patógenos mais conhecidos e estudados. Em algumas populações, esse parasita chega a infectar 75% das colônias (Currie, 2001b). O fungo *Escovopsis* mata o seu hospedeiro e, então digere sua biomassa morta (Reynolds & Currie, 2004), formando infecções persistentes que podem reduzir o tamanho do jardim de fungo ou mesmo chegar ao extremo de destruí-lo completamente (Currie *et al.*, 1999a; Currie, 2001b). As cortadeiras exibem diversos comportamentos de defesa contra *Escovopsis*, sendo

que a contribuição relativa de cada um deles depende da espécie de formiga em questão. Essas estratégias evitam que toda a integridade da relação mutualística com o fungo cultivado seja comprometida.

A complexidade das relações simbióticas dentro do ninho de uma *Attini* vai além das relações formiga/*Leucoagaricus/Escovopsis*. Currie *et al.* (1999b) descreveram um actinomiceto do gênero *Pseudonocardia* como um segundo mutualista da complexa rede simbiótica desses insetos. Nessa relação simbiótica, as formigas fornecem nutrientes para a bactéria, sendo que o custo envolvido varia de 10-20% da taxa metabólica de uma operária máxima (Poulsen *et al.*, 2003). Já a formiga ganha acesso a metabólitos secundários com propriedades antimicrobianas, produzidos pela bactéria. Esses metabólitos possuem potentes propriedades inibidoras contra o fungo parasita *Escovopsis*, porém parece não serem capazes de inibir outros fungos (Currie *et al.*, 1999b).

Sabendo-se disso, os objetivos deste trabalho foram: 1) isolar linhagens de actinomicetos e avaliar o grau de inibição desses organismos sobre fungos presentes em colônias de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex*; e 2) identificar e verificar o grau de similaridade de diferentes linhagens de actinomicetos simbiontes presentes em formigas de mesmo gênero.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Avaliação da atividade inibitória de actinomicetos sobre fungos

2.1.1 – Coleta das formigas

Nos arredores do campus da Universidade Federal de Viçosa (20°45' S e 42°51' W) foram localizadas colônias das seguintes espécies: *Acromyrmex niger*, *Acromyrmex subterraneus subterraneus*, *Acromyrmex subterraneus molestans*, *Acromyrmex rugosus* e *Acromyrmex balzani*. De cada espécie, foram coletadas 100 operárias forrageadoras que retornavam ao ninho carregando fragmentos vegetais. As coletas foram realizadas entre junho de 2010 e fevereiro de 2011.

2.1.2 – Isolamento de fungos

O material coletado foi levado para o Insetário da UFV. As formigas foram acondicionadas individualmente em placas de Petri assépticas perfuradas para introdução de dois tubos, um com algodão umedecido em água destilada e o outro com algodão embebido em mel e água destilada (Figura 1.1). Por meio de observação diária, cada formiga morta era submetida ao processo de desinfecção, passando por uma lavagem serial: em álcool 70%, hipoclorito de sódio 2% e água destilada. O material foi mantido por vinte segundos, aproximadamente, em cada uma dessas soluções. Em seguida, as formigas foram secas em papéis filtro esterilizados e colocadas em tubos de Eppendorf, previamente autoclavados, com algodão umedecido em água destilada. Condições assépticas foram mantidas em todo o procedimento, a fim de evitar contaminação das amostras.

Uma vez realizado o processo, as amostras foram mantidas em estufas incubadoras (BOD) a 25 ± 3 °C para verificação diária de extrusão de micélio fúngico e/ou conídios sobre a formiga. Cada uma das amostras teve os fungos isolados em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) acrescido do antibiótico Rifampicina a fim de evitar contaminação por bactérias. As culturas foram repicadas até obtenção de culturas puras. Os quatro fungos prevalentes em cada espécie de formiga cortadeira foram identificados através da morfologia de seus esporos, auxiliada por chaves taxonômicas específicas. Para confirmação ao nível específico, algumas amostras foram enviadas ao Dr. Harry Evans (CABI Europe, E-UK, Egham, Surrey, Reino Unido), da Clínica de Doenças de Plantas da UFV.

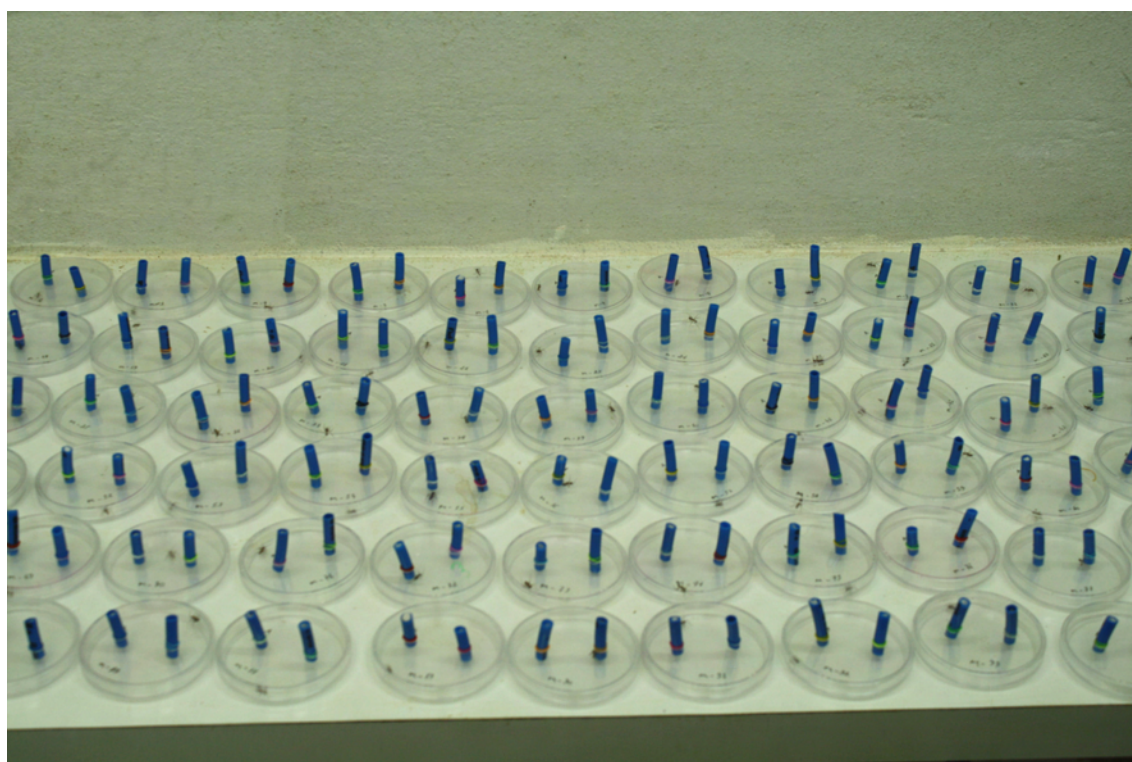


Figura 1.1 – Formigas mantidas individualmente em placas de Petri para observação diária.

2.1.3 – Culturas de actinomicetos

Para a obtenção de culturas de actinomicetos, formigas das cinco espécies a serem estudadas (*Ac. niger*, *Ac. subterraneus subterraneus*, *Ac. subterraneus molestans*, *Ac. rugosus* e *Ac. balzani*), presentes em formigueiros do Insetário da UFV, sofreram raspagens no dorso. As bactérias foram inoculadas em meio Ágar-Quitina, acrescido dos fungicidas ciclohexamida/nistatina. Conservaram-se as culturas em estufa incubadora (BOD) a 25 ± 3 °C durante 20 dias até o aparecimento de colônias de actinomicetos. Posteriormente, estas foram transferidas para placas contendo meio YMEA (Extrato de levedura, Extrato de malte e ágar) e depositadas em estufa incubadora a 25 ± 3 °C até que atingissem tamanho suficiente para serem utilizadas nos testes de inibição.

2.1.4 – Cultura do fungo parasita *Escovopsis* sp.

Para o controle positivo dos testes de inibição foi utilizado o fungo parasita *Escovopsis* sp., pois tal espécie é comprovadamente afetada pelos antibióticos de *Pseudonocardia* (Currie *et al*, 1999b). Amostras de uma linhagem de *Escovopsis* foram doadas pelo laboratório de Interações Inseto-Microrganismo da Entomologia da UFV. A viabilidade das amostras era verificada por meio de repicagens semanais do fungo em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) acrescido do antibiótico Rifampicina. As amostras eram mantidas em estufas incubadoras (BOD) a 25 ± 3 °C.

2.1.5 – Testes de Inibição

Foram realizados testes de inibição pareados entre cada um dos cinco actinomicetos isolados das espécies de formigas cortadeiras com os respectivos fungos encontrados na mesma espécie de formiga. O actinomiceto foi transferido do meio YMEA para o meio Czapek, sendo dispostos a 1 cm da borda da Placa de Petri. Eles permaneceram depositados em estufa incubadora a 25 ± 3 °C até que atingissem aproximadamente 1 cm de diâmetro. Discos de 1 cm de diâmetro foram retirados dos quatro fungos mais prevalentes dentro de cada espécie de formiga cortadeira, além do fungo parasita *Escovopsis*. Eles foram colocados no canto oposto da placa de Petri, também a 1 cm de sua borda. Placas sem actinomicetos foram utilizadas como controle. Para cada fungo foram realizadas seis repetições. As placas foram depositadas em estufa incubadora a 25 ± 3 °C por 10 dias. O crescimento micelial radial dos fungos em direção ao actinomiceto (R_i) e nas placas controle (R_c) foi medido diariamente. Para a constatação do comportamento da taxa de inibição do crescimento médio dos fungos durante os dias foi utilizada a fórmula $[(R_c - R_i)/R_c]$ (Lahlali *et al.*, 2007; Altinok, 2009; Lahlali & Hijri, 2010).

2.1.6 – Análises estatísticas

Dados do grupo tratamento e grupo controle do último dia de avaliação (décimo dia) ou quando o grupo controle chegou à borda da placa foram comparados utilizando teste t com $\alpha = 5\%$. O comportamento da taxa de inibição diária dos fungos em questão foi avaliado por análise de regressão ($\alpha = 5\%$),

utilizando-se um modelo polinomial de segunda ordem. Todas as análises foram realizadas utilizando os programas SAEG 5.0 e Sigma Plot 10.0.

2.2 – Caracterização de bactérias por métodos moleculares

2.2.1 – Culturas de actinomicetos

Para a obtenção de culturas de actinomicetos, formigas das espécies *Ac. niger*, *Ac. subterraneus subterraneus*, *Ac. subterraneus brunneus*, *Ac. rugosus* e *Ac. balzani*, presentes em formigueiros do Insetário da UFV, sofreram raspagens no dorso. O procedimento adotado para isolamento foi idêntico ao descrito no item 2.1.3.

2.2.2 – Extração de DNA genômico

O procedimento a seguir foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Centro de Estudos de Insetos Sociais da UNESP – Rio Claro – SP pela Dr^a. Thais Demarchi Mendes. O DNA genômico foi extraído seguindo a metodologia de Sampaio *et al.* (2001). Para a confirmação da presença de DNA, os produtos da extração foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (Promega Corporation, USA) em tampão TBE 1X (Tris-borato-EDTA). O gel foi corado em solução de brometo de etídio e visualizado através do transiluminador Eletronic Multiwave TM Transilluminator e fotografado com auxílio do programa Kodak Digital Science ID®.

2.2.3 – Amplificação – PCR

A região 16S do rDNA foi amplificada a partir do DNA genômico pela reação em cadeia de polimerase (PCR), utilizando-se o par de “primers” universais F27 (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') e R1492 (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Lane, 1991). As reações de PCR continham 1 µL de DNA diluído (1:10), 2,0 µL de cada um dos “primers” (10µM), 2,5 µL de “Buffer” 10X, 1,0µL de MgCl₂ (50mM), 4,0 µL de dNTPs (1,25 mM de cada base), 0,2 µL de Taq-polimerase (5 U/µL) e 12,3 µL de água mili-q estéril, totalizando um volume de 25,0 µL. A PCR foi realizada em termociclador (GenePro - Bioer), no qual as condições de amplificação se iniciaram com a etapa de desnaturação com um ciclo a 95 °C por 3 minutos, seguido de uma etapa de anelamento e extensão com 35 ciclos a 95° C durante 1 minuto, 60° C por 1 minuto e 72° C por 2 minutos e um ciclo final de extensão a 72 °C durante 15 minutos, e finalizado a 10 °C. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X . O gel foi corado em solução de brometo de etídio e visualizado através do transiluminador Eletronic Multiwave TM Transilluminator e fotografado com auxílio do programa Kodak Digital Science ID®.

2.2.4 – Purificação dos produtos de amplificação

O resultado da amplificação foi purificado com o kit GFX PCR DNA and gel band purification kit (GE Healthcare). O DNA purificado foi quantificado em equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Para confirmar a qualidade da purificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 1X. O gel foi corado em solução de brometo de etídio e visualizado

através do transiluminador Eletronic Multiwave™ Transilluminator e fotografado com auxílio do programa Kodak Digital Science ID®.

2.2.5 – Reação de sequenciamento e purificação do produto

Para a reação de sequenciamento da região 16S do rDNA foram utilizados os mesmos iniciadores F27 e R1492 e o “primer” interno U519F (5'-CAGCMGCCGCGGTAATWC-3'). As reações continham 2,0 µL de Save Money, 0,5 µL de “primer” (10 µM) 2,0 µL de DYEnamic, cerca de 100 ng de DNA purificado e água Mili-Q estéril até completar o volume de 10 µL. Utilizou-se o termociclador no programa: 25 ciclos 95 °C por 20s, seguido de 50 °C por 15s e 60 °C por 60s, sendo finalizado e mantido a 10 °C. A reação de sequenciamento foi purificada de acordo com as instruções do manual do DYEnamic™ ET Dye Terminator Kit (GE Healthcare).

2.2.6 – Sequenciamento do gene 16S rRNA

O sequenciamento foi realizado em equipamento ABI Prism 377 DNA (Applied Biosystems Inc., Foster City, Calif.). O DNA purificado proveniente da reação de sequenciamento foi ressuspendido em 3,0 µl de formamida e as amostras aplicadas no gel de poliacrilamida. As sequências obtidas foram corrigidas manualmente e editadas através do software Bioedit versão 7.0.9.0.

2.2.7 – Análise filogenética

As sequências obtidas foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados do GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) e no Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/>). As mais similares foram utilizadas na construção da árvore filogenética. As sequências foram alinhadas usando o software Bioedit versão 7.0.9.0 e a análise filogenética efetuada utilizando-se o software MEGA versão 5.0. Posições contendo gaps e sequências faltantes foram deletadas antes da análise. A relação entre as bactérias foi inferida usando o método de Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). Um total de 1196 pares de bases foi usado nesta análise. A distância entre os isolados foi calculada usando o método de “p-distance” (Nei & Kumar, 2000).

3 – RESULTADOS

3.1 – Isolamento de fungos

Dentre os 100 indivíduos coletados de cada uma das cinco espécies de formigas cortadeiras forrageadoras foram obtidos 54 isolados de fungos em *Ac. subterraneus subterraneus*, 27 isolados em *Ac. subterraneus molestans*, 34 isolados em *Ac. niger*, 21 isolados em *Ac. rugosus* e 31 isolados em *Ac. balzani*. Os quatro fungos com maior prevalência em cada espécie de formiga estão listados na tabela 1.

Tabela 1 - Fungos encontrados predominantemente em formigas cortadeiras forrageadoras do gênero *Acromyrmex*.

Formigas cortadeiras	Fungos Predominantes	Nº de Placas
<i>Ac. balzani</i>	<i>Penicillium</i> sp.	10
	<i>Aspergillus niger</i>	9
	<i>Aspergillus versicolor</i> cf. <i>sydowii</i>	5
	<i>Aspergillus ochraceus</i>	3
<i>Ac. niger</i>	<i>Aspergillus terreus</i>	7
	<i>Aspergillus versicolor</i> cf. <i>sydowii</i>	7
	<i>Penicillium</i> sp.	6
	<i>Beauveria bassiana</i>	4
<i>Ac. rugosus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	6
	<i>Aspergillus ochraceus</i>	5
	<i>Penicillium</i> sp.	3
	<i>Aspergillus terreus</i>	3
<i>Ac. subterraneus molestans</i>	<i>Mycelia sterilia</i>	7
	<i>Aspergillus ochraceus</i>	5
	<i>Aspergillus niger</i>	3
	<i>Aspergillus versicolor</i> cf. <i>sydowii</i>	3
<i>Ac. subterraneus subterraneus</i>	<i>Penicillium</i> sp.	18
	<i>Aspergillus ochraceus</i>	18
	<i>Aspergillus niger</i>	7
	<i>Aspergillus terreus</i>	5

3.2 – Testes de inibição

A atividade antifúngica das diferentes linhagens de actinomicetos foi avaliada sobre os quatro fungos predominantes isolados das operárias forrageadoras de cada espécie (Figura 1.2). Nos ensaios em que se utilizou a linhagem de actinomicetos obtida da cortadeira *Ac. balzani*, os fungos *Aspergillus niger* ($p<0,001$), *Aspergillus ochraceus* ($p<0,001$), *Aspergillus versicolor* cf. *sydowii* ($p<0,001$) e *Escovopsis* sp. ($p<0,001$) apresentaram diferenças significativas das médias de crescimento entre os grupos, sendo maiores nos grupos-controle em relação aos grupos-tratamento (Figura 1.3a). Usando-se actinomicetos obtidos de *Ac. subterraneus molestans*, os fungos *Escovopsis* sp. e *Mycelia sterilia* tiveram diferenças significativas das médias de crescimento entre os grupos. Em *Escovopsis* ($p<0,01$) os grupos-controle foram maiores em relação aos grupos-tratamento e em *Mycelia sterilia* ($p<0,01$) os grupos-tratamento foram maiores em relação aos grupos-controle (Figura 1.3b).

Quando utilizada a linhagem de actinomicetos isolada de *Ac. niger*, tanto o fungo *A. versicolor* cf. *sydowii* ($p=0,04$) quanto *Penicillium* sp. ($p=0,02$) apresentaram diferenças significativas das médias de crescimento entre os grupos, sendo maiores nos grupos-tratamento em relação aos grupos-controle em ambos os casos (Figura 1.3c). Nos ensaios em que se utilizou a linhagem obtida de *Ac. subterraneus subterraneus*, as médias do crescimento dos fungos *A. ochraceus* ($p=0,02$), *A. terreus* ($p=0,01$) e *Escovopsis* sp. ($p<0,001$) tiveram diferenças significativas entre os grupos, sendo maiores no grupo-controle em relação ao grupo-tratamento (Figura 1.3d). Finalmente, quando se utilizou actinomicetos obtidos de *Ac. rugosus*, as médias de crescimento dos fungos *A. ochraceus* ($p<0,01$), *A. niger* ($p<0,001$) e *A. terreus* ($p<0,01$) tiveram diferenças

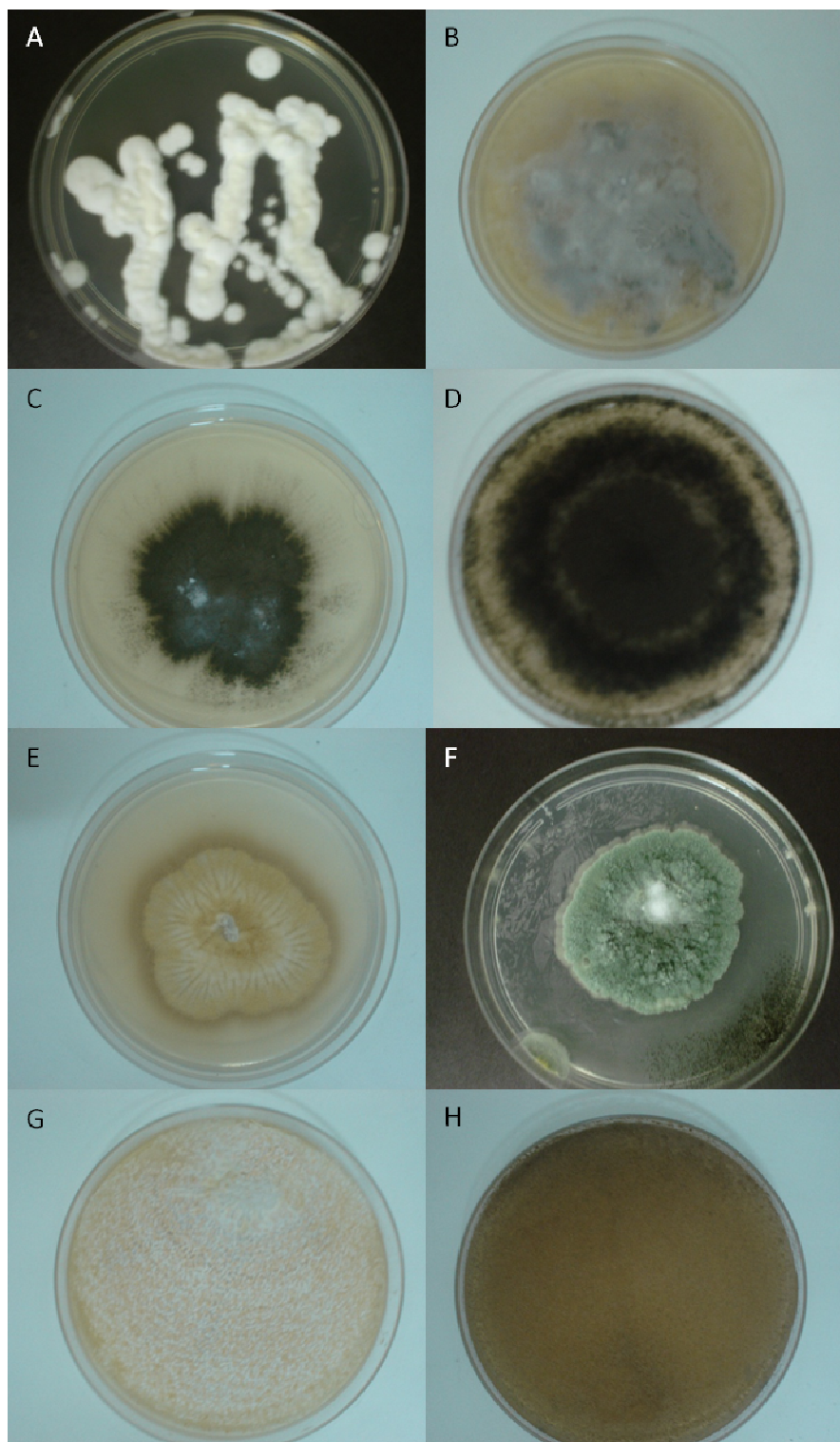


Figura 1.2 - Aspecto das colônias de fungos encontrados em formigas cortadeiras forrageadoras e utilizados nos experimentos de inibição. (A) *Beauveria bassiana*; (B) *Mycelia sterilia*; (C) *Penicillium* sp; (D) *Aspergillus niger*; (E) *Aspergillus ochraceus*; (F) *Aspergillus versicolor* cf. *sydowii*; (G) *Aspergillus terreus*; (H) Aspecto do fungo parasita do jardim de fungo das formigas cortadeiras *Escovopsis* sp.

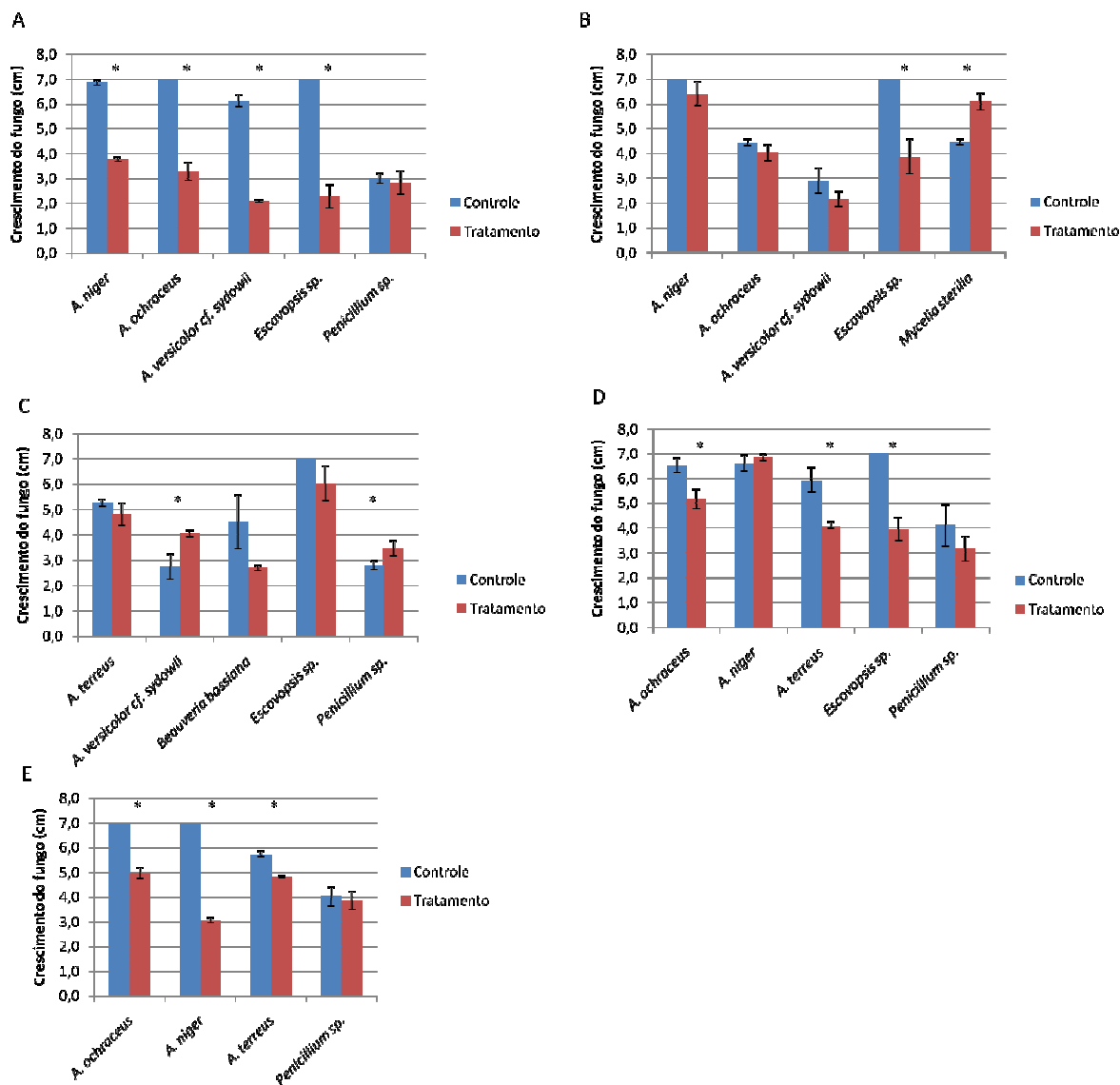


Figura 1.3 - Crescimento médio dos fungos após dez dias de avaliação no grupo controle (sem actinomicetos) e no tratamento (com actinomicetos). Actinomicetos isolados das formigas cortadeiras: *Acromyrmex balzani* (A); *Acromyrmex subterraneus molestans* (B); *Acromyrmex niger* (C); *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (D); *Acromyrmex rugosus* (E). * diferença significativa entre grupo controle e tratamento (Teste t de Student, $p < 0,05$).

significativas entre os grupos, sendo maiores no grupo-controle em relação ao grupo-tratamento (Figura 1.3e).

A seguir, são apresentadas as taxas de inibição dos fungos pelas diferentes linhagens de actinomicetos no decorrer dos dias. No ensaio em que foi utilizada a linhagem de actinomiceto isolado de *Ac. balzani* (Figura 1.4), houve um rápido crescimento da porcentagem de inibição a partir do segundo dia para os fungos *A. niger*, *A. ochraceus* e *A. versicolor cf. sydowii*. No caso do fungo *Escovopsis* sp. houve uma certa constância da taxa de inibição no decorrer dos dias. Já para o fungo *Penicillium* sp., a taxa de inibição iniciou-se de forma negativa e gradativamente foi aumentando até chegar a pouco mais de 0%. Nesse ensaio, todas as taxas de inibição foram significativamente explicadas pela regressão quadrática (Anexos – Tabela 1A).

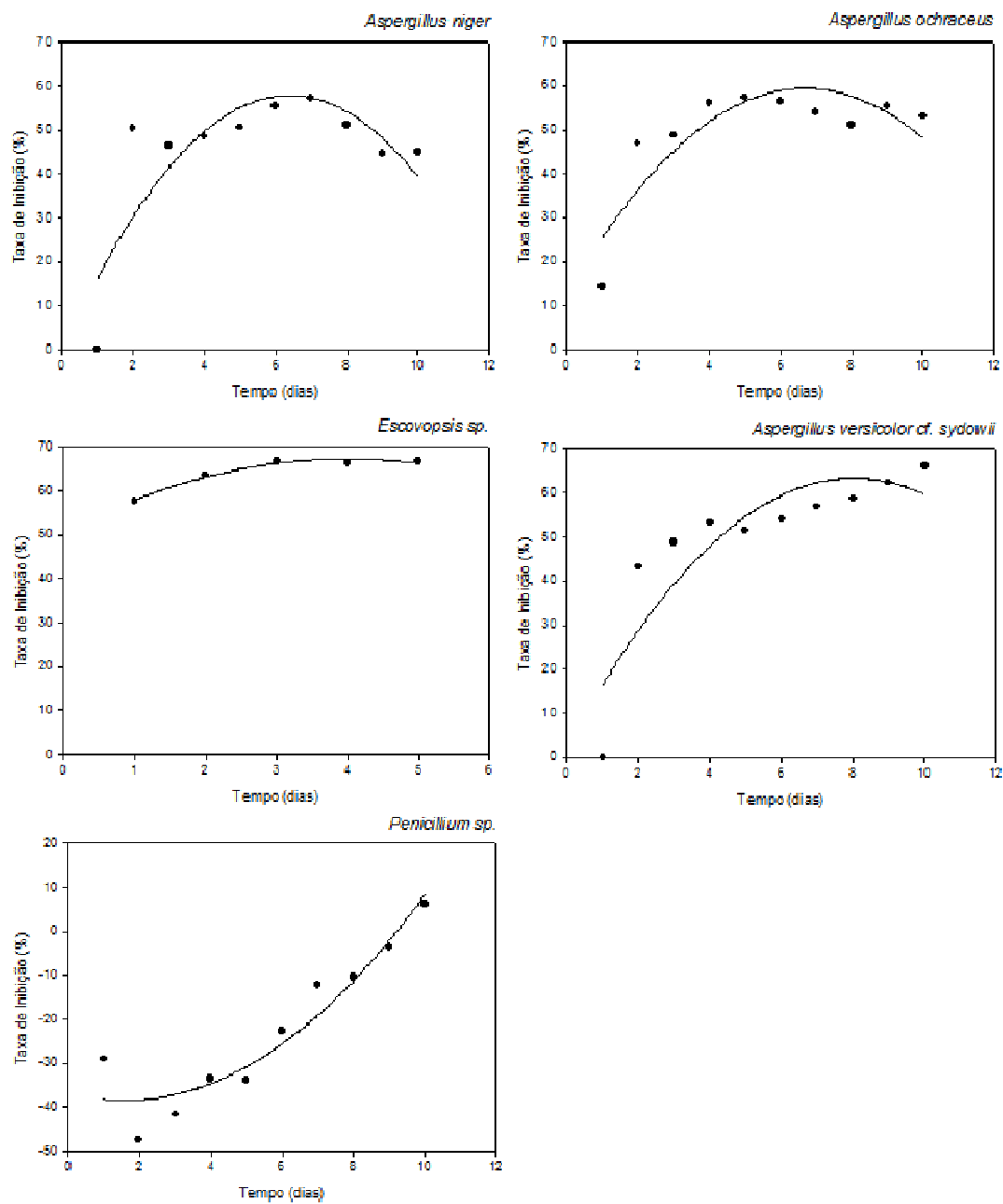


Figura 1.4 – Taxas de inibição de fungos por actinomicetos encontrados em *Acromyrmex balzani* no decorrer dos dias.

Usando-se actinomicetos obtidos de *Ac. subterraneus molestans* (Figura 1.5), obteve-se uma diminuição na taxa de inibição dos fungos *A. niger* e *Mycelia sterilia*. Em contrapartida, ocorreu aumento considerável na porcentagem de inibição sobre os fungos *A. versicolor cf. sydowii* e *A. ochraceus*, apesar dessa taxa se iniciar de forma negativa. Todas as taxas de inibição nesses fungos foram significativamente explicadas pelo modelo polinomial utilizado. Apesar de apresentar aumento, a taxa de inibição sobre o fungo *Escovopsis* sp. não foi significativamente explicada por esse modelo ($p=0,23$) (Anexos – Tabela 1A).

Nas análises em que se utilizou a linhagem retirada de *Ac. niger* (Figura 1.6), a porcentagem de inibição teve rápido decréscimo a partir do terceiro dia de avaliação sobre o fungo *A. versicolor cf. sydowii* e uma diminuição mais gradual sobre *Penicillium* sp. No fungo *Beauveria bassiana* houve uma tendência de aumento mais lento da taxa até o sexto dia de avaliação, a partir do qual houve aumento significativo. Ao contrário desses três fungos, as taxas de inibição em *A. terreus* e *Escovopsis* sp. não foram significativamente explicadas pelo modelo quadrático ($p=0,64$ e $p=0,08$, respectivamente) (Anexos – Tabela 1A).

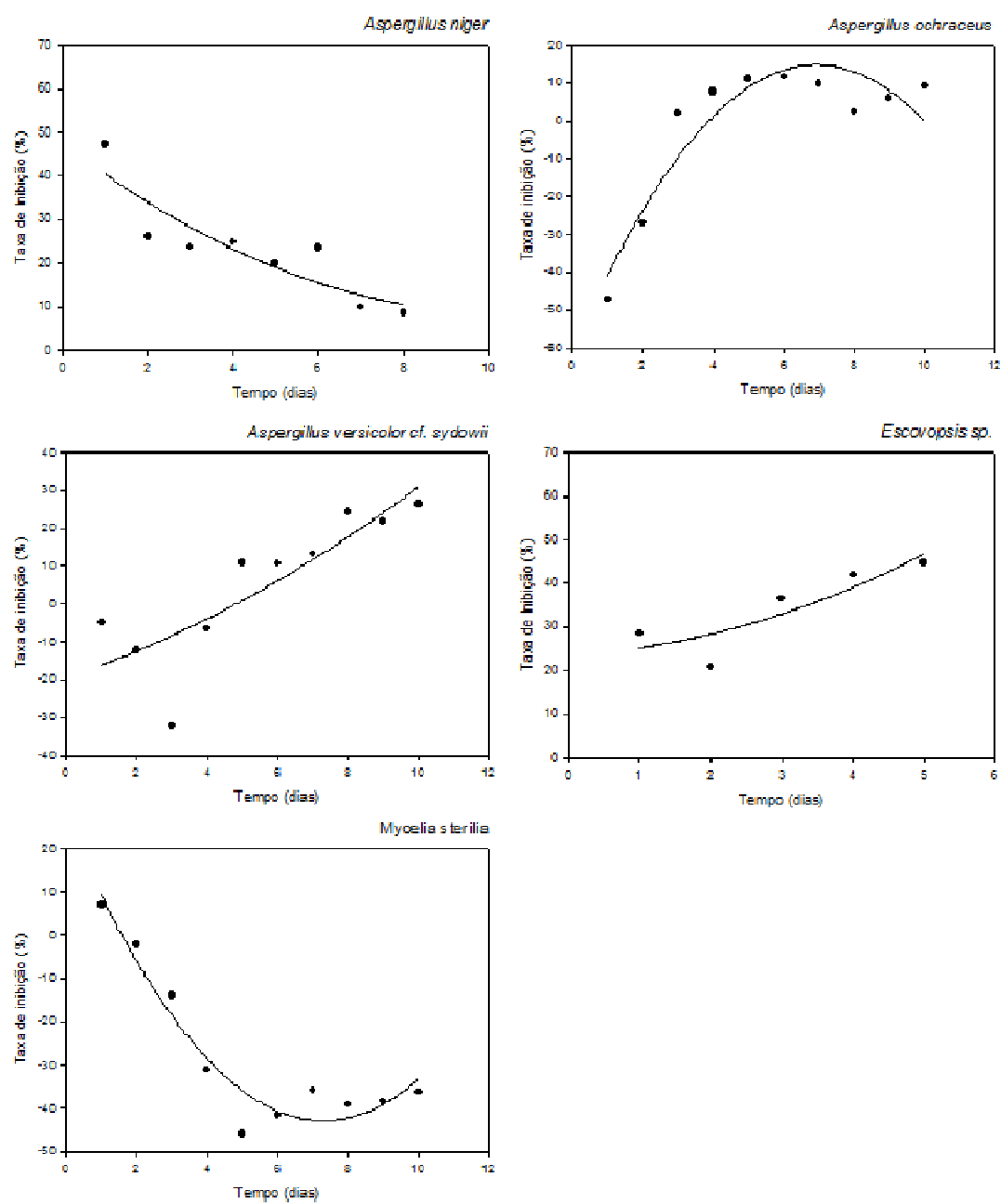


Figura 1.5 - Taxas de inibição de fungos por actinomicetos encontrados em *Acromyrmex subterraneus molestans*.

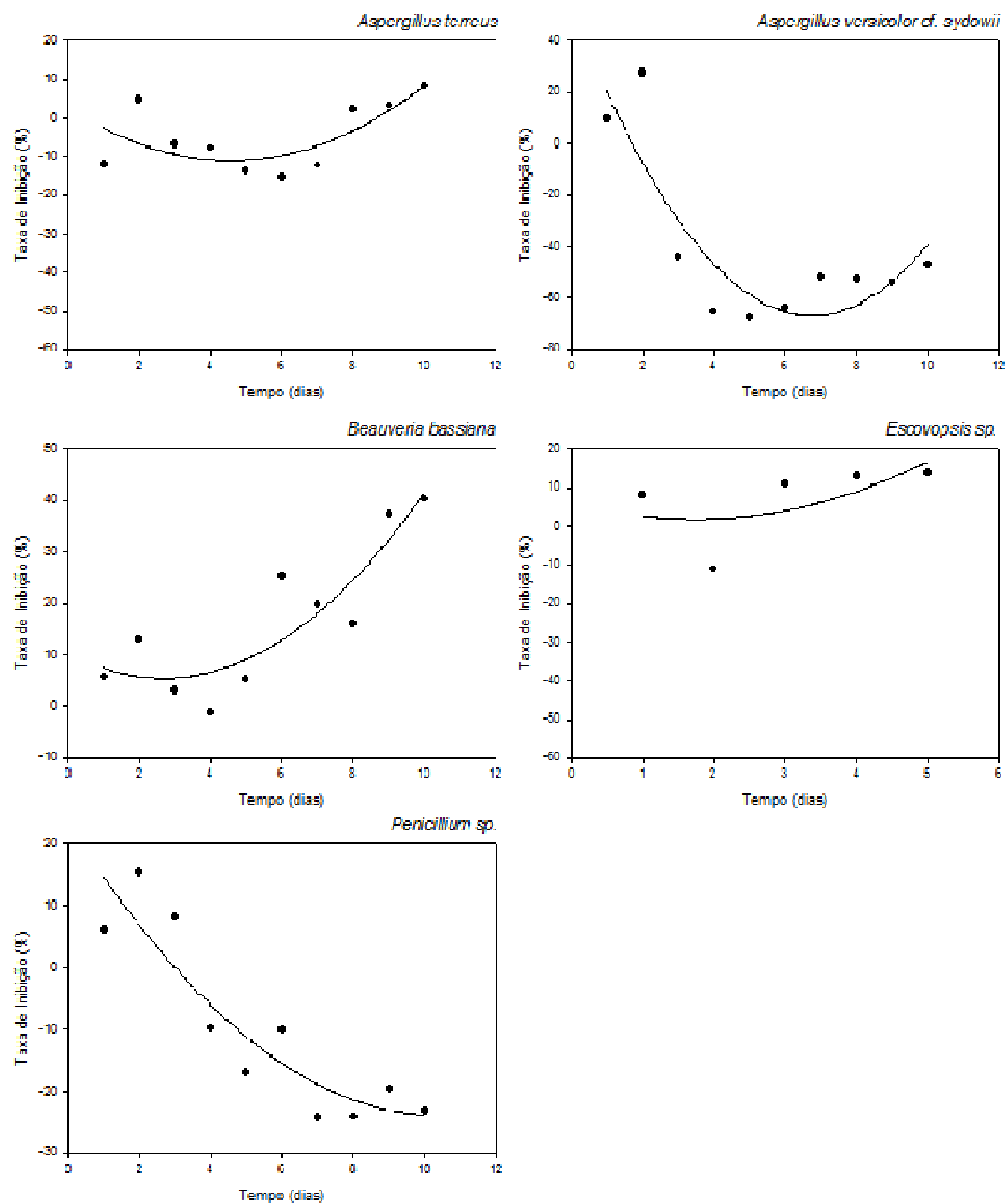


Figura 1.6 - Taxas de inibição de fungos por actinomicetos encontrados em *Acromyrmex niger*.

Quando utilizada a linhagem de actinomicetos isolado de *Ac. subterraneus subterraneus* (Figura 1.7), a porcentagem de inibição apresentou aumento acentuado a partir do segundo dia de avaliação nos fungos *A. terreus* e *A. ochraceus*. Este último foi um caso diferenciado, uma vez que a taxa de inibição do primeiro dia estava em um nível negativo muito baixo. Em *Penicillium* sp. a taxa de inibição aumentou de forma gradativa até o terceiro dia, a partir do qual permaneceu em certa constância. O modelo polinomial de segunda ordem não explicou significativamente o comportamento das taxas de inibição sobre *Aspergillus niger* ($p=0,22$) e *Escovopsis* sp. ($p=0,07$) (Anexos – Tabela 1A).

No experimento em que se utilizou actinomicetos obtidos de *Acromyrmex rugosus* (Figura 1.8), os fungos *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium* sp. apresentaram resposta crescente na taxa de inibição durante os dias. A taxa de inibição sobre *Penicillium* sp. teve alto crescimento do primeiro para o segundo dia. No caso da taxa de inibição sobre *A. ochraceus*, esse aumento foi gradual, com o passar dos dias. Apesar de haver certa constância nas taxas de inibição sobre os fungos *A. terreus* e *A. niger*, o modelo quadrático da regressão não explica significativamente tal fato ($p=0,055$ e $p=0,4$, respectivamente). (Anexos – Tabela 1A).

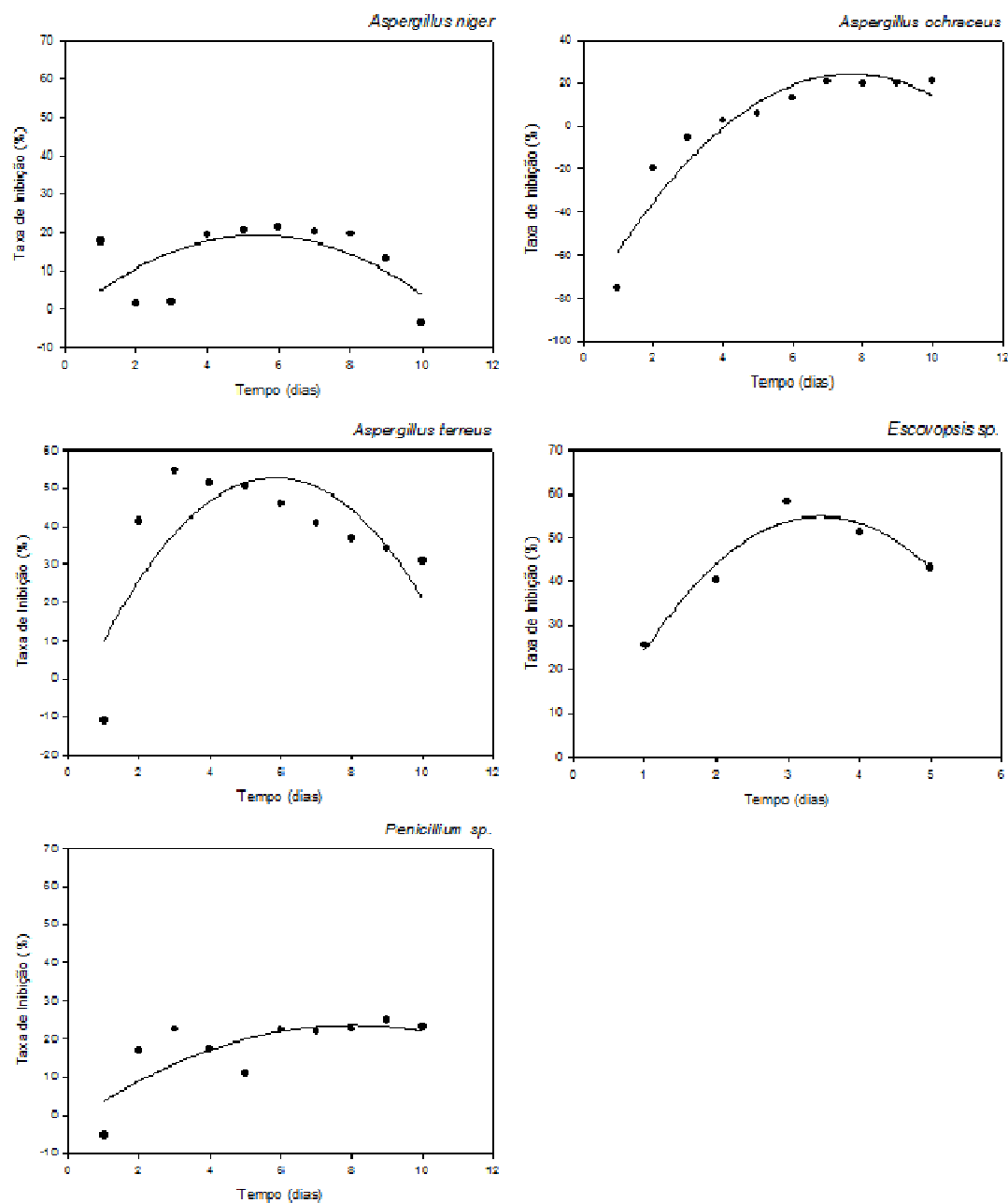


Figura 1.7 - Taxas de inibição de fungos por actinomicetos encontrados em *Acromyrmex subterraneus subterraneus*.

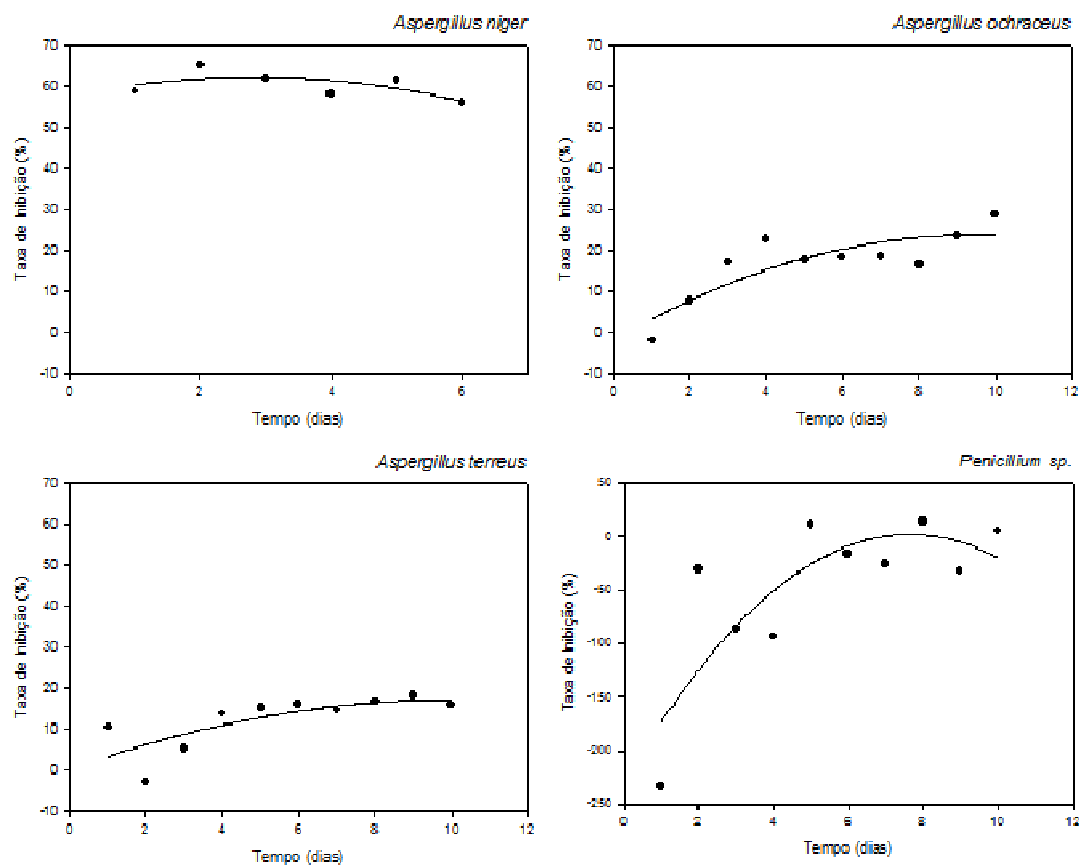


Figura 1.8 - Taxas de inibição de fungos por actinomicetos encontrados em *Acromyrmex rugosus*.

3.3 – Caracterização de bactérias por métodos moleculares

Foram isoladas uma estirpe da formiga *Ac. balzani*, uma de *Ac. subterraneus brunneus*, uma de *Ac. niger*, uma de *Ac. rugosus* e duas estirpes de *Ac. subterraneus subterraneus*. A linhagem isolada de *Ac. balzani* foi identificada como pertencente à actinomicetos do gênero *Streptomyces*. Todos os demais isolados foram identificados como actinomicetos do gênero *Pseudonocardia*, de acordo com a classificação do Ribosomal Database Project, em que são comparadas sequências do gene 16S rRNA com aquelas depositadas no banco de dados. O classificador banco de dados (RDP Naive Bayesian rRNA Classifier Version 2.2) usa a taxonomia nomenclatural e o Manual de Bergey. Análises filogenéticas (Figura 1.9) mostraram que os dois isolados obtidos em *Ac. subterraneus subterraneus* podem pertencer a uma mesma linhagem. Em pesquisa usando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/), verificou-se que todas as sequências correspondiam a sequências do GenBank com até 98% de similaridade, mas nenhuma com 100% de similaridade. Não foi objetivo desta análise realizar um estudo de filogenia exaustivo dos actinomicetos associados às formigas cortadeiras e sim ter uma identificação das bactérias isoladas e estudadas nesta dissertação.

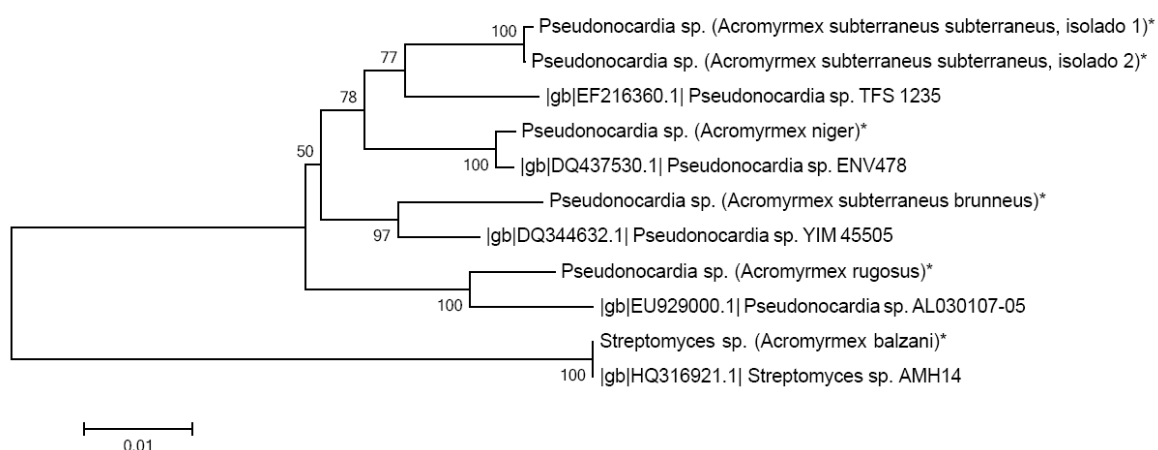


Figura 1.9 – Classificação e relação filogenética dos isolados de actinomicetos obtidos de formigas do gênero *Acromyrmex* (marcados com *) e sequências próximas obtidas do GenBank (números de referência na árvore). Esta classificação foi baseada na análise de sequências da região do 16S rDNA (~1200 pb). A filogenia foi inferida usando o método de Neighbor-Joining. A árvore otimizada e o somatório do comprimento dos ramos = 0,19233382 é mostrada acima. Valores de bootstrap são mostrados nos nós (valores para cada 100 replicatas). A distância evolutiva foi computada usando o método de matriz de distância p. Estas análises foram conduzidas no programa MEGA v5.0 (Tamura et al. 2007).

4 – DISCUSSÃO

Neste estudo, diferentes espécies de fungos foram encontrados nas diferentes espécies de formigas cortadeiras examinadas, incluindo *Aspergillus niger*, *A. ochraceus*, *A. terreus*, *A. versicolor cf. sydowii*, *Beauveria bassiana*, *Penicillium* sp. e *Mycelia sterilia* (Tabela 1.1). Com exceção de *Beauveria bassiana* em *Ac. niger* e *Mycelia sterilia* em *Ac. subterraneus molestans*, todos os outros fungos não apresentaram nenhuma especificidade quanto ao seu hospedeiro. Esse resultado corrobora os encontrados por Rodrigues *et al.* (2008) que isolaram fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cladosporium* de diferentes espécies de cortadeiras do gênero *Acromyrmex*. De forma geral, formigas cortadeiras forrageadoras, por possuírem contato com o solo, com folhas

utilizadas para o corte e outros locais propícios ao aparecimento de fungos, são bastante susceptíveis à infecção por esses microrganismos, sejam eles entomopatogênicos ou não (Schmid-Hempel, 1998; Boomsma *et al.*, 2005).

Apesar de apresentarem diferentes níveis de patogenicidade, as espécies de fungos obtidos neste trabalho podem afetar de modo diferente cada uma das formas de defesa das formigas do gênero *Acromyrmex*, como a frequência dos comportamentos de “allogrooming” (lambadura da companheira de ninho), “autogrooming” (lambadura do próprio corpo) e “fungus grooming” (lambadura do jardim de fungo) (Schmid-Hempel, 1998; Currie & Stuart, 2001); a produção de secreções antimicrobianas pela glândula metapleurar (Bot *et al.*, 2002); e a ativação do sistema imune inato desses insetos (Cremer *et al.*, 2007; de Souza *et al.*, 2008). Outra forma de defesa influenciada pelo nível de patogenicidade é a presença de actinomicetos simbioses no tegumento das cortadeiras (Currie *et al.*, 1999b; Cafaro & Currie, 2005).

Neste trabalho, verificou-se que os actinomicetos presentes em *Acromyrmex* apresentam capacidade de inibição diferenciada, dependendo da linhagem avaliada. No último dia de avaliação do experimento, a linhagem obtida de *Ac. balzani* apresentou efeito inibitório contra quatro dos cinco fungos avaliados, enquanto a linhagem adquirida de *Ac. subterraneus molestans* teve esse efeito somente sobre o fungo *Escovopsis* sp. Actinomicetos isolados de *Ac. niger* não apresentaram efeito inibitório sobre nenhum dos fungos avaliados. Aqueles obtidos de *Ac. subterraneus subterraneus* tiveram efeito inibitório sobre *Aspergillus ochraceus*, *A. terreus* e *Escovopsis* sp. Já a linhagem retirada de formigas da espécie *Ac. rugosus* inibiu o crescimento de *A. ochraceus*, *A. niger* e *A. terreus*. Esses diferentes resultados podem estar diretamente relacionados à

(1) quantidade de antibiótico produzido pelas linhagens de actinomicetos, ao (2) poder de inibição variado de cada um dos diferentes antibióticos ou à (3) atuação de um grupo de antibióticos mais eficiente em uma linhagem de actinomicetos em relação à outra. Os resultados do presente trabalho contradizem trabalhos anteriores, que sugerem que actinomicetos simbiotes das cortadeiras apresentam produção de compostos antifúngicos com efeito inibitório específico contra fungos parasitas do gênero *Escovopsis* (Currie *et al.*, 1999b).

Embora os resultados deste trabalho sejam diferentes daqueles encontrados por Currie *et al.* (1999b), outras pesquisas já apontaram efeitos antagônicos dos actinomicetos simbiotes sobre outros microrganismos. Sen *et al.* (2009) verificaram efeitos inibitórios generalistas dos actinomicetos dos gêneros *Pseudonocardia* e *Amylocolapsis* contra fungos encontrados em ninhos de cortadeiras. Já Sánchez-Peña *et al.* (2008) encontraram efeito semelhante de antibiose em actinomicetos simbiotes sobre várias espécies de fungos endofíticos como *Aspergillus flavus*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Rhizoctonia solani*. O actinomiceto *Pseudonocardia* sp. também foi capaz de inibir o crescimento da levedura *Candida albicans* (Oh *et al.*, 2009).

As linhagens de actinomicetos isoladas de *Ac. niger* e *Ac. subterraneus molestans* apresentaram efeitos diferenciados sobre algumas espécies de fungos no último dia de avaliação. Segundo os resultados, as médias de crescimento dos fungos nos grupos-tratamento foram maiores que nos grupos-controle indicando que a primeira linhagem teve uma atividade de incitação sobre o crescimento dos fungos *A. versicolor* cf. *sydowii* e *Penicillium* sp., enquanto o segundo apresentou o mesmo efeito com o fungo *Mycelia sterilia*. É possível que os metabólitos secundários produzidos pelos actinomicetos tenham algum efeito estimulante

sobre esses fungos, porém não existem estudos que possam apoiar tal hipótese. Uma vez que a identidade, os efeitos e a caracterização desses antifúngicos ainda não são bem compreendidos, essa hipótese não pode ser descartada. Somente três compostos foram estudados até o momento: o antifúngico denominado dentigerumicina, que é produzido pelo actinomiceto *Pseudonocardia*, isolados da formiga *Apterostigma dentigerum* (Oh et al., 2009); candidicina, um antifúngico bem conhecido produzido pelo actinomiceto *Streptomyces*, isolado da formiga *Acromyrmex octospinosus* (Haeder et al., 2009; Barke et al., 2010); e nistatina P1 produzido por uma linhagem de *Pseudonocardia* isolada de *Ac. octospinosus* (Barke et al., 2010). Nesse aspecto tornam-se necessários estudos mais aprofundados dessa relação, a fim de se identificar outros compostos produzidos por esses actinomicetos e avaliar os efeitos dessas substâncias sobre outros fungos.

Efeitos positivos e negativos na taxa de inibição das linhagens de actinomicetos sobre os fungos também foram notados quando avaliados ao longo dos dias. A linhagem de actinomicetos isolada de *Ac. balzani* aumentou a porcentagem de inibição sobre todos os fungos no decorrer dos dias. Em actinomicetos isolados de *Ac. subterraneus molestans* esse efeito foi visível sobre os fungos *A. versicolor cf. sydowii* e *A. ochraceus*. Já com os fungos *A. niger* e *Mycelia sterilia* houve decréscimo na taxa de inibição. Na linhagem obtida em *Ac. niger* houve decréscimo dessa taxa em *A. versicolor cf. sydowii* e *Penicillium sp.*, enquanto em *Beauveria bassiana* ocorreu aumento da porcentagem de inibição. Quando utilizada a linhagem de actinomicetos isolada de *Ac. subterraneus subterraneus*, a taxa de inibição apresentou aumento no decorrer dos dias sobre os fungos *A. terreus*, *Penicillium sp.* e *A. ochraceus*. O mesmo foi observado para

os fungos *A. ochraceus* e *Penicillium* sp. diretamente afetados pela linhagem obtida de *Ac. rugosus*.

Acréscimos das taxas de inibição de actinomicetos sobre os fungos podem estar ligados ao aumento na concentração de antibióticos quando os fungos se aproximam fisicamente dos actinomicetos ou ao aumento na quantidade de antibióticos concentrados na placa no decorrer dos dias. Os decréscimos das porcentagens de inibição podem estar relacionados a uma tolerância aos antibióticos adquirida pelo fungo ou ainda a um possível efeito estimulante de metabólitos secundários sobre os fungos. Dessa forma, os resultados do presente trabalho indicaram que, dependendo da linhagem, os actinomicetos simbiotes de formigas cortadeiras podem não somente defender os ninhos desses insetos contra o fungo parasita *Escovopsis* sp., como atuarem tanto protegendo-as contra fungos, entomopatogênicos ou não, quanto estimulando o crescimento desses microrganismos sobre esses insetos.

Neste estudo verificou-se, ainda, que as linhagens de actinomicetos isolados de cada uma das espécies de cortadeiras apresentaram similaridade com outros actinomicetos isolados de outras formigas cortadeiras, bem como alta similaridade com actinomicetos isolados a partir do solo. Especificidade na relação actinomiceto/formiga parece pouco provável. Trabalhos anteriores evidenciaram que várias espécies de formigas podem ter uma mesma linhagem de actinomiceto (Mueller *et al.*, 2008; Mueller *et al.*, 2010) e que dentro de um mesmo ninho podem existir várias linhagens de actinomicetos (Sen *et al.*, 2009). Identificou-se o isolado da formiga *Ac. balzani* como sendo do gênero *Streptomyces*, enquanto os outros, obtidos nas outras espécies, foram identificados como diferentes linhagens de actinomicetos pertencentes ao gênero

Pseudonocardia. Outros trabalhos têm isolado actinomicetos pertencentes a vários outros gêneros além de *Pseudonocardia* e *Streptomyces* (Kost *et al.*, 2009; Haeder *et al.*, 2009; Sen *et al.*, 2009; Zucchi *et al.*, 2010). Muito provavelmente os isolados aqui apresentados não são os únicos a ocorrerem nas cortadeiras estudadas, mas eles devem ser os actinomicetos dominantes no momento do isolamento. Outras técnicas de isolamento poderão ser empregadas para se conhecer a diversidade de actinomicetos associadas a essas formigas.

5 – CONCLUSÕES

- Com exceção de *Beauveria bassiana* em *Acromyrmex niger* e *Mycelia sterilia* em *Acromyrmex subterraneus molestans*, todos os outros fungos não apresentaram nenhuma especificidade quanto ao seu hospedeiro.
- Dependendo da linhagem, actinomicetos simbiossiontes presentes nas cortadeiras podem ter papel protetor contra fungos entomopatogênicos ou não.
- Dependendo da linhagem, actinomicetos simbiossiontes podem ter papel estimulatório sobre fungos em contato com formigas cortadeiras.
- Linhagens de actinomicetos isolados de cada uma das espécies de cortadeiras constituíam espécies diferentes e não sequenciadas anteriormente.
- O actinomiceto isolado de *Ac. balzani* foi identificado como sendo do gênero *Streptomyces*, enquanto os outros, obtidos nas outras espécies, foram identificados como diferentes linhagens de actinomicetos pertencentes ao gênero *Pseudonocardia*.

6 – REFERÊNCIAS

- Altinok HH (2009). In vitro production of fumonisin B1 and B2 by *Fusarium moniliforme* and the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Annals of Microbiology*, 59(3):509-516.
- Barke J, Seipke RF, Grünschow S, Heavens D, Drou N, Bibb MJ, Goss RJM, Yu DW, Hutchings MI (2010). A mixed community of actinomycetes produce multiple antibiotics for the fungus farming ant *Acromyrmex octospinosus*. *BMC Biology*. 8:109.
- Boomsma JJ, Schmid-Hempel P, Hughes WOH (2005). Life histories and parasite pressure across the major groups of social insects. In: Fellowes MHG, Rolff J (eds.). *Insect evolutionary ecology*. CABI, Oxon, UK. pp. 139-176.
- Bot ANM, Ortius-Lechner D, Finster K, Maile R, Boomsma JJ (2002). Variable sensitivity of fungi and bacteria to compounds produced by the metapleural glands of leaf-cutting ants. *Insectes Sociaux* 49:363-370.
- Cafaro MJ, Currie CR (2005). Phylogenetic analysis of mutualistic filamentous bacteria associated with fungus-growing ants. *Canadian Journal of Microbiology* 51:441-446.
- Cherrett JM (1986). The biology, pest status and control of leafcutting ants. *Agricultural Zoology Reviews* 1:1-27.
- Cremer S, Armitage SA, Schmid-Hempel P (2007). Social immunity. *Current Biology* 17:R693-702.
- Currie CR (2001a). A community of ants, fungi, and bacteria: a multilateral approach to studying symbiosis. *Annual Review of Microbiology* 55:357-380.
- Currie CR (2001b). Prevalence and impact of a virulent parasite on a tripartite mutualism. *Oecologia* 128:99-106.
- Currie CR, Stuart AE (2001). Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 263:339-344.
- Currie CR, Mueller UG, Malloch D (1999a). The agricultural pathology of ant fungus gardens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)* 96:7998-8002.
- Currie CR, Scott JA, Summerbell RC, Malloch D (1999b). Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *Nature* 398:701-704.
- de Souza DJ, Van Vlaenderen J, Moret Y, Lenoir A (2008). Immune response affects ant trophallactic behaviour. *Journal of Insect Physiology* 54:828-832.
- Haeder S, Wirth R, Herz H, Spiteller D (2009). Candidicin-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 (PNAS)* 106: 4742-4746.

- Hölldobler B, Wilson EO (1990). The Ants. Harvard University Press, Cambridge, MA. 782 pp.
- Kost C, Lakatos T, Böttcher I, Arendholz WR, Rendenbach M, Wirth R (2007). Non-specific association between filamentous bacteria and fungus-growing ants. *Naturwissenschaften* 94:821-828.
- Lahlali R, Hijri M (2010). Screening, identification and evaluation of potential biocontrol fungal endophytes against *Rhizoctonia solani* AG3 on potato plants. *FEMS Microbiology Letters* 311:152-159.
- Lahlali R, Bajii M, Jijakli MH (2007). Isolation and evaluation of bacteria and fungi as biological control agents against *Rhizoctonia solani*. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences* 72:973-982.
- Lane DJ (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons, New York. pp.115-175.
- Mueller UG, Ishak H, Lee JC, Sen R, Gutell RR (2010). Placement of attine ant-associated *Pseudonocardia* in a global *Pseudonocardia* phylogeny (Pseudonocardiaceae: Actinomycetales): a test of two symbiont-association models. *Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology* 98:195-212.
- Mueller UG, Dash D, Rabeling C, Rodrigues A (2008). Coevolution between Attine ants and actinomycete bacteria: A reevaluation. *Evolution* 62:2894-2912.
- Mueller UG, Schultz TR, Currie CR, Adams RMM, Malloch D (2001). The origin of the attine ant-fungus mutualism. *The Quarterly Review of Biology* 76:169-197.
- Nei M, Kumar S (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Oh DC, Poulsen M, Currie CR, Clardy J (2009). Dentigerumycin, the bacterially produced molecular mediator of a fungus-growing ant symbiosis. *Nature Chemical Biology* 5:391-393.
- Poulsen M, Bot ANM, Currie CR, Nielsen MG, Boomsma JJ (2003). Within colony transmission and the cost of a mutualistic bacterium in the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus*. *Functional Ecology* 17:260-269.
- Reynolds HT, Currie CR (2004). Pathogenicity of *Escovopsis*: the parasite of the attine ant-microbe symbiosis directly consumes the ant cultivated fungus. *Mycologia* 96:955-959.
- Rodrigues A, Bacci M, Mueller UG, Ortiz A, Pagnocca FC (2008). Microfungal 'weeds' in the leafcutter ant symbiosis. *Microbial Ecology* 56:604-614.
- Rodrigues A, Pagnocca FC, Bacci Jr. M, Hebling MJA, Bueno OC, Pfenning LH (2005). Variability of non-mutualistic filamentous fungi associated with *Atta sexdens rubropilosa* nests. *Folia Microbiologica* 50:421-425.

- Sampaio JP, Gadanho M, Santos S, Duarte FL, Pais C, Fonseca A, Fell JW (2001). Polyphasic taxonomy of basidiomycetous yeasts genus *Rhodospordium*: *Rhodospordium kratochvilovae* and related anamorphic species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51:87-697.
- Saitou N, Nei M (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Schmid-Hempel P (1998). *Parasites in social insects*. Princeton University Press, Princeton. 409 pp.
- Schultz TR, Brady SG (2008). Major evolutionary transitions in ant agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (PNAS) USA 105: 5435–5440.
- Sen R, Ishak HD, Estrada D, Dowd SE, Hong E, Mueller UG (2009). 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* (PNAS) 106:17805-17810.
- Sánchez-Peña SR, Sánchez-Ovalle MR, Gallegos-Morales G, Sánchez-Arizpe A (2008). In vitro antagonism of actinomycetes isolated from fungus-growing ants against plant pathogenic fungi. *Phytoparasitica* 36:322-325.
- Silva A, Bacci M, Siqueira CG, Bueno OC, Pagnocca FC, Hebling MJA (2003). Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. *Journal of Insect Physiology* 49: 307-313.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Wilson EO (1971). *The insect societies*. Belknap Press, Cambridge, MA. 548 pp.
- Zucchi TD, Guidolim AS, Cônsoli FC (2010). Isolation and characterization of actinobacteria ectosymbiont of *Acromyrmex subterraneus brunneus* (Hymenoptera: Formicidae). *Microbiological Research* 166:68-76.

CAPÍTULO II

Ausência de estruturas especializadas de abrigo de actinomicetos no tegumento de três espécies de *Acromyrmex*: implicações na defesa

RESUMO

Formigas cortadeiras apresentam diversas adaptações morfológicas, fisiológicas e comportamentais que lhes permitem se defender contra micropatógenos que possam interferir diretamente na colônia, seja em seus habitantes ou no jardim de fungo cultivado por eles. Uma dessas táticas de defesa é a associação com actinomicetos capazes de produzir metabólitos com funções antifúngicas. Segundo estudos anteriores, esses actinomicetos se alojam dentro de estruturas especializadas porosas nas placas propleurais de cortadeiras e são nutridos por secreções de glândulas exócrinas localizadas abaixo dessas cavidades. Contudo, através de observações prévias sabe-se que apesar de existir um revestimento branco, formado por actinomicetos, sobre o corpo de formigas da sub-espécie *Acromyrmex subterraneus subterraneus*, isso não ocorre em *Acromyrmex disciger* e *Acromyrmex ameliae*. Dessa forma, objetivou-se: 1) verificar a presença de estruturas especializadas que poderiam abrigar actinomicetos nessas três espécies de formigas e 2) determinar a implicação da ausência dessas estruturas para as cortadeiras. Foram realizados cortes histológicos de operárias de diferentes tamanhos de *Ac. disciger*, *Ac. subterraneus subterraneus* e da parasita social *Ac. ameliae*. Também comparou-se o tamanho da glândula metapleural nessas três espécies. Operárias de diferentes tamanhos das espécies estudadas não apresentaram nenhuma estrutura com cavidades onde seja possível a alocação de actinomicetos nas regiões da cabeça, tórax ou gáster. Em *Ac. subterraneus subterraneus*, é possível que glândulas exócrinas liberem suas secreções diretamente sobre a superfície do tegumento, viabilizando a presença dos actinomicetos nesses locais. Apesar de não possuir uma camada visível de actinomicetos sobre o corpo, *Ac. disciger* apresenta grande quantidade de pelos,

além do maior tamanho da glândula metapleural dentre as espécies analisadas. *Ac. ameliae* também não possui revestimento de actinomicetos sobre o corpo, e, possivelmente, direciona energia em parasitar a colônia e explorar as defesas de sua hospedeira. Assim, caso uma das estratégias de defesa das cortadeiras não seja eficiente ou não exista em uma espécie, pode haver compensação direta sobre outras formas de defesa.

Absence of specialized structures of actinomycetes under the tegument of three *Acromyrmex* species: implications for defense

ABSTRACT

Leaf-cutting ants have several morphological, physiological and behavioral adaptations that allow them to defend themselves against micropathogens that may interfere directly in the colony, in its inhabitants or in the fungus garden cultivated by these insects. One of these defense tactics is the association with actinomycetes capable of producing metabolites with antifungal functions. According to previous studies, these actinomycetes are harbored within specialized porous structures in the propleural plates of these ants and are fed by secretions of exocrine glands located below these cavities. However, through previous observations it is known that although there is a white coating, consisting of actinomycetes on the body of sub-species of ants *Acromyrmex subterraneus subterraneus*, this does not occur in the species *Acromyrmex disciger* and *Acromyrmex ameliae*. Thus, the objective was to: 1) verify the presence of specialized structures that could harbor actinomycetes in these three species of ants and 2) determine the implication of the absence of these structures for these ants. Histological sections were performed for different sizes of workers of *Ac. disciger*, *Ac. subterraneus subterraneus* and the social parasite *Ac. ameliae*. Also, the size of the metapleural gland in these three species were compared. Workers of different sizes of the species studied showed no structure with cavities where possible the allocation of actinomycetes in the head, thorax or gaster. In *Ac. subterraneus subterraneus*, it is possible that exocrine glands release their secretions directly on the surface of the tegument, allowing the presence of actinomycetes in these locations. Although *Ac. disciger* does not have a visible layer of actinomycete on the body, this specie feature lots of hair, as well as the largest metapleural gland among the analyzed species. *Ac. ameliae*, also, has no coat of actinomycetes on the body, and possibly direct its energy in parasite the colonies and explore the defenses of its host. Thus, if one of the defense

strategies of leaf-cutting ants is not effective or does not exist in a species, there may be other forms of direct compensation defense.

1 – INTRODUÇÃO

Insetos apresentam diversas adaptações morfológicas, fisiológicas e comportamentais que são refletidas pelas condições e variações do ambiente que ocupam (Schowalter, 2006). Em ecossistemas tropicais, as formigas cortadeiras se apresentam como um dos grupos dominantes de herbívoros, sendo esses organismos de vital importância para o crescimento de novas plantas e para a ciclagem de nutrientes no solo (Wirth *et al.*, 2003).

Um dos responsáveis pelo sucesso das formigas é a grande variedade de glândulas exócrinas que ocorrem sobre todo o seu corpo (Hölldobler & Wilson, 1990; Billen & Morgan, 1998; Billen, 2009). Essas estruturas se diferem seja por sua morfologia, função ou pela natureza dos compostos químicos produzidos. Dentre essas funções, destacam-se a produção de feromônios sexuais, de trilha, de alarme ou compostos de defesa contra predadores (Hölldobler & Wilson, 1990).

Estruturas como a glândula mandibular e a glândula metapleural são importantes para as formigas, uma vez que, além da produção de diversos feromônios, são também responsáveis pela secreção de compostos antimicrobianos (Maschwitz *et al.*, 1970; Marsaro *et al.*, 2001; Mendonça *et al.*, 2009). Os antibióticos produzidos por essas glândulas apresentam uma mistura de compostos que agem combinando a alta acidez com uma ação generalista (Maschwitz, 1974; Fernández-Marin *et al.*, 2006; Mendonça *et al.*, 2009).

Além desse método de prevenção e combate à patógenos, formigas cortadeiras apresentam uma relação simbiótica com actinomicetos capazes de produzir metabólitos com funções antimicrobianas. Estudos anteriores apontam

que o espectro de ação desses compostos é curto e existe mais especificamente contra o fungo necrotrófico *Escovopsis* (Currie *et al.*, 1999; Currie *et al.*, 2003; Reynolds & Currie, 2004; Currie *et al.*, 2006). Segundo Currie *et al.* (2006), *Pseudonocardia* se localiza na superfície das placas propleurais das formigas, dentro de estruturas especializadas porosas. As colônias de bactérias crescem em razão de nutrientes secretados por glândulas exócrinas localizadas logo abaixo dessas cavidades.

Dentre as mais de 250 espécies do gênero *Acromyrmex* já identificadas, a parasita social *Acromyrmex ameliae* e a formiga *Acromyrmex disciger* ainda não tiveram a relação formiga x actinomicetos explorada. Contudo, através de observações prévias suspeitou-se que esses microrganismos estejam ausentes nessas espécies, pois não há um revestimento branco, formado por actinomicetos, sobre o corpo dessas formigas, ao contrário de *Ac. subterraneus subterraneus*, por exemplo. Sendo assim, neste capítulo, objetivou-se: 1) verificar a presença de estruturas especializadas que poderiam abrigar actinomicetos nessas três espécies de formigas; e 2) determinar a implicação da ausência dessas estruturas para as cortadeiras.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Verificação da presença da estruturas especializadas no tegumento em espécies de *Acromyrmex*

2.1.1 – Coleta das formigas

Os indivíduos utilizados no ensaio foram retirados de colônias do Insetário da UFV. As espécies estudadas foram: *Acromyrmex meliae*, *Ac. disciger* e *Ac. subterraneus subterraneus*. As duas primeiras foram utilizadas, pois não apresentam actinomicetos sobre seu corpo. Já a última foi utilizada como possível controle positivo para presença de estruturas especializadas de abrigo de actinomicetos, já que possui a camada “cerosa” e branca sobre o corpo. Operárias de três tamanhos medidas pelo tamanho da cápsula cefálica de *A. disciger* (0,7; 0,95; e 1,3 mm) e *A. subterraneus subterraneus* (0,8; 1,4; e 1,85 mm) foram coletadas. Operárias de *A. meliae* apresentam homogeneidade quanto ao tamanho, portanto somente um tamanho foi utilizado no trabalho (cápsula cefálica=0,8 mm).

2.1.2 – Histologia

Os espécimes coletados sofreram dissecação, utilizando-se duas pinças sob microscópio estereoscópico, para que fossem separados a cabeça, o tórax, o gáster. As peças foram fixadas em solução Zamboni (Stefanini *et al.*, 1967) por aproximadamente três semanas. Após esse período, elas foram desidratadas em séries de concentrações de etanol (70%, 80%, 90% e 95%) e acetona (duas

vezes). As amostras permaneceram por 10 minutos em cada uma das séries. Finalmente, elas foram embebidas em historesina JB4, por quatro semanas. Após a polimerização, as peças foram seccionadas longitudinalmente, com 3 µm de espessura e coradas com hematoxilina e eosina. Retiraram-se fotografias utilizando-se um microscópio estereoscópico binocular Leica acoplado a uma máquina digital.

2.2 – Tamanho da glândula metapleural em espécies de *Acromyrmex*

O tamanho da glândula metapleural das três espécies coletadas foi estimado usando-se as medidas da bula como referência. A dimensão dessa glândula é refletida diretamente no tamanho dessa estrutura, presente externamente no corpo da formiga. Assim como a glândula metapleural, a bula se localiza no fim da região pleural, acima do terceiro par de pernas. Coletaram-se 20 formigas, por espécie, no Insetário da UFV. Tomaram-se as medições da bula de cada um dos indivíduos e os dados foram corrigidos de acordo com o tamanho da cápsula cefálica das formigas. Os dados foram analisados por meio de análise de variância, estabelecido o nível de significância de $p < 0,05$. A identificação dos tratamentos que apresentaram médias significativamente distintas foi realizada através do teste comparativo de Tukey ($\alpha = 5\%$). As análises foram realizadas no programa SAEG 9.0.

3 – RESULTADOS

Verificou-se que operárias de *Ac. disciger* apresentam tegumento bastante regular em todas as regiões de seu corpo e quantidades consideráveis de pelos, principalmente no tórax e no gáster. Estruturas especializadas para abrigo de actinomicetos simbiotes, como criptas ou tubérculos não foram encontrados (Figura 2.1a-f).

Já em formigas cortadeiras da subespécie *Ac. subterraneus subterraneus*, consideradas as maiores em média dentre as três espécies analisadas, foram verificados tegumentos pouco acidentados e algumas poucas cavidades para a inserção de sensilas, tanto na região da cabeça, quanto no tórax e no gáster. Nas três partes do corpo dessa cortadeira também não foram localizadas estruturas especializadas para abrigo de actinomicetos simbiotes. Não foram observadas diferenças nas estruturas presentes em formigas de tamanhos distintos em *Ac. disciger* e *Ac. subterraneus subterraneus* (Figura 2.2a-f).

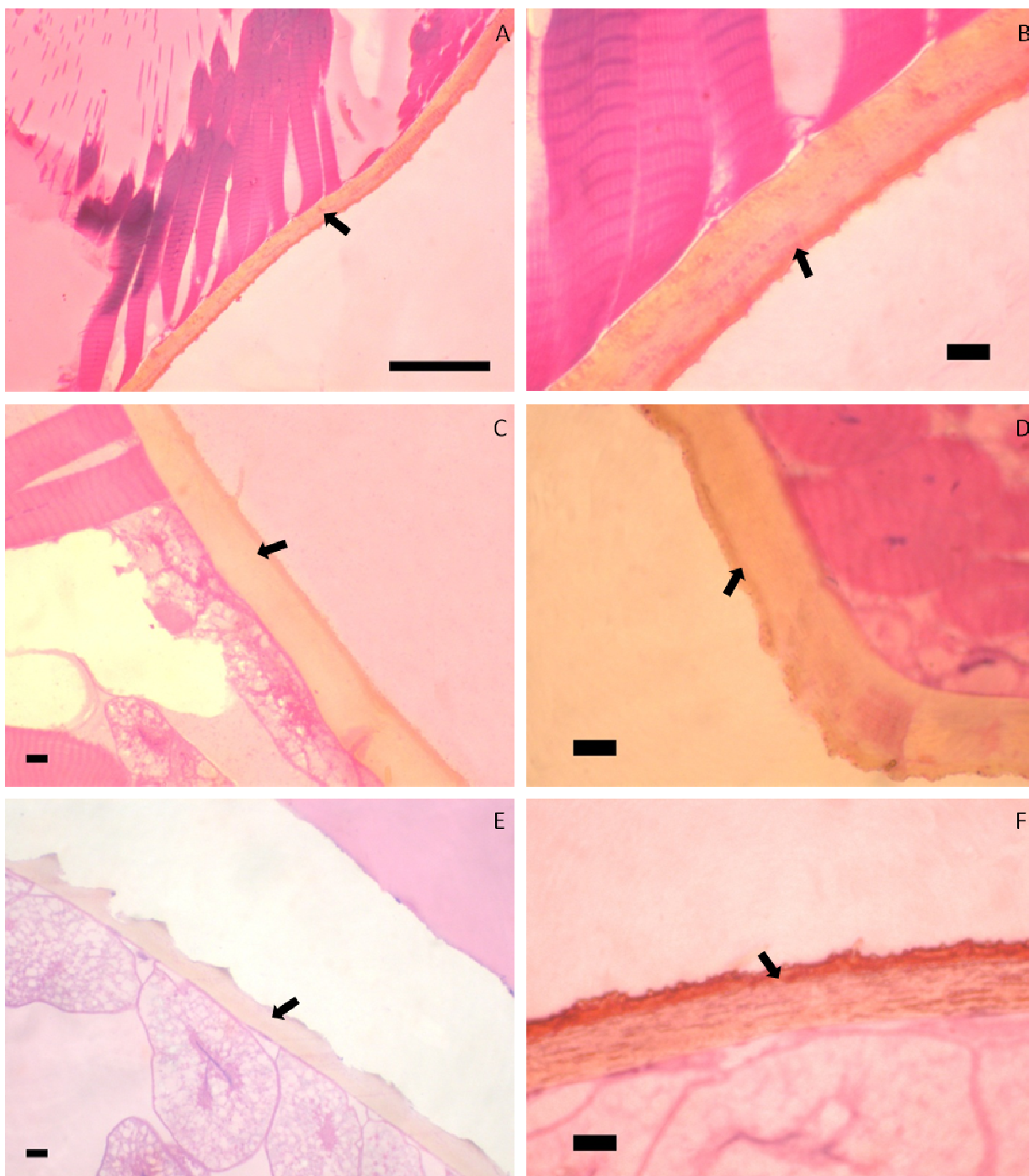


Figura 2.1 - Micrografias mostrando secções longitudinais de partes do corpo de operárias da formiga cortadeira *Acromyrmex disciger* evidenciando o tegumento (seta) com tubérculos ausentes. (A) corte da região da cabeça de operária máxima. Barra = 50µm. (B) corte da região da cabeça de operária máxima, (C) corte da região dorsal do tórax de operária máxima, (D) corte da região ventral do tórax de operária máxima, (E) corte da região ventral do gáster de operária máxima, (F) corte da região dorsal do gáster de operária máxima. Barra = 10µm.

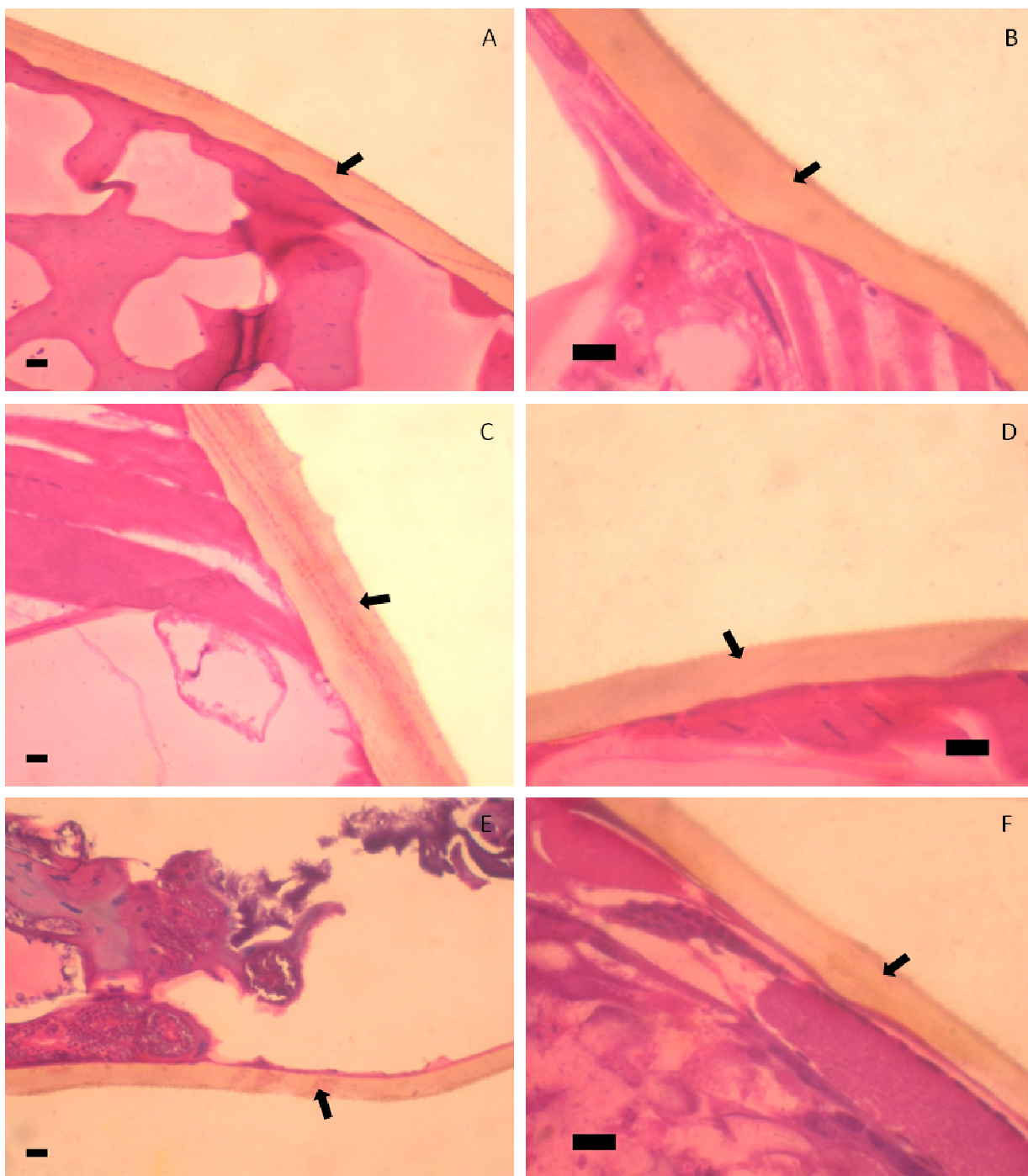


Figura 2.2 - Micrografias mostrando secções longitudinais de partes do corpo de operárias da formiga cortadeira *Acromyrmex subterraneus subterraneus* evidenciando o tegumento (seta) com tubérculos ausentes. (A) corte da região da cabeça de operária média, (B) corte da região da cabeça de operária mínima, (C) corte da região ventral do tórax de operária máxima, (D) corte da região ventral do tórax de operária mínima, (E) corte da região ventral do gáster de operária mínima, (F) corte da região dorsal do gáster de operária mínima. Barra = 10µm.

Na parasita *Ac. ameliae*, que possui operárias de tamanho único, observou-se um tegumento bastante irregular e nenhum pelo ou sensila nas regiões da cabeça, do tórax e do gáster. Assim como em *Ac. disciger* e *Ac. subterraneus subterraneus*, não foram encontradas fôveas nem tubérculos como locais de refúgio para as bactérias simbiotes de formigas cortadeiras (Figura 2.3a-f).

Nas medições do tamanho da bula das três espécies de formigas cortadeiras, os resultados da ANOVA indicaram que houve diferenças significativas entre espécies analisadas ($F=3,40$, $p=0,04$). Os resultados do teste comparativo de Tukey estão na figura 2.4. Verificou-se que *Ac. disciger* apresentou o tamanho da bula maior do que *Ac. subterraneus subterraneus* ($p=0,03$). Porém, essa diferença não ocorreu quando comparados o tamanho da bula de *Ac. disciger* com o de *Ac. ameliae* ($p=0,51$). O mesmo ocorreu quando comparadas as espécies *Ac. ameliae* e *Ac. subterraneus subterraneus* ($p=0,31$).

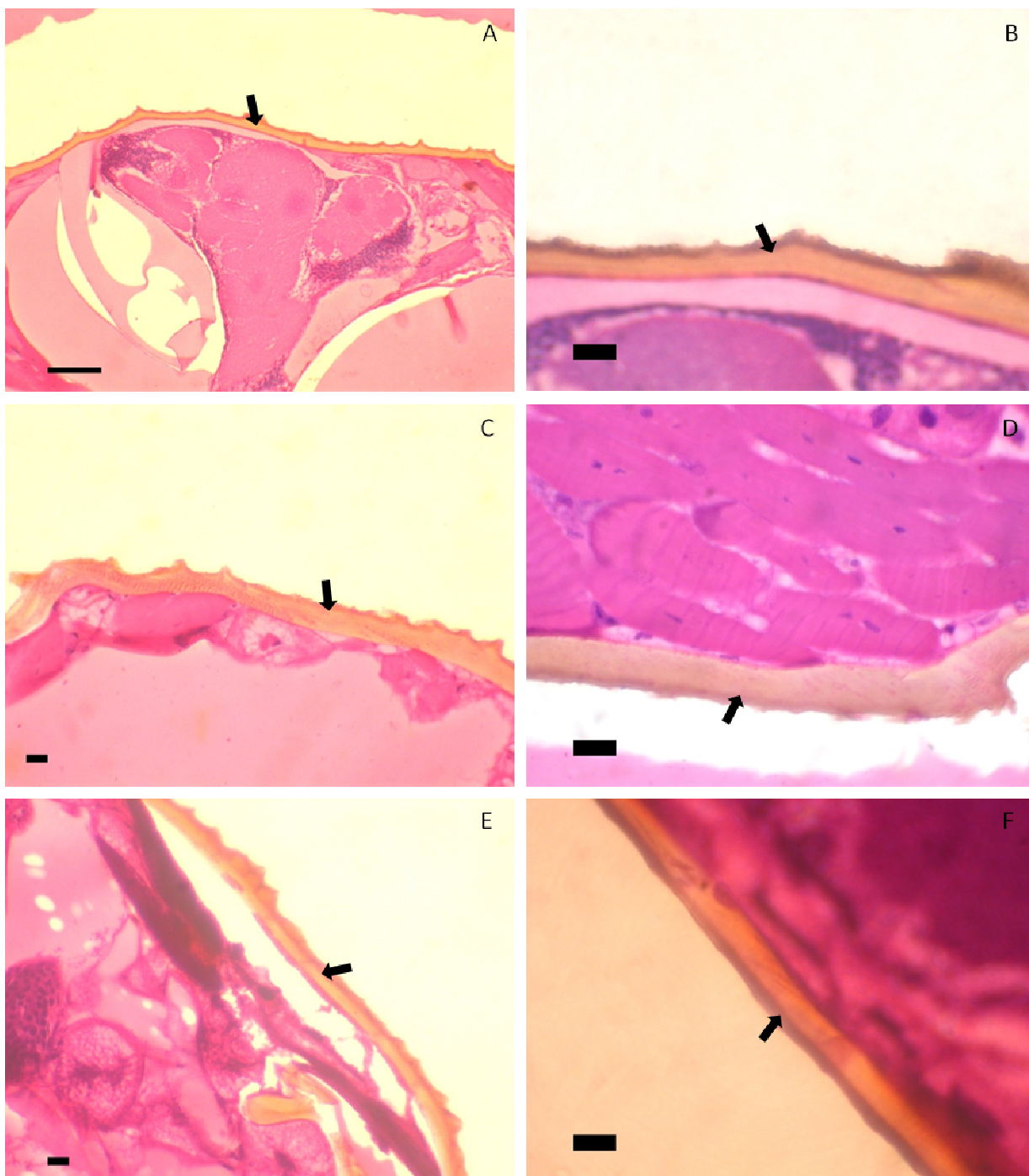


Figura 2.3 – Micrografias mostrando secções longitudinais de partes do corpo de operárias da formiga parasita *Acromyrmex ameliae* evidenciando o tegumento irregular (seta) com tubérculos ausentes. (A) corte da região da cabeça. Barra = 50µm. (B) corte da região da cabeça, (C) corte da região dorsal do tórax, (D) corte da região ventral do tórax, (E) corte da região dorsal do gáster, (F) corte da região ventral do gáster. Barra = 10µm.

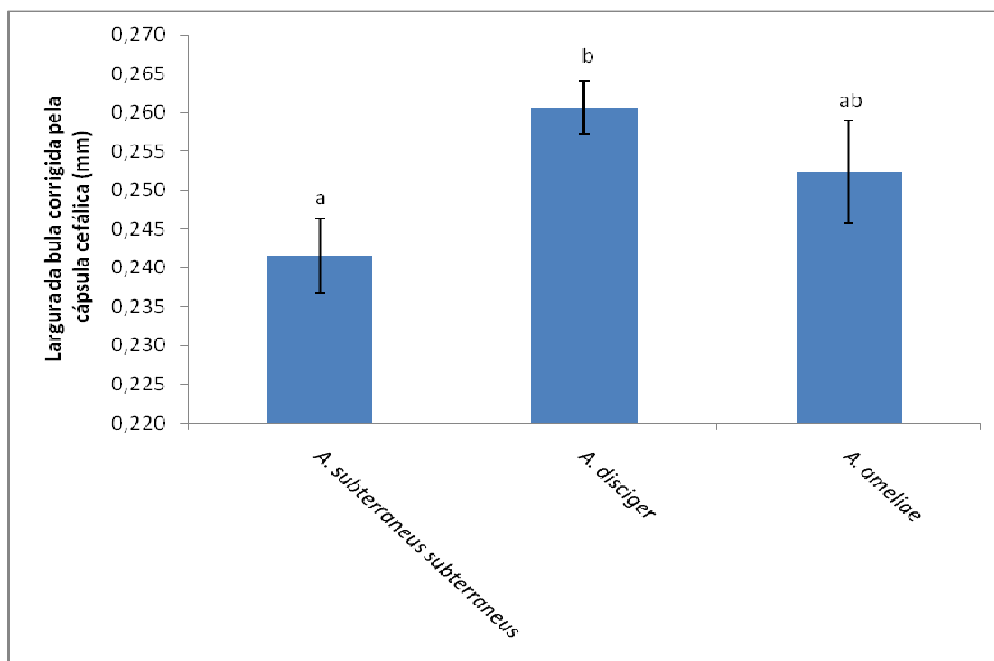


Figura 2.4 - Largura da bula corrigida pela cápsula cefálica nas três espécies de formigas cortadeiras analisadas. Barras verticais representam o erro padrão. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância

4 – DISCUSSÃO

Acromyrmex subterraneus subterraneus não apresentou criptas ou mesmo cavidades em tubérculos na cabeça, no tórax e no gáster. Apesar desta espécie apresentar actinomicetos em grande quantidade sobre a cutícula, onde formam uma camada esbranquiçada (Anexos - figura 4A), é possível que glândulas exócrinas liberem suas secreções diretamente sobre a superfície do tegumento, permitindo o crescimento e desenvolvimento das colônias de actinomicetos nesses locais.

Em *Ac. disciger*, cuja característica discriminante é a presença de grande quantidade de pelos sobre todo o corpo, não se verificou qualquer estrutura com cavidades onde fosse possível a alocação de actinomicetos, na cabeça, tórax ou

gáster. Fernandez-Marín *et al.* (2009) encontraram uma associação negativa entre a abundância relativa de *Pseudonocardia* e a frequência de “grooming” (lambadura) na glândula metapleurale em formigas da tribo Attini. Segundo aquele trabalho, espécies do gênero *Trachymyrmex* e *Acromyrmex* possuem grande quantidade de actinomicetos sobre a cutícula, enquanto *Atta* e *Sericomyrmex* (em que não foram encontradas bactérias) exibem alta frequência do comportamento de “grooming” da glândula metapleurale; há dessa forma um tipo de “trade-off” no controle social de patógenos. Até mesmo dentro de um mesmo ninho, entre formigas de diferentes castas, o “trade-off” entre tamanho da glândula metapleurale e quantidade de actinomicetos simbiotes presentes ocorre (Poulsen *et al.*, 2002). Tal fato foi confirmado no presente trabalho quando se realizou medições do tamanho da bula, um indicativo da largura da glândula metapleurale. Apesar da ausência de actinomicetos e estruturas que suportem tais microrganismos, *Ac. disciger* apresentou a largura da bula maior do que as outras duas espécies de formigas cortadeiras analisadas. Dessa forma, a produção de antibióticos pela glândula metapleurale supre a falta de actinomicetos em formigas dessa espécie.

Assim como em *Ac. subterraneus subterraneus* e *Ac. disciger*, em *Ac. ameliae*, parasita social das espécies *Ac. subterraneus subterraneus* e *Ac. subterraneus brunneus*, também não foram localizadas foveas ou tubérculos em nenhuma das três regiões do corpo analisadas. Em formigas parasitas sociais da espécie *Acromyrmex insinator*, operárias possuem glândulas metapleurais menores que as de seus respectivos hospedeiros (*Acromyrmex echinator*) (Sumner, *et al.*, 2003). Assim, como as parasitas possuem estreita relação com suas hospedeiras, adquirindo alimento e abrigo (De Souza *et al.*, 2007) é possível que também explorem o potencial defensivo de *Ac. subterraneus subterraneus* e

Ac. subterraneus brunneus. Uma vez que as formigas parasitas estão localizadas no mesmo ambiente que as hospedeiras, é plausível deduzir que tanto o comportamento de “allogrooming” (lambadura sobre companheiras de ninho) da glândula metapleurale das hospedeiras sobre as parasitas quanto actinomicetos presentes nos ninhos protejam *Ac. ameliae* contra microrganismos patogênicos.

Segundo Currie *et al.*(2006), o exoesqueleto de formigas da tribo Attini, de forma geral, é modificado para hospedar actinomicetos simbiotes em estruturas especializadas dotadas de glândulas exócrinas que auxiliam no crescimento das colônias dessas bactérias. Porém, os resultados do presente trabalho não corroboram com a conclusão do trabalho anteriormente descrito.

Em trabalhos com outros insetos, localizaram-se estruturas capazes de abrigar e nutrir actinomicetos simbiotes. Besouros da espécie *Dendroctonus frontalis* possuem invaginações glandulares especializadas localizadas no protórax, denominados micângios, onde cultivam o fungo simbiote *Entomocorticium* sp. (Kleipzig *et al.*, 2001). Scott *et al.*(2009) encontraram actinomicetos estritamente relacionados à espécie *Streptomyces thermosacchari* nessa mesma estrutura. Fêmeas da vespa solitária predadora *Philanthus triangulum* F. cultivam uma bactéria simbiote do gênero *Streptomyces* no interior de grandes reservatórios, dotados de glândulas especializadas, localizados nos antenômeros desses insetos. Essas bactérias são depositadas nas células da colméia onde está localizada a prole, para protegê-la contra fungos (Kaltenpoth *et al.*,2005; Goettler *et al.*,2007).

No trabalho de Currie *et al.* (2006) foram analisados diversos gêneros de formigas cortadeiras como *Apterostigma*, *Acromyrmex*, *Atta*, *Cyphomyrmex*, *Trachymyrmex*, dentre outros. Com exceção do gênero *Atta*, em todas as outras

formigas foram encontradas fóveas ou tubérculos com poros que alojam actinomicetos. Contudo, analisando o gênero *Acromyrmex* separadamente, nota-se que somente a espécie *Ac. octospinosus* foi examinada naquele trabalho e os resultados foram extrapolados para todo o gênero. No presente trabalho foram analisadas três espécies de *Acromyrmex* e, em nenhuma foi encontrada tal estrutura.

Formigas cortadeiras possuem diversas estratégias para se defender contra microrganismos, assim, caso uma dessas táticas falhe ou não exista em uma espécie, pode haver implicações diretas sobre outras formas de defesa. Do mesmo modo como o obtido neste trabalho para *Ac. disciger* e *Ac. ameliae*, cortadeiras do gênero *Atta*, por exemplo, não possuem o actinomiceto *Pseudonocardia* (Mueller *et al.*, 2008). Dessa forma, pode ser que a frequência do comportamento de “allogrooming” (lambadura da companheira de ninho), “autogrooming” (lambadura do próprio corpo) e/ou “fungus grooming” (lambadura do jardim de fungo) aumente (Schmid-Hempel, 1998; Currie & Stuart, 2001); a produção de secreções antimicrobianas pela glândula metapleurar cresça (Bot *et al.*, 2002); e/ou exista uma elevação da resposta imune desses insetos (Cremer *et al.*, 2007). Logo, é necessário que investigações mais aprofundadas sejam realizadas para se verificar quais cortadeiras realmente apresentam essas estruturas especializadas, o que poderia afetar diretamente as formas de defesa utilizadas pelas mesmas.

5 – CONCLUSÕES

- Operárias de diferentes tamanhos de formigas cortadeiras das espécies *Acromyrmex subterraneus subterraneus*, *Acromyrmex disciger* e da parasita social *Acromyrmex meliae* não apresentam nenhuma estrutura com cavidades onde seja possível a alocação de actinomicetos nas regiões da cabeça, tórax ou gáster.
- *Acromyrmex disciger* apresentou o maior tamanho da glândula metapleural dentre as espécies analisadas, mostrando que essa estratégia de defesa pode ser a mais utilizada por essa formiga no combate à microrganismos.

6 – REFERÊNCIAS

Billen J (2009). Occurrence and structural organization of the exocrine glands in the legs of ants. *Arthropod Structure and Development* 38:2-15.

Billen J, Morgan ED (1998). Pheromone communication in social insects – sources and secretions. In: Vander Meer RK, Breed MD, Winston ML, Espelie KE (eds.). *Pheromone Communication in Social Insects: Ants, Wasps, Bees, and Termites*. Westview Press, Boulder, CO. pp. 3-33.

Currie CR, Poulsen M, Mendenhall J, Boomsma JJ, Billen J (2006). Coevolved crypts and exocrine glands support mutualistic bacteria in fungus-growing ants. *Science* 311:81-83.

Currie CR, Wong B, Stuart AE, Schultz TR, Rehner SA, Mueller UG, Sung GH, Spatafora JW, Straus NA (2003). Ancient tripartite coevolution in the attine ant-microbe symbiosis. *Science* 299:386-388.

Currie CR, Scott JA, Summerbell RC, Malloch D (1999). Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *Nature* 398:701-704.

de Souza DJ, Soares IMF, Della Lucia TMC (2007). *Acromyrmex ameliae* sp.n. (Hymenoptera: Formicidae): A new social parasite of leaf-cutting ants in Brazil. *Insect Science* 14:251-257.

Fernández-Marín H, Zimmerman JK, Nash DR, Boomsma JJ, Wcislo WT (2009). Reduced biological control and enhanced chemical pest management in the evolution of fungus farming in ants. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 276:2263-2269.

Fernández-Marín H, Zimmerman JK, Rehner SA, Wcislo WT (2006). Active use of metapleural glands by ants in controlling fungal infection. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 273:1689-1695.

Goettler W, Kaltenpoth M, Herzner G, Strohm E (2007). Morphology and ultrastructure of a bacteria cultivation organ: the antennal glands of female European beewolves, *Philanthus triangulum* (Hymenoptera, Crabronidae). *Arthropod Structure & Development* 36:1-9.

Hölldobler B, Wilson EO (1990). *The Ants*. Harvard University Press, Cambridge, MA. 782 pp.

Kaltenpoth M, Göttler W, Herzner G, Strohm E (2005). Symbiotic bacteria protect wasp larvae from fungal infestation. *Current Biology* 15:475-479.

Klepzig KD, Moser JC, Lombardero MJ, Hofstetter RW, Ayres MP (2001) Symbiosis and competition: complex interactions among beetles, fungi, and mites. *Symbiosis* 30:83-96.

Marsaro AL Jr., Della Lucia TMC, Barbosa LCA, Maffia LA, Morandi MAB (2001). Efeito de secreções da glândula mandibular de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) sobre a germinação de conídios de *Botrytis cinerea* Pers. *Fr. Neotropical Entomology* 30:403-406.

Maschwitz U (1974). Vergleichende Untersuchungen zur Funktion der Ameisenmetathorakaldrüse. *Oecologia* 16:303-310.

Maschwitz U, Koob K, Schildknecht H (1970). Ein Beitrag zur Funktion der Metapleuraldrüse der Ameisen. *Journal of Insect Physiology* 16:387-404.

Mendonça AL, da Silva CE, de Mesquita FLT, Campos RS, do Nascimento RR, Ximenes ECPA, Sant'Ana AEG (2009). Antimicrobial activities of components of the glandular secretions of leaf cutting ants of the genus *Atta*. *Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology* 95:295-303.

Mueller UG, Dash D, Rabeling C, Rodrigues A (2008). Coevolution between Attine ants and actinomycete bacteria: A reevaluation. *Evolution* 62:2894-2912.

Poulsen M, Bot ANM, Currie CR, Boomsma JJ (2002). Mutualistic bacteria and a possible trade-off between alternative defence mechanisms in *Acromyrmex* leaf-cutting ants. *Insectes Sociaux* 49:15-19.

Reynolds HT, Currie CR (2004). Pathogenicity of *Escovopsis*: the parasite of the attine ant-microbe symbiosis directly consumes the ant cultivated fungus. *Mycologia* 96:955-959.

Schowalter TD (2006). Responses to abiotic conditions. In: T. D. Schowalter (ed.). *Insect Ecology. An Ecosystem Approach*. 2 ed. Academic Press, Louisiana State University Baton Rouge. pp. 17-52.

Scott JJ, Oh DC, Yuceer MC, Klepzig KD, Clardy J, Currie CR (2008). Bacterial protection of beetle-fungus mutualism. *Science* 322:63.

Sumner S, Hughes WO, Boomsma JJ (2003). Evidence for differential selection and potential adaptive evolution in the worker caste of an inquiline social parasite. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 54:256-263.

Stefanini M, Demartino C, Zamboni L (1967). Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature* 216:173-174.

Wirth R, Beyschlag W, Ryel R, Herz H, Hölldobler B (2003). The herbivory of leaf-cutting ants. A case study on *Atta colombica* in the tropical rainforest of Panama. Springer Verlag, Berlin. 230 pp.

CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho objetivou-se isolar e avaliar o grau de inibição de actinomicetos sobre fungos presentes em colônias de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex*, identificar e verificar o grau de similaridade de diferentes linhagens desses mesmos microrganismos, além de verificar a presença de estruturas especializadas que poderiam abrigar esses actinomicetos em formigas cortadeiras, determinando a implicação de sua ausência para essas formigas. Observou-se que todos os fungos, entomopatogênicos ou não, encontrados durante a coleta não apresentaram especificidade quanto à formiga cortadeira associada, com ressalvas para *Beauveria bassiana* em *Acromyrmex niger* e *Mycelia sterilia* em *Acromyrmex subterraneus molestans*. Analisando-se diferentes isolados de actinomicetos simbiotes obtidos de cortadeiras, foi verificado que dependendo da linhagem, pode haver um papel protetor contra fungos, entomopatogênicos ou não. A quantidade de antibiótico produzido, o poder de inibição variado de cada um dos diferentes antibióticos ou a atuação de um grupo de antibióticos mais eficiente em uma linhagem de actinomicetos em relação a outra podem ser fatores que tenham contribuído para tal resultado. Em contrapartida, em algumas linhagens de actinomicetos, o efeito estimulatório sobre os fungos pode existir. Metabólitos secundários produzidos pelos actinomicetos com efeitos estimulantes sobre esses fungos é um fator que pode ter contribuído para tal resultado.

Na avaliação das taxas de inibição durante os dias, verificou-se que os acréscimos dessas taxas em actinomicetos sobre os fungos podem estar ligados ao aumento na concentração de antibióticos quando os fungos se aproximam

fisicamente dos actinomicetos ou ao aumento na quantidade de antibióticos concentrados na placa no decorrer dos dias. Os decréscimos das porcentagens de inibição podem estar relacionados a uma tolerância aos antibióticos adquirida pelo fungo ou ainda a um possível efeito estimulante dos antibióticos sobre os fungos.

Constatou-se, ainda, que linhagens de actinomicetos isolados de cada uma das espécies de cortadeiras constituíam espécies diferentes e não sequenciadas anteriormente. O actinomiceto isolado da formiga *Ac. balzani* foi identificado como sendo do gênero *Streptomyces*, enquanto os outros, obtidos nas outras espécies, foram identificados como diferentes linhagens de actinomicetos pertencentes ao gênero *Pseudonocardia*.

Quando avaliada a presença de estruturas especializadas com cavidades onde seja possível a alocação de actinomicetos em operárias de diferentes tamanhos de formigas das espécies *Ac. subterraneus subterraneus*, *Ac. disciger* e *Ac. ameliae* verificou-se que nas regiões da cabeça, tórax ou gáster não há indícios destas criptas. Assim, caso uma das estratégias de defesa das cortadeiras não seja eficiente ou não exista em uma espécie, pode haver compensação direta sobre outras formas de defesa. Além de apresentar grande quantidade de pelos sobre o corpo, *Ac. disciger* apresentou o maior tamanho da glândula metapleural dentre as espécies analisadas. Isso mostra que essas estratégias de defesa podem ser as mais utilizadas por essa formiga no combate à microrganismos, uma vez que elas não possuem uma camada de actinomicetos visíveis sobre o corpo. Essa camada também está ausente na parasita social *Ac. ameliae*, porém nesse caso é provável que essa formiga explore a capacidade defensiva de seus hospedeiros para se proteger contra microrganismos. Já em

Ac. subterraneus subterraneus, é possível que glândulas exócrinas liberem suas secreções diretamente sobre a superfície do tegumento desses insetos, possibilitando o desenvolvimento dos actinomicetos presentes nessas formigas.

Experimentos adicionais a fim de identificar o(s) composto(s) secretado(s) pelos actinomicetos e verificar qual é a concentração mínima que leva esse(s) composto(s) a causar um dos efeitos (antibiose ou estimulação) sobre fungos, ainda são necessários. Investigações mais aprofundadas também são imprescindíveis para se verificar quais cortadeiras realmente apresentam as estruturas especializadas de abrigo de actinomicetos, o que poderia afetar diretamente as formas de defesa utilizadas pelas mesmas.

ANEXOS

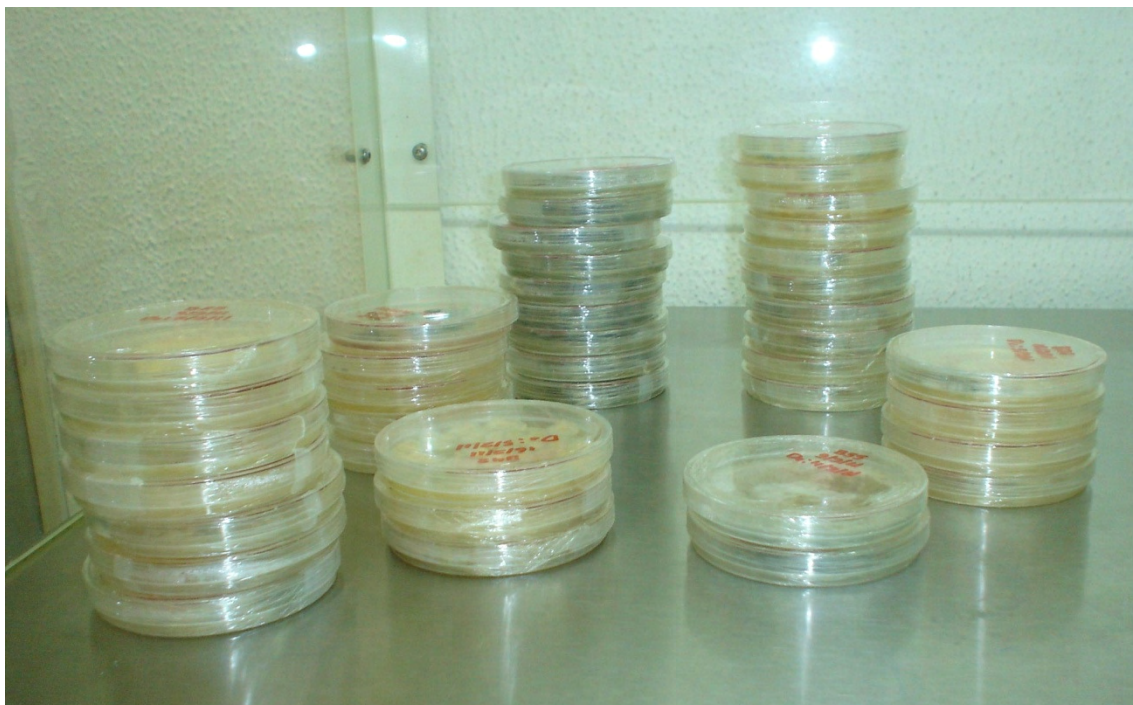


Figura 1A - Fotografia mostrando placas com fungos obtidas em uma das espécies de formigas forrageadoras avaliadas.

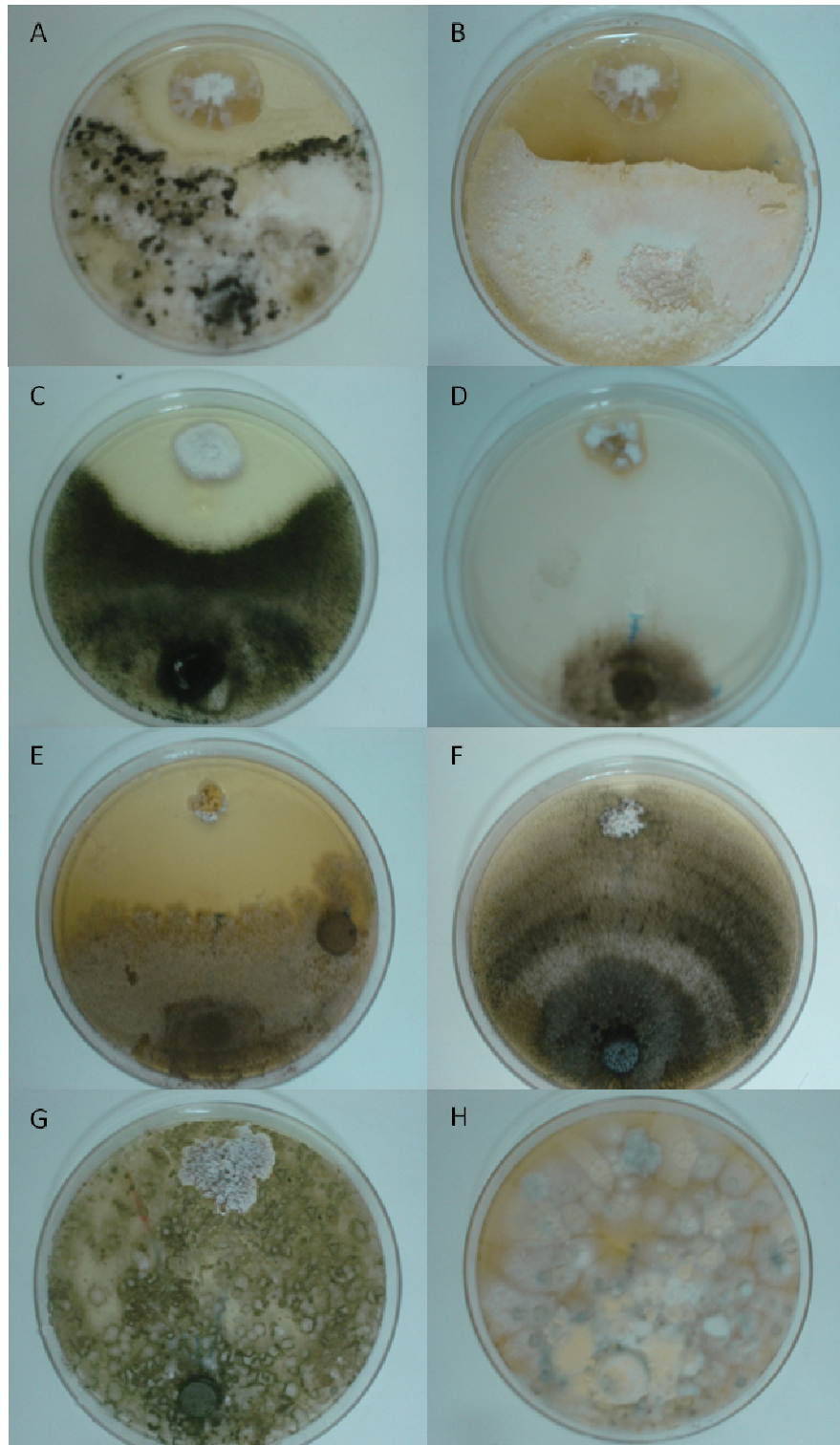


Figura 2A - Fotografia mostrando fungos que apresentaram respostas significativamente positivas ou negativas às linhagens de actinomicetos (parte superior da placa). (A)-(D) Linhagem retirada de *Acromyrmex balzani*. Efeito sobre: (A) *Aspergillus niger*, (B) *Aspergillus terreus*, (C) *Aspergillus versicolor* cf. *sydowii*, (D) *Escovopsis* sp. (E)-(F) Linhagem retirada de *Acromyrmex subterraneus molestans*. Efeito sobre: (E) *Escovopsis* sp., (F) *Mycelia sterilia*. (G)-(H) Linhagem retirada de *Acromyrmex niger*. Efeito sobre: (G) *Aspergillus versicolor* cf. *sydowii*, (H) *Penicillium* sp.

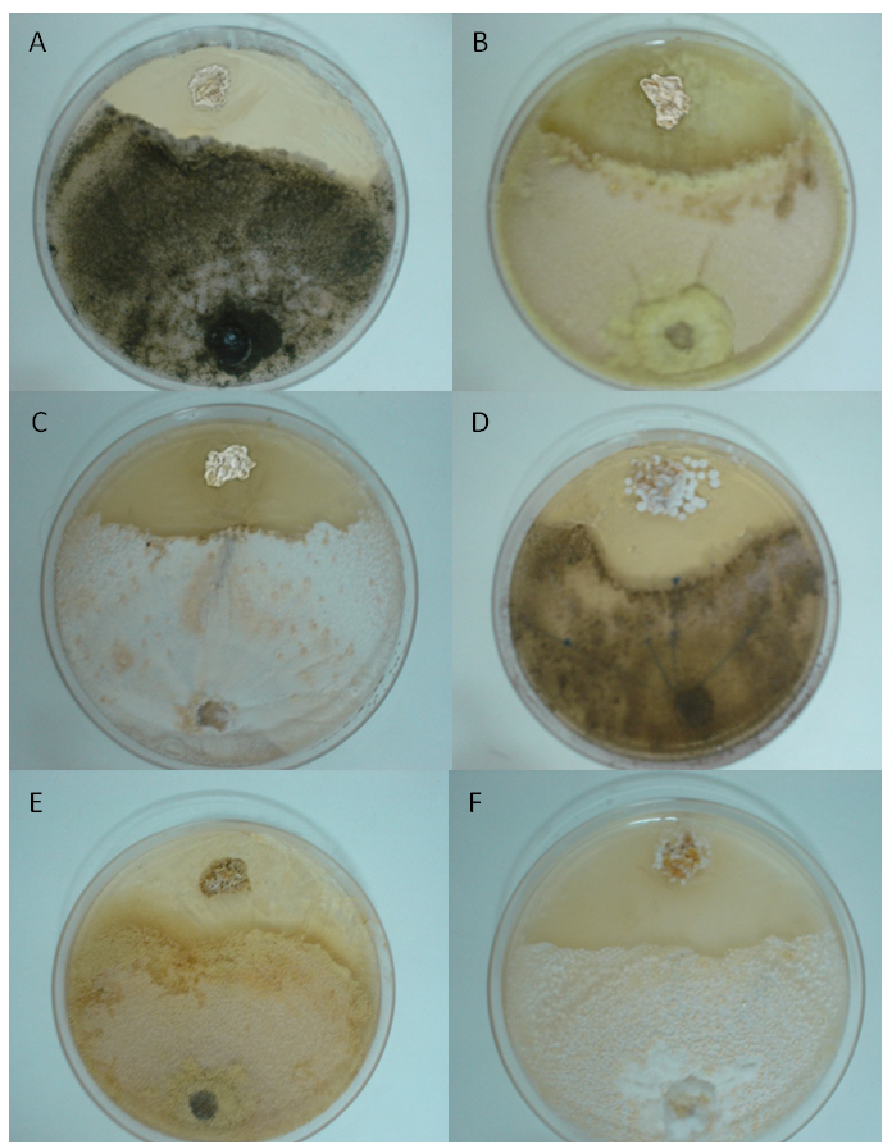


Figura 3A - Fotografia mostrando fungos que apresentaram respostas significativamente positivas ou negativas às linhagens de actinomicetos (parte superior da placa). (A)-(C) Linhagem retirada de *Acromyrmex rugosus*. Efeito sobre: (A) *Aspergillus niger*, (B) *Aspergillus ochraceus*, (C) *Aspergillus terreus*. (D)-(F) Linhagem retirada de *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. Efeito sobre: (D) *Escovopsis* sp., (E) *Aspergillus ochraceus*, (F) *Aspergillus terreus*.

Tabela 1A - Dados das regressões quadráticas para as taxas de inibição de fungos por linhagens obtidas por actinomicetos simbiotes de formigas cortadeiras.

Linhagem de actinomicetos	Fungo	Equação	R ²	F	p
<i>Acromyrmex balzani</i>	<i>A. niger</i>	$y = -1,4346x^2 + 18,3345x - 0,6751$	0,6778	7,3625	0,019
	<i>A. ochraceus</i>	$y = -1,0478x^2 + 14,0278x + 12,5374$	0,7453	10,2415	0,0083
	<i>A. versicolor</i>	$y = -0,9535x^2 + 15,2787x + 2,0799$	0,7659	11,4523	0,0062
	<i>Penicillium</i> sp.	$y = 0,6645x^2 - 2,1288x - 36,7483$	0,9028	32,5123	0,0003
	<i>Escovopsis</i> sp.	$y = -1,0418x^2 + 8,3241x + 50,6695$	0,9737	37,0887	0,0263
<i>Acromyrmex subterraneus molestans</i>	<i>A. niger</i>	$y = 0,3627x^2 - 7,5223x + 47,6135$	0,7885	9,3197	0,0206
	<i>A. ochraceus</i>	$y = -1,5839x^2 + 21,9370x - 61,1969$	0,867	22,8213	0,0009
	<i>A. versicolor</i>	$y = 0,1939x^2 + 3,0894x - 19,3668$	0,7176	8,8943	0,012
	<i>Escovopsis</i> sp.	$y = 0,7471x^2 + 0,8860x + 23,6541$	0,764	3,2367	0,236
	<i>Mycelia sterilia</i>	$y = 1,3155x^2 - 19,1838x + 27,1201$	0,9285	45,461	<0,0001
<i>Acromyrmex niger</i>	<i>A. terreus</i>	$y = 0,6620x^2 - 6,0499x + 2,7876$	0,5143	3,7056	0,0799
	<i>A. versicolor</i>	$y = 2,6372x^2 - 35,5801x + 53,2619$	0,7565	10,8743	0,0071
	<i>Beauveria bassiana</i>	$y = 0,6792x^2 - 3,6585x + 10,4000$	0,7842	12,7168	0,0047
	<i>Escovopsis</i> sp.	$y = 1,4329x^2 - 5,0293x + 6,2347$	0,3645	0,5735	0,6355
	<i>Penicillium</i> sp.	$y = 0,4403x^2 - 9,1223x + 23,3509$	0,8266	16,6891	0,0022
<i>Acromyrmex subterraneus subterraneus</i>	<i>A. ochraceus</i>	$y = -1,8559x^2 + 28,4731x - 85,0002$	0,8985	30,9926	0,0003
	<i>A. niger</i>	$y = -0,7397x^2 + 8,0234x - 2,3995$	0,3533	1,9119	0,2175
	<i>A. terreus</i>	$y = -1,8322x^2 + 21,3830x - 9,5491$	0,5992	5,2322	0,0408
	<i>Escovopsis</i> sp.	$y = -5,0457x^2 + 34,9315x - 5,5175$	0,9319	13,6916	0,0681
	<i>Penicillium</i> sp.	$y = -0,4007x^2 + 6,4420x - 2,2848$	0,5787	4,8071	0,0485
<i>Acromyrmex rugosus</i>	<i>A. ochraceus</i>	$y = -0,2952x^2 + 5,5121x - 1,9722$	0,7017	8,2334	0,0145
	<i>A. niger</i>	$y = -0,5803x^2 + 3,2756x + 57,6558$	0,4581	1,2678	0,399
	<i>A. terreus</i>	$y = -0,1639x^2 + 3,3504x + 0,2642$	0,5638	4,5247	0,0548
	<i>Penicillium</i> sp.	$y = -3,9506x^2 + 60,4592x - 229,6656$	0,6426	6,2923	0,0273



Figura 4A. - Operárias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. À esquerda indivíduo com presença de actinomicetos sobre o tegumento e à direita indivíduo sem tais bactérias.