

PAPEL DE BACTÉRIAS ECTO-SIMBIONTES EM *Acromyrmex
subterraneus subterraneus* (Forel, 1901) NA PROTEÇÃO CONTRA
FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

THALLES CARDOSO MATTOSO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

Março – 2012

PAPEL DE BACTÉRIAS ECTO-SIMBIONTES EM *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Forel, 1901) NA PROTEÇÃO CONTRA FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

THALLES CARDOSO MATTOSO

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal”.

Orientador: Profº. Ph.D. Richard Ian Samuels
Coorientadora: Drª Denise Dolores Oliveira Moreira

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
MARÇO – 2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCTA / UENF 038/2012

Mattoso, Thalles Cardoso

Papel de bactérias ecto-simbiontes em *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Forel, 1901) na proteção contra fungos entomopatogênicos / Thalles Cardoso Mattoso. – 2012.
60 f. : il.

Orientador: Richard Ian Samuels
Dissertação (Mestrado - Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2012.
Bibliografia: f. 49 – 60.

1. Simbiose 2. Attini 3. Actinomiceto I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD – 595.796

PAPEL DE BACTÉRIAS ECTO-SIMBIONTES EM *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Forel, 1901) NA PROTEÇÃO CONTRA FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

THALLES CARDOSO MATTOSO

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal”.

Aprovada em 29 de Março de 2012

Comissão examinadora:

Dr. Adão Valmir dos Santos (D.Sc. Produção Vegetal) – CBB - UENF

Prof. Dr. Cláudio Luiz Melo de Souza (D.Sc. Produção Vegetal) – ISTCA -
FAETEC

Prof. Dr. Milton Erthal Jr. (D.Sc. Produção Vegetal) - IFF

Prof. Dr. Richard Ian Samuels (Ph.D. Bioquímica e Biologia Molecular) – UENF
(Orientador)

“Aos meus pais, Lidia e Edmar, DEDICO este trabalho por estarem sempre ao meu lado nos momentos mais difíceis, pelos bons exemplos e pela vida que me concederam.”

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre me mostrar o melhor caminho a seguir;

Aos meus pais Lidia Maria Dornellas Cardoso Mattoso e Edmar Gouvêa Mattoso que sempre me ajudaram e me apoiaram em minhas conquistas;

À avó Teresinha que sempre se preocupou com minha alimentação, bem como aos demais avós Edy, Edmilson e Ney que sempre me acompanharão onde estiver;

À minha pequena Amanda, amor da minha vida, que mesmo longe, sempre está ao meu lado;

À minha irmã Nathalia de quem gosto muito;

Ao meu tio Dom Edney pela formação religiosa;

À minha mentora e segunda mãe Denise que me introduziu no mundo da mirmecologia e que participou integralmente deste trabalho;

À minha amiga Arli pelos momentos divertidos e pelos cafés à tarde;

Ao professor Richard pela oportunidade e pela ajuda nos momentos de dificuldade;

A Maria de Fátima, Abílio e Guilherme pelos bons momentos;

Aos amigos de laboratório Aline, Adriano, Cátia, Gustavo, Laerciana, Simone, Sheila e Verônica;

Aos amigos do LEF Fabíola, Ildefonso, Shênia e Vitor;

Aos professores Marinete, Ana e Omar;

Aos amigos de sempre: Herbert, Wagner, Sumaya, Tadeu, Dione, Viviane, Jefferson, Wilson e muitos outros que não caberiam nesta página.

RESUMO

MATTOSO, Thalles Cardoso, M.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Março de 2012. Papel de bactérias ecto-simbiontes em *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Forel, 1901) na proteção contra fungos entomopatogênicos. Professor Orientador: Richard Ian Samuels.

As formigas cortadeiras são comumente conhecidas por suas organizações sociais, que lhes conferem uma forte defesa contra organismos invasores de suas colônias. Além desse atributo, estes insetos apresentam características morfológicas, estruturais e fisiológicas que reforçam ainda mais a guarda em seus ninhos. Com a descoberta de bactérias simbiotes presentes no tegumento destas formigas verificou-se uma nova linha de defesa, porém considerado específico para o fungo *Escovopsis*, parasita dos jardins de fungo das colônias. Contudo, em estudos recentes foi levantada a questão quanto à especificidade de ação destas bactérias, pois também são capazes de inibir a germinação de outros fungos, inclusive entomopatogênicos. Este trabalho teve como objetivo investigar a virulência dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* (ESALQ 818) e *Beauveria bassiana* (CG 24) quando inoculados em operárias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* apresentando bactérias no exoesqueleto, que receberam dois tipos de pré-tratamento: (1) banhados por cinco segundos em solução de antibiótico gentamicina (20% Garamicina[®]) e (2)

banhados por cinco segundos em água destilada autoclavada. As formigas pré-tratadas foram expostas ao fungo entomopatogênico via contato com papel filtro impregnado com uma suspensão de conídios, ou em contato com papel filtro embebido somente com solução de Tween 80 (0,05%). As formigas foram observadas diariamente, sendo avaliada a sobrevivência/mortalidade de cada grupo durante 10 dias. As formigas do pré-tratamento 1, expostas ao *M. anisopliae*, foram mais susceptíveis à infecção com um total de 47,7% de mortalidade. As formigas do pré-tratamento 2 foram menos susceptíveis à infecção com apenas 12,2% de mortalidade. Através de análise de curvas de sobrevivência e teste de Duncan, o pré-tratamento 1 foi significativamente diferente do pré-tratamento 2. Nos bioensaios usando isolado CG 24 de *B. bassiana*, não foram observadas diferenças significativas na susceptibilidade das formigas tratadas ou não com antibiótico e expostas ao fungo, com 61% e 54 % de sobrevivência no décimo dia de avaliação respectivamente. Como não há relatos de cepas de bactérias oriundas de operárias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus*, bactérias do tegumento dessas formigas cortadeiras foram isoladas e caracterizadas usando metodologias padrão. Bactérias cultiváveis e não cultiváveis foram identificadas diretamente via pirosequenciamento 454 do gene 16S. Para a obtenção das bactérias cultiváveis, foram selecionadas operárias com tegumento visivelmente revestido de bactérias, os quais foram raspados com o auxílio de um pincel. O material obtido da raspagem foi transferido para placas de Petri contendo o meio seletivo Ágar-Quitina. Após crescer nesse meio, a bactéria foi repicada para o meio Ágar Nutriente, onde foi realizado um desafio entre a bactéria e o fungo *M. anisopliae* ESALQ 818, constatando-se um efeito inibitório da bactéria sobre o crescimento desse fungo. O tratamento com antibiótico, visualmente reduziu a população de bactérias no tegumento, e resultou em um aumento na susceptibilidade das formigas à infecção pelo fungo entomopatogênico, além disso, uma cepa de uma bactéria isolada a partir do tegumento inibiu *M. anisopliae in vitro*. Isso mostra a importância das bactérias simbioses não somente na supressão de *Escovopsis*, mas também na defesa contra patógenos das próprias formigas.

Palavras-chave: Simbiose, Attini, Actinomiceto.

ABSTRACT

MATTOSO, Thalles Cardoso, M.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. March, 2012. The role of ecto-symbiotic bacteria in *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Forel, 1901) in protection against entomopathogenic fungi. Professor advisor: Richard Ian Samuels.

Ants are well known for their social organizations, which give them a strong defense against organisms invading their colonies. Besides this attribute, these insects have morphological, physiological and structural characteristics reinforcing further the defence of their nests. With the discovery of symbiotic bacteria present on the integument of leaf-cutting ants, a new line of defense was proposed, considered specific for the fungus *Escovopsis*, a parasite of the fungus gardens. However, in recent studies the question arose as to the specificity of the action of these bacteria, as they were also found to inhibit the germination of other fungi including entomopathogenic fungi. This work aimed to investigate the virulence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* (ESALQ 818) and *Beauveria bassiana* (CG 24) when infecting workers of *Acromyrmex subterraneus subterraneus* with bacterial bio-films present on the exoskeleton, that were subjected to two types of pre-treatment: (1) ants dipped in an antibiotic solution for five seconds (20% Gentamicin Sulfate ®) and (2) ants dipped for five seconds in sterile distilled water. Pre-treated ants were exposed to entomopathogenic fungi

by contact with filter paper impregnated with a suspension of conidia, or filter paper soaked in a solution containing only Tween 80 (0.05%). The ants were observed daily, and the survival / mortality evaluated in each group over 10 days. Ants in group 1 exposed to *M. anisopliae* were more susceptible to infection, with a total of 47.7% mortality. Ants from pre-treatment group 2 were less susceptible to infection with only 12.2% mortality. From analysis of the survival curves, ANOVA and Duncan test, group 1 survival was significantly different from group 2. In bioassays using *B. bassiana* CG 24, no significant differences were observed in the susceptibility of ants pre-treated with antibiotics or pre-treated with water and then exposed to the fungus, with 61% and 54% survival on the tenth day of evaluation respectively. As there are currently no reports of strains of bacteria from *Acromyrmex subterraneus subterraneus* workers, bacteria from the integument of these ants were isolated and characterized using standard methodologies. Non-culturable bacteria were identified via 454 pyro-sequencing of the 16S gene. To obtain the culturable bacteria, workers were selected with visibly coated with bacteria and the bacterial bio-films were removed with the aid of a brush. This material was inoculated onto Petri dishes containing Chitin Agar selective medium. After initial growth, the bacteria were re-inoculated onto Nutrient Agar, where bacteria were challenged by the fungus *M. anisopliae* ESALQ 818, to observe possible inhibitory effect of bacteria on the growth of this fungus. Antibiotic treatment visibly reduced the population of bacteria on the integument, and resulted in an increase in ant susceptibility to entomopathogenic fungal infection. A bacterial strain isolated from the ant integument inhibited *M. anisopliae* *in vitro*. This shows the importance of these bacterial symbionts not only for the suppression of *Escovopsis*, but also in defence against pathogens of the ants themselves.

Keywords: Symbiosis, Attini, Actinomycete.

SUMÁRIO

RESUMO	IV
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 AS FORMIGAS CORTADEIRAS	4
2.2 FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS	6
2.3 OS FUNGOS <i>METARHIZIUM ANISOPLIAE</i> E <i>BEAUVERIA BASSIANA</i>	9
2.4 DEFESAS DE FORMIGAS CORTADEIRAS CONTRA PATÓGENOS	10
2.5 BACTÉRIAS SIMBIOTES ASSOCIADAS AO TEGUMENTO DE FORMIGAS CORTADEIRAS	12
3. HIPÓTESE	17
4. JUSTIFICATIVA DO TRABALHO	17
5. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS	18
6. MATERIAL E MÉTODOS	19
6.1 COLETA E MANUTENÇÃO DE COLÔNIAS DE FORMIGAS CORTADEIRAS	19
6.2 SELEÇÃO DAS FORMIGAS	20
6.3 CULTIVO DOS FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS	21
6.4 PREPARO DAS SUSPENSÕES DOS FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS	22
6.5 MONTAGEM DOS TESTES DE SOBREVIVÊNCIA DAS FORMIGAS CORTADEIRAS	22
6.6 AVALIAÇÃO DE SOBREVIVÊNCIA	24
6.7 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DAS FORMIGAS	24
6.8 IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS DO TEGUMENTO	25
6.9 INTERAÇÃO ENTRE GENTAMICINA E <i>M. ANISOPLIAE</i>	25
6.10 INTERAÇÃO ENTRE A ACTINOBACTÉRIA E <i>M. ANISOPLIAE</i>	26

6.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS BIOENSAIOS DE SOBREVIVÊNCIA.....	27
7.	RESULTADOS.....	28
7.1	TESTES DE SOBREVIVÊNCIA COM O FUNGO <i>M. ANISOPLIAE</i>	28
7.2	TESTES DE SOBREVIVÊNCIA COM O FUNGO <i>B. BASSIANA</i>	31
7.3	POPULAÇÃO BACTERIANA NO TEGUMENTO DE OPERÁRIAS APÓS PRÉ-TRATAMENTOS	34
7.4	IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS POPULAÇÕES BACTERIANAS	35
7.5	AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL	37
7.6	TESTES DE INTERAÇÕES EM MEIO DE CULTIVO	38
8.	DISCUSSÃO	41
9.	CONCLUSÕES	46
10.	PESPECTIVAS FUTURAS.....	48
11.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

1. INTRODUÇÃO

As formigas cortadeiras são consideradas pragas de grande importância na América Latina devido aos prejuízos causados em sistemas de produção agrícola, pecuário e florestal. Apesar da preferência por determinadas espécies de plantas, a maioria das culturas é atacada e danificada pelas formigas, que cortam folhas e ramos tenros, podendo levar a destruição completa das plantas (Della Lucia, 2003).

Estes insetos pertencem ao grupo das formigas derivadas divididos em dois gêneros: *Atta* (saúvas) e *Acromyrmex* (quenquéns) (Myrmicinae, Attini), com 15 e 24 espécies descritas, respectivamente. As “quenquéns” se caracterizam por cortar folhas de hortaliças, algumas frutíferas como videiras, laranjeiras, pessegueiros (Gonçalves, 1961; Della Lucia *et al.*, 1993a), além de *Eucalyptus* spp., *Pinus* spp. e diversas espécies de plantas ornamentais, que são processadas e utilizadas como substrato para o fungo simbionte (Basidiomycetes) que lhes servem de alimento.

O controle biológico de insetos apresenta algumas vantagens como a especificidade, o baixo custo e menor impacto ambiental. O controle microbiano, utilizando fungos entomopatogênicos parece ser promissor no controle de formigas cortadeiras devido à sua capacidade de infectar diferentes estágios de desenvolvimento do hospedeiro (Alves *et al.*, 1998). Os fungos infectam os insetos através do tegumento, e durante o processo de colonização do hospedeiro podem atuar em vários sítios, portanto, relatos sobre resistência a

estes patógenos são raros (Tabashnik, 1994; Charnley, 1997). Contudo, no caso das formigas cortadeiras, estes fungos devem ser capazes de superar ou romper a organização social e as defesas existentes nas colônias (Santos *et al.*, 2007).

As formigas cortadeiras apresentam defesas comportamentais, como a limpeza do tegumento (“grooming”), higienização do ninho, mudanças na atividade, dispersão, além do abandono da própria colônia (Marinho *et al.*, 2006). Além disso, estes insetos possuem defesas morfológicas, estruturais e fisiológicas, como a presença de pelos que dificultam o processo de infecção de alguns organismos (Diehl-Fleig, 1995), a secreção de antibióticos pelas glândulas metapleurais (Poulsen *et al.*, 2006; Fernández-Marín *et al.*, 2006), e a associação com bactérias simbiotes presentes nos tegumentos das formigas (Currie *et al.*, 1999).

As bactérias simbiotes isoladas do tegumento de operárias de *Acromyrmex* foram inicialmente descritas como pertencentes ao gênero *Streptomyces*, conhecido pela medicina humana por produzir metabólitos secundários com propriedades antibacterianas e antifúngicas (Currie *et al.*, 1999). Posteriormente, através do sequenciamento desta bactéria, verificou-se que na verdade se tratava do gênero *Pseudonocardia* (Cafaro e Currie, 2005). Contudo, as bactérias presentes nos tegumentos das formigas da espécie *Acromyrmex subterraneus subterraneus* Forel (Hymenoptera:Formicidae) ainda não foram identificadas.

Inicialmente a função da bactéria *Pseudonocardia* foi descrita como um agente mutualístico, atuando em defesa das colônias, produzindo antibióticos contra fungos parasitas do gênero *Escovopsis* (Hypocreaceae, Hypocreales), que especificamente parasitam o jardim de fungo cultivado pelas formigas (Currie *et al.*, 1999). A bactéria localiza-se em criptas associadas a glândulas exócrinas na cutícula das formigas, sendo que a distribuição dessas cavidades varia de acordo com o gênero. Esta estrutura especializada indica, portanto, uma antiga relação de coevolução entre a bactéria, as formigas, o fungo simbiote e, possivelmente, o fungo *Escovopsis* (Currie *et al.*, 2006).

Porém, estudos recentes de Sen *et al.* (2009), reavaliaram a função desta bactéria, questionando sua especificidade, revelando que esta apresenta uma ampla ação contra diversos tipos de fungos como saprófitos, fitopatogênicos, patógenos do jardim (*Escovopsis*) e entomopatogênicos.

Como o controle das formigas cortadeiras através de agentes entomopatogênicos pode ser dificultado pelos diversos mecanismos de defesa encontrados nas colônias, principalmente através das bactérias simbiotes, o estudo destes microrganismos associado às formigas cortadeiras pode contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias de controle microbiano, que tornem os entomopatógenos mais eficazes, reduzindo assim as populações de formigas a níveis de danos menores às culturas.

Através desta linha de raciocínio, o uso de antibióticos poderá ser uma estratégia eficaz contra a bactéria *Pseudonocardia*, *Streptomyces* e/ou outras presentes no exoesqueleto das formigas, facilitando a infecção por fungos entomopatogênicos como *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*, aumentando, assim, seu potencial para uso destes agentes no controle biológico de formigas cortadeiras.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 As formigas cortadeiras

As formigas em geral são insetos eussociais que constituem colônias de indivíduos que estabelecem divisão de trabalho entre diferentes castas, sejam reprodutivas ou estéreis. Além disto, se caracterizam pelo cuidado cooperativo com a prole e sobreposição de gerações em um mesmo ninho. Estes insetos são pertencentes à ordem Hymenoptera e se agrupam em apenas uma família, Formicidae (Hölldobler e Wilson, 1990). As formigas são abundantes na maior parte dos ecossistemas terrestres (Wilson, 1971). Contudo, a tribo Attini, que compreende os gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, conhecida como formigas cortadeiras, é exclusiva da região neotropical. Estas formigas cortam e utilizam vegetais frescos como substrato para seus fungos simbiotes, sendo capazes de explorar a maioria das espécies cultivadas, ocupando lugar de destaque entre pragas de diversas culturas agrícolas no Neotrópico (Della Lucia, 2003). Suas associações simbióticas com os fungos Leucocoprineae e Pterulaceae, que lhes servem como fonte de alimento tiveram início há cerca de 45 a 50 milhões de anos (Schultz e Brady, 2008).

Dentro da tribo Attini existem gêneros basais que também cultivam fungo, mas que não adquiriram a habilidade de cortar e processar material vegetal fresco, utilizando folhas e frutos secos, além de carcaças de diversos artrópodes como substrato para o fungo. Os gêneros são: *Apterostigma*, *Cyphomyrmex*, *Mycetophylax*, *Mycocepurus*, *Myrmicocrypta*, *Mycetosoritis*, *Mycetarotes*,

Sericomyrmex, Trachymyrmex, e Mycetagroicus (Della Lucia, 2003; Schultz e Brady, 2008).

No Brasil, ocorrem 20 espécies e nove subespécies taxonômicas aceitas de *Acromyrmex* (Della Lucia e Souza, 2011). Este gênero é encontrado em praticamente todo o tipo de nicho ecológico como: florestas subtropicais, tropicais e equatoriais úmidas ou secas, cerrados, pampas, desertos, caatingas e restingas, compreendido entre as latitudes 34°N e 41°S da região Neotropical. Portanto, sua ocorrência abrange desde a Califórnia até a Patagônia, incluindo Cuba e Trinidad, porém, na América do Sul, só não ocorrem no Chile (Della Lucia e Souza, 2011).

A espécie *Acromyrmex subterraneus subterraneus* é frequentemente encontrada nos estados de São Paulo, Amazonas, Ceará, Rio Grande do Norte, Minas Gerais, Mato Grosso, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro (Gonçalves, 1961; Mayhé-Nunes, 1991). Seus ninhos são subterrâneos ou parcialmente subterrâneos, na maioria das vezes próximo aos sistemas radiculares de plantas, o que muitas vezes dificulta a sua coleta. O monte de terra solta pode atingir até dois metros de diâmetro, independente da idade da colônia, onde sob este se encontram duas ou três câmaras de formato irregular com diâmetros iguais ou superiores a 80 cm, quase sempre largas e achatadas. Os ninhos podem alcançar de 3,96 m² até 20 m², chegando a uma profundidade de até 90 cm em relação ao nível do solo. Além disso, as colônias de *Acromyrmex* podem ser compostas por uma ou mais rainhas (Moreira e Della Lucia, 1993; Pereira e Della Lucia, 1998; Andrade, 2002).

Há uma grande variação na arquitetura dos ninhos, provavelmente, em função do clima e da época do ano. Em ninhos jovens, o fungo fica a mais ou menos 10 cm da superfície do solo, e aderido a raízes. Geralmente, os ninhos jovens apresentam somente uma câmara contendo o fungo, rainha(s) e prole (Gonçalves, 1961).

Em diferentes ecossistemas neotropicais as formigas cortadeiras participam ativamente na ciclagem de nutrientes do solo, seja por meio das câmaras subterrâneas de suas colônias ou pelas pilhas externas com matérias depositadas pelas formigas. Estes processos são responsáveis pela melhoria das propriedades físico-químicas do solo como a modificação das estruturas, da permeabilidade e a disponibilidade de nutrientes em suas câmaras de lixo e do

fungo simbiote. Além disso, as formigas cortadeiras podem desempenhar um papel importante na dispersão de sementes, dependendo, portanto de seus comportamentos frente aos diásporos, ao local de deposição das sementes, à taxa de herbivoria de plântulas de sementes germinadas perto do ninho e ao tipo de ecossistema onde elas ocorrem (Leal *et al.*, 2011).

Apesar de suas funções benéficas nos ecossistemas neotropicais, estudos revelam que as formigas cortadeiras são favorecidas em áreas modificadas pela ação antrópica. A modificação do ambiente pode reduzir a população de predadores e parasitas dessas formigas, além de promover a proliferação de vegetais primários que são palatáveis e mais fáceis de serem alcançados, reduzindo custo energético na aquisição de folhas. Um exemplo deste benefício é o aumento da população de formigas cortadeiras em florestas convertidas a pastos e plantações (Della Lucia e Souza, 2011).

Os registros dos danos causados pelas formigas cortadeiras datam desde o descobrimento do Brasil, sendo pragas de diversas culturas do setor agrícola, pecuário e florestal principalmente, através dos prejuízos a cultura do eucalipto. Em florestas tropicais, estimou-se que somente o gênero *Atta* seja responsável pela desfolha de 12 a 17% da produção neste ecossistema (Cherrett, 1976). Costa *et al.* (2008) estimaram que cerca de 17% da vegetação do cerrado brasileiro é cortado pelas saúvas, este índice representa duas a três vezes os danos causados por todos os outros herbívoros do cerrado somados. Portanto, as formigas cortadeiras são consideradas pragas importantes e a manutenção de suas populações abaixo do nível de dano econômico é desejável nas áreas de suas ocorrências.

2.2 Fungos entomopatogênicos

No controle microbiano de insetos pragas e vetores de doenças são utilizados fungos, bactérias, protozoários, vírus e nematóides. Porém, os fungos entomopatogênicos se destacam dos outros agentes por serem os únicos capazes de penetrar o exoesqueleto de artrópodes durante o processo de infecção. As espécies de fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin e *Metarhizium anisopliae* (Metschnikov) Sorokin

(Deuteromycotina: Hyphomycetes) são capazes de provocar a morte de seus hospedeiros, sendo as mais estudadas para o controle de uma gama de espécies de pragas dentro de variadas ordens de insetos, além de outros artrópodes (Evans, 1989; Zimmerman, 1993; Hajek e St. Leger, 1994). Recentemente, foram relatadas infecções incomuns em rainhas de *Acromyrmex octospinosus* e *Atta colombica* provocadas pelo fungo entomopatogênico *Ophiocordyceps* (Ascomycota: Hypocreales), que é a fase sexual da *Hirsutella* (Hughes *et al.*, 2009). Os autores mostraram também a habilidade de *Ophiocordyceps* de alternar entre hospedeiros de diferentes subfamílias e gêneros como: *Atta*, *Acromyrmex*, *Sericomyrmex* e *Apterostigma* (Myrmicinae, Attini) e o gênero *Camponotus* (Formicinae). Isto pode indicar uma recente relação entre parasita e hospedeiro na evolução.

Em regiões temperadas, os entomopatógenos *M. anisopliae* e *B. bassiana* são comumente encontrados no solo podendo estar associados principalmente aos hospedeiros terrestres, de forma que os insetos que vivem no solo estão mais susceptíveis à contaminação (Bidochka *et al.*, 1998). Existem relatos dos gêneros *Beauveria* e *Metarhizium* infectando insetos sociais, porém para estes hospedeiros os dados ainda são escassos (Schmid-Hempel, 1998). Alguns poucos relatos na literatura mostram a ocorrência natural de fungos entomopatogênicos em formigas cortadeiras. Diehl-Fleig *et al.* (1992), por exemplo, isolaram *B. bassiana* de operárias da espécie *Atta sexdens piriventris*. Alves (1998) obteve isolados de *M. anisopliae* var. *anisopliae* a partir de rainhas de *A. sexdens rubropilosa*, enquanto Rodrigues *et al.* (2005) conseguiram isolar o mesmo entomopatógeno a partir do fungo simbionte de ninhos de *A. sexdens rubropilosa*. O fato de haver poucos relatos de patógenos atacando colônias de formigas cortadeiras pode indicar a presença de um sistema defensivo bem desenvolvido, ao qual ainda não foi completamente distinguido e que merece ser elucidado.

Poucos estudos têm sido realizados com o objetivo de avaliar a virulência de patógenos em colônias de formigas cortadeiras. O trabalho de Jaccoud *et al.* (1999), por exemplo, simulou os efeitos da infecção de minicolônias de *Atta sexdens rubropilosa* através de duas dosagens (baixa dosagem: 0,05g) e (alta dosagem: 0,5g) de esporos secos do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* com o intuito de investigar sua possível utilização no controle biológico

desta espécie de formiga. As operárias se mostraram menos susceptíveis à infecção em baixas dosagens do patógeno, onde foram observados comportamentos de limpeza e remoção de esporos presentes em suas cutículas, que, em seguida, foram depositados nas pilhas de lixo. Contudo, a alta dosagem foi capaz de causar 100% de mortalidade nas minicolônias. Porém, estas minicolônias não continham rainhas, apresentando apenas operárias de diversos tamanhos e estádios com o fungo simbiote. Efeitos similares já haviam sido reportados por Diehl-Fleig e Lucchese (1991) em testes realizados com colônias naturais de *Acromyrmex striatus* através de *B. bassiana* cultivado em grãos de arroz e também de esporos secos formulados com farinha de casca de laranja. Em colônias de *Acromyrmex heyeri* e de *A. striatus* mantidas em laboratório, comportamentos de reconhecimento de fungos filamentosos também foram descritos, acompanhados por comportamentos de auto-higiene e limpeza mútua das operárias quando em contato com esporos secos de fungos entomopatogênicos (Fritsch e Diehl-Fleig, 1996).

Apesar dos resultados positivos em alguns trabalhos realizados em laboratório, não se pode assegurar o sucesso deste tipo de controle microbiano em condições naturais, tendo em vista que as colônias de formigas cortadeiras devem ser encaradas como um superorganismo (Hölldobler e Wilson, 1990; Cremer e Sixt, 2009). Neste ninho cada casta e cada fração de sua estrutura física possui função específica, assim como os órgãos em organismos multicelulares. Portanto, a falta de um componente da colônia em testes de infecção por patógenos pode expressar uma alteração nos resultados se comparado com colônias naturais no campo (Pagnocca *et al.*, 2011). Alguns poucos estudos utilizando colônias integras no campo mostram uma baixa eficiência no controle por meio de fungos entomopatogênicos (Kermarrec e Decharme, 1982; Kermarrec *et al.*, 1986). Esta baixa eficiência possivelmente deve-se aos diversos mecanismos de defesa que fazem parte das colônias de formigas cortadeiras.

2.3 Os fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*

A incidência de doenças fúngicas em insetos é comum e muitas vezes acaba causando epizootias que dizimam suas populações (Alves, 1998). Os fungos Deuteromicetos *M. anisopliae* e *B. bassiana* foram os primeiros entomopatógenos utilizados no controle biológico de insetos, além disso, são os mais utilizados no mundo como inseticidas microbianos e deram origem a muitos produtos comerciais existentes no mercado atual (Alves, 1998; Zimmermann, 2007a e b). Estes fungos são cosmopolitas, podem ser isolados a partir de amostras de solo e ocorrem naturalmente em diversas espécies de insetos de diferentes ordens, contudo, a gama de hospedeiros de *M. anisopliae* parece ser mais restrita se comparada ao de *B. bassiana* (Zimmermann, 2007a e b).

Ambos os fungos possuem ferramentas para superar as defesas encontradas nos insetos, produzindo enzimas especializadas na degradação de quitina, componente integral do tegumento dos insetos (St. Leger *et al.*, 1991; St. Leger *et al.*, 1996). Durante o processo de infecção, esses fungos são capazes de produzir substâncias que paralisam e bloqueiam o recrutamento de células de defesa (hemócitos) encontradas na hemocele dos insetos, prejudicando as reações do sistema imune como a formação de nódulos, processos de reconhecimento de invasores e a fagocitose (Hajek e St. Leger, 1994).

Apesar das semelhanças, esses fungos possuem suas particularidades frente ao ambiente em que vivem. O fungo *M. anisopliae* é encontrado com maior frequência em ambientes expostos, ensolarados e com solo distribuído regularmente como em áreas agricultáveis (Bidochka *et al.*, 1998; Meyling e Eilenberg, 2007). Já o fungo *B. bassiana* possui maior presença em ambientes sombreados e não cultiváveis (Bidochka *et al.*, 1998). Com base nessas observações o fungo *M. anisopliae*, dentro de um programa de controle microbiano de pragas, seria o mais indicado para o uso em ambientes modificados por ação antrópica, enquanto que o fungo *B. bassiana* seria melhor candidato ao uso em áreas de conservação como em sistemas agropastoris (Meyling e Eilenberg, 2007).

Liu *et al.* (2003) observaram diferenças significativas no tamanho de conídios, viabilidade de produção de esporos, velocidade de germinação, crescimento relativo das hifas e sensibilidade à temperatura entre *M. anisopliae* e

B. bassiana para o controle de *Lygus lineolaris*. Hallsworth e Magan (1999) verificaram que a temperatura ótima para o crescimento de *M. anisopliae* em meio de cultivo SDA é alta (30°C) em relação a *B. bassiana* (25°C). No trabalho de Hywel-Jones e Gillespie (1990) a taxa de germinação dos conídios foi espécie-dependentes, sendo *M. anisopliae* com taxa mais rápida que *B. bassiana*.

Além das diferenças morfológicas e fisiológicas encontradas entre espécies diferentes de fungos, os entomopatógenos podem apresentar virulência distinta entre isolados de uma mesma espécie (Luz *et al.*, 1998; Dimbi *et al.*, 2003).

2.4 Defesas de formigas cortadeiras contra patógenos

A organização social das formigas cortadeiras é considerada uma estratégia eficiente de defesa contra invasores de suas colônias, pois estes insetos constituem um superorganismo, onde seus comportamentos são destinados ao bem de todas as outras componentes, através de cuidados e cooperação como a divisão de tarefas entre as castas e a sobreposição de gerações (Wilson, 1971).

Hughes *et al.* (2002), em trabalho com a espécie *Acromyrmex echinator*, verificaram que, quando as formigas são expostas aos esporos de *M. anisopliae*, a taxa de transmissão da doença é inversamente proporcional à densidade das populações destes insetos, ou seja, quando juntas, estas formigas apresentaram uma melhora substancial na taxa de sobrevivência frente ao entomopatógeno. Currie e Stuart (2001) observaram o comportamento de limpeza das operárias de *Atta colombica* frente à contaminação de seus ninhos pelos patógenos *Trichoderma viride* e *Escovopsis*, onde dois tipos de atividades foram observados: grooming (limpeza) dos esporos de patógenos e a retirada de substratos infectados (weeding). Além disso, verificaram-se os processos de higiene como: autolimpeza do tegumento ("self-grooming"), limpeza do fungo simbiote ("fungus-grooming") e remoção de partes contaminadas do jardim. Estes procedimentos ocorreram logo após a introdução dos patógenos, indicando que esses são os artifícios primários dentro de uma colônia infectada. A limpeza envolve basicamente a lambadura das superfícies a serem limpas e

armazenamento das partículas indesejadas na cavidade infrabucal, típica das formigas (Hölldobler e Wilson, 1990). Os resíduos da cavidade infrabucal são transportados até as câmaras de lixo onde são regurgitados como “pellets” (Pagnocca, 1997).

A divisão do ninho em compartimentos com áreas dedicadas à deposição dos materiais indesejados é considerada uma estratégia profilática adotada pelas formigas, pois o lixo fica isolado do fungo que lhes serve de alimento (Currie e Stuart, 2001a; Hart e Ratnieks, 2002). Ballari *et al.* (2007) notaram a existência de diferenças comportamentais entre operárias que realizavam diferentes tarefas como a remoção e deposição do lixo, o manejo e manutenção do fungo simbiote e o corte e condução de folhas frescas em colônias de *Acromyrmex lobicornis*. As formigas destinadas a uma atividade não desempenhavam funções diferentes. Além disso, operárias responsáveis pelo manejo do lixo não tinham acesso à câmara do fungo, sendo as mesmas impedidas de transitar pela mesma trilha das formigas que cortavam e transportavam folhas (Hart e Ratnieks, 2002; Ballari *et al.*, 2007).

Os comportamentos de higiene, limpeza e manejo do lixo, portanto, aperfeiçoam as condições de crescimento e proteção dos jardins de fungo contra parasitas e competidores (Currie e Stuart, 2001; Bot *et al.*, 2001).

As formigas cortadeiras também apresentam mecanismos fisiológicos como meio de defesa de suas colônias, através de secreções de substâncias pelas glândulas mandibulares, que podem minimizar a ação de compostos tóxicos como o tanino e terpenoides, além de reduzir a germinação de conídios de fitopatógenos como *Botrytis cinerea* (Knapp *et al.*, 1994; Marsaro *et al.*, 2001), contudo, suas secreções não foram capazes de interferir na germinação dos fungos *E. weberi* e *M. anisopliae* (Rodrigues *et al.*, 2008). Entretanto, outra glândula comumente encontrada em formigas cortadeiras foi reportada por ser capaz de secretar substâncias com atividade antagônica ao entomopatógeno *M. anisopliae*. Trata-se da glândula metapleurais que, de acordo com o trabalho de Poulsen *et al.* (2002b), eram capazes de produzir compostos antifúngicos em operárias de *Acromyrmex octospinosus*. Neste trabalho, operárias que tiveram suas glândulas metapleurais tampadas com uma película de esmalte foram mais susceptíveis à infecção por *M. anisopliae* do que operárias com suas glândulas não tratadas. Os compostos secretados pelas glândulas metapleurais podem ser

lambidos e espalhados para o resto do tegumento no momento da autolimpeza, sendo que esta atividade foi observada em formigas dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, constatando-se um significativo aumento deste comportamento na presença de agentes infecciosos, dentre eles *E. weberi* e *M. anisopliae* (Fernández-Marín *et al.*, 2006).

Em formigas do gênero *Atta*, a glândula metapleurale parece desempenhar um papel mais importante contra patógenos, tendo em vista o seu maior volume e a ausência de bactérias simbiotes visíveis nos seus tegumentos se comparado com formigas do gênero *Acromyrmex* (Currie *et al.*, 2006; Sen *et al.*, 2009; Fernández-Marín *et al.*, 2009; Lacerda *et al.*, 2010).

2.5 Bactérias simbiotes associadas ao tegumento de formigas cortadeiras

No final do século XX, o que antes era descrito na literatura como exsudado cuticular em formigas cultivadoras de fungo da tribo Attini, foi descoberto que na verdade se tratava de uma bactéria filamentosa presente no tegumento destes insetos (Mueller *et al.*, 2008). Esta bactéria inicialmente foi descrita como pertencente ao gênero *Streptomyces*, conhecido pela medicina humana por produzir metabólitos secundários com propriedades antibacterianas e antifúngicas (Currie *et al.*, 1999).

Posteriormente, após o sequenciamento genético desta bactéria, verificou-se que na verdade a bactéria encontrada na cutícula das formigas se tratava do gênero *Pseudonocardia* (Currie *et al.*, 2003a; Cafaro e Currie, 2005). Esta bactéria, inicialmente foi caracterizada por estabelecer um terceiro nível de simbiose dentro das colônias de formigas cortadeiras, por esta produzir substâncias específicas que inibem o desenvolvimento do fungo *Escovopsis*, parasita do fungo simbiote (basidiomyceto) cultivado pelas formigas da tribo Attini (Seifert *et al.*, 1995; Currie *et al.*, 1999).

A bactéria simbiote está presente na cutícula de operárias jovens, sejam elas grandes ou pequenas, porém em formigas menores a carga bacteriana parece ser reduzida (Poulsen *et al.*, 2002a).

Poulsen *et al.* (2003a), estudaram a biologia da bactéria simbiote no tegumento de operárias maiores da espécie *Acromyrmex octospinosus*, e

observaram que seu aparecimento ocorre poucos dias depois da emergência dos adultos, cobrindo inteiramente seus tegumentos entre 10 a 15 dias de idade. Em torno de 25 dias após a emergência, as operárias amadurecem e começam a forragear. Neste período, com o envelhecimento das formigas, há o declínio na quantidade de bactéria visível no exoesqueleto dessas formigas.

Poulsen *et al.* (2003b) investigaram os efeitos das glândulas metapleurais sobre o crescimento das bactérias mutualísticas *Pseudonocardia* no tegumento de operárias de *A. octospinosus*. Verificou-se, que em formigas que tiveram suas glândulas metapleurais tampadas, o desenvolvimento das bactérias simbiotes não foi afetado na fase exponencial de crescimento, porém na fase de declínio houve uma redução significativa do biofilme bacteriano, sugerindo que a permanência das actinobactérias no tegumento pode ser regulada pela glândula metapleural.

As bactérias simbiotes *Pseudonocardia* encontram-se aderidas à superfície da propleura ou do mesossoma das formigas em cavidades pequenas denominadas “fóveas” que estão associadas a glândulas exócrinas formadas por unidades bicelulares, que poderiam secretar nutrientes para a manutenção destas bactérias (Currie *et al.*, 2006). A distribuição dessas cavidades varia, sendo específica de acordo com os gêneros da tribo Attini (Currie *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2007; Mueller *et al.*, 2008). Esta estrutura especializada indica, portanto, uma antiga relação de coevolução entre a bactéria e as formigas (Currie *et al.*, 2006).

Recentemente dois modelos de transmissão das actinobactérias entre gerações e entre colônias de formigas cortadeiras vêm sendo bastante discutidos (Boomsma e Aanen, 2009).

O primeiro modelo de transmissão das actinobactérias surgiu juntamente com a descoberta das mesmas no tegumento de operárias, tendo em vista que estas bactérias também foram encontradas no tegumento de fêmeas reprodutivas (aladas) e rainhas, suportando um modelo de transmissão vertical desta bactéria, ou seja, a transmissão de apenas um isolado bacteriano dos ninhos maternos para os ninhos descendentes (Currie *et al.*, 1999). Em contrapartida, (Poulsen *et al.*, 2005) verificaram que linhagens de bactérias simbiotes *Pseudonocardia* encontradas no tegumento de operárias de colônias de *Acromyrmex octospinosus* e *Acromyrmex echinator* que ocupam a mesma área geográfica não apresentavam variação genética indicando um segundo modelo de transmissão

horizontal destas cepas. Este modelo estabelece que as actinobactérias possam ser obtidas ou trocadas ao longo das gerações através do contato com integrantes de outras colônias ou com cepas encontradas no próprio ambiente (Boomsma e Aanen, 2009). Poulsen *et al.* (2005) também observaram que várias linhagens de *Pseudonocardia* isoladas das formigas Attini são filogeneticamente semelhantes às encontradas habitualmente no solo.

Segundo a teoria evolutiva, a manutenção de um único isolado de *Pseudonocardia* seria benéfica para as formigas, uma vez que o cultivo de diferentes linhagens poderia gerar competição e conflito entre elas, prejudicando-as. Contudo, a manutenção de um único isolado de *Pseudonocardia*, poderia trazer pouca flexibilidade na defesa do jardim contra infecções de isolados diferentes de *Escovopsis* (Poulsen *et al.*, 2007).

Outras evidências recentes reforçam ainda mais o modelo de transmissão horizontal. As actinobactérias foram isoladas não somente de fêmeas reprodutivas, mas também a partir de machos das Attines cultivadoras de fungo, *Cyphomyrmex wheeleri*, sustentando a ideia de uma possível transmissão horizontal, entre ninhos vizinhos no período de voo nupcial das formigas (Sen *et al.*, 2009).

Kost e colaboradores (2007) questionaram a possibilidade de transmissão horizontal da bactéria simbiote, pois múltiplas cepas de bactérias actinomicetos foram isoladas a partir do tegumento das formigas cultivadoras de fungo e também a partir de suas colônias. Sen *et al.* (2009) verificaram não apenas a ocorrência de *Pseudonocardia*, mas também bactérias do gênero *Amycolatopsis*. Os mesmos autores também demonstraram que múltiplas cepas podem ser isoladas a partir da cutícula de somente uma formiga. Zhang e colaboradores (2007) ofereceram às formigas uma escolha entre seu próprio isolado de actinobactéria e um de outra espécie de formiga, ambas do gênero *Acromyrmex*. Foi observado que 30 a 40% das formigas escolheram as cepas da outra espécie, indicando uma flexibilidade na aquisição do simbiote.

Com a finalidade de reavaliar a simbiose entre formigas cortadeiras e actinomicetos, Mueller *et al.* (2008) atentaram para alguns pontos de vista importantes como: (1) o acúmulo de microrganismos na superfície cuticular das Attini sugere adaptação a um sistema aberto ou semiaberto, possibilitando, portanto, a aquisição de microbiota continuamente a partir do ambiente, ao invés

de uma associação de longo prazo pelo sequestro de uma população específica de microrganismos; (2) a localização do actinomiceto na superfície de estruturas corporais tais como ventre, pernas, gáster, face e placa pro-pleural que indica que o sistema está adaptado para regularmente adquirir ou substituir a microbiota; (3) a raridade ou ausência de *Pseudonocardia* no gênero *Atta*.

Outro assunto bastante discutido na literatura é o modelo sugerido por Currie *et al.* (1999), onde provas moleculares e ecológicas indicariam que as interações entre as formigas e a bactéria *Pseudonocardia* teriam coevoluído a favor do fungo simbionte especificamente para o controle de seu parasita, o fungo *Escovopsis* (Currie, 2001b). Poulsen e colaboradores (2007) verificaram um resultado inesperado, onde várias espécies de *Pseudonocardia* não teriam efeito inibitório contra o fungo *Escovopsis*, contrariando trabalhos que demonstravam sempre a produção de antibióticos potentes contra o parasita. Sen *et al.* (2009) evidenciaram não somente a ausência de atividade de linhagens de *Pseudonocardia* contra *Escovopsis*, mas também ação antagônica ao fungo simbionte das próprias formigas.

Mueller e colaboradores (2008) chamaram atenção para os outros microrganismos presentes nas colônias de formigas cortadeiras que não foram levados em consideração quanto às suas interações dentro do modelo de coevolução com *Escovopsis*, como: leveduras (Carreiro *et al.*, 1997), bactérias degradantes de celulose (Bacci *et al.*, 1995) e principalmente, a bactéria produtora de antibióticos *Burkholderia* (Santos *et al.*, 2004) que inibiu o desenvolvimento do *Escovopsis*, os fungos entomopatogênicos *M. anisopliae* e *B. bassiana* e o saprófita *Verticillium lecanii*. No trabalho de Kost e colaboradores (2007) foram demonstradas várias linhagens de actinomicetos isolados a partir de *Acromyrmex octospinosus* e das formigas não Attini, *Myrmica rugulosa* e *Lasius flavus*, que também inibiam o parasita *Escovopsis*.

Recentemente compostos bioativos de bactérias *Pseudonocardia*, *Streptomyces* e *Dermacoccus* foram isolados e purificados e caracterizados (Haeder *et al.*, 2009). Destes microrganismos encontrados associados à *Acromyrmex*, apenas uma bactéria do gênero *Streptomyces* produziu um metabólito altamente inibitório contra *Escovopsis* e foi identificado como uma candicidina macrolide, que não demonstrou atividade inibitória contra o fungo simbionte das formigas. Outro trabalho demonstrou um composto obtido a partir

da *Pseudonocardia*, isolado da cutícula de *Apterostigma dentigerum*, chamado dentigerumicina, capaz de inibir o crescimento de *Escovopsis* proveniente da mesma colônia, além de outros microrganismos como *Candida albicans*, (Oh *et al.*, 2008; Oh *et al.*, 2009).

Ribeiro (2000) conseguiu isolar várias estirpes de *Streptomyces* presentes na cutícula de operárias de *Atta sexdens*. Estas bactérias apresentaram uma ampla atividade antimicrobiana. Diversas espécies de leveduras foram isoladas dos jardins de *Atta texana* e posteriormente testadas contra *Escovopsis* e outras espécies de fungos patogênicos e saprofíticos (Rodrigues *et al.*, 2009). As leveduras inibiram o crescimento desses fungos, revelando que aquela espécie de formiga possui uma arma contra invasores da colônia diferente das actinobactérias. No trabalho de Zucchi e colaboradores (2010), espécies de *Pseudonocardia* e *Streptomyces* foram isoladas a partir da cutícula de operárias de *A. subterraneus brunneus*. Tais bactérias demonstraram inibição contra o *Escovopsis*, evidenciando que este parasita não é inibido especificamente pela *Pseudonocardia*.

Sen e colaboradores (2009) avaliaram a atividade inibitória de uma variedade de bactérias do gênero *Pseudonocardia* frente a outros microrganismos além de *Escovopsis*, como os fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana*, *M. anisopliae* e *Acrodontium* sp. os fungos saprófitas *Cyphellophora* sp. e *Alternaria tenuissima*, além do fungo simbiote cultivado pelas formigas *Leucoagaricus* sp., manifestando diferentes níveis de inibição contra todos os microrganismos. Os mesmos autores descobriram que não somente *Pseudonocardia*, mas outras bactérias como *Amycolatopsis* podem ocupar regiões semelhantes no tegumento das Attini.

Trabalhos recentes têm realizado o sequenciamento de bactérias presentes no tegumento das Attini, tendo em vista a necessidade de saber da diversidade de bactérias associadas a essas formigas, bem como suas reais funções dentro de suas colônias (Sen *et al.*, 2009; Mueller *et al.*, 2010).

3. HIPÓTESE

As actinobactérias inibem a germinação de outros fungos além do *Escovopsis*, portanto poderiam atuar em defesa das formigas contra fungos entomopatogênicos.

4. JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

O conhecimento das funções das bactérias simbiotes presentes no tegumento das operárias *A. subterraneus subterraneus* frente aos patógenos *M. anisopliae* e *B. bassiana*, poderá ajudar na determinação do nível de especificidade destes microrganismos, bem como no desenvolvimento de novas técnicas que venham a potencializar a ação dos fungos entomopatogênicos contra formigas cortadeiras.

5. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

Este trabalho tem como objetivo principal investigar o papel das bactérias simbiontes no tegumento de operárias na proteção das formigas *A. subterraneus* aos entomopatógenos *M. anisopliae* e *B. bassiana*.

Objetivos específicos:

- 1) Identificar e quantificar as bactérias presentes nos tegumentos das operárias;
- 2) Verificar a ação do antibiótico gentamicina sobre as bactérias simbiontes no tegumento das operárias;
- 3) Avaliar a influência das bactérias simbiontes, sobre os fungos entomopatogênicos *M. anisopliae* e *B. bassiana*.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Coleta e manutenção de colônias de formigas cortadeiras

Para realização dos bioensaios, foi necessário a manutenção de colônias de *A. subterraneus subterraneus* em laboratório. Para tanto, necessitou-se coletar formigueiros em campo, coletando-se toda a colônia, ou seja, o fungo simbiote com sua(s) respectiva(s) rainha(s), além das formigas jardineiras e operárias, que foram encontradas no subsolo em profundidades em torno de 60 cm. A coleta foi realizada na localidade de Bom Jardim, RJ (22° 09' 07" S e 42° 25' 10" W).

As colônias foram levadas para a Unidade de Mirmecologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, localizada em Campos dos Goytacazes, RJ e acondicionadas em salas com ambiente controlado (Figura 1), com temperatura média de 25°C e umidade relativa de 70 ± 10 % conforme Della Lucia *et al.* (1993b).



Figura 1. Formigueiros mantidos em ambiente controlado na Unidade de Mirmecologia.

6.2 Seleção das formigas

Para realização dos bioensaios, foram utilizadas formigas de uma mesma colônia. Foram selecionadas formigas operárias apresentando tegumentos cobertos com as bactérias simbiotes (Actinomicetos). Estas operárias foram caracterizadas pela distinta coloração branca de suas cutículas (Figura 2). As formigas foram selecionadas seguindo o “Score 12” estabelecido no trabalho de Poulsen e colaboradores (2003a), que representa a máxima cobertura bacteriana do tegumento das operárias encontradas dentro das colônias. Além disto, foi estabelecido um padrão de tamanho das formigas utilizadas nos testes, portanto, antes dos testes, foram coletadas operárias de tamanhos semelhantes cujas cápsulas cefálicas variaram entre 2,0 e 2,2 mm. Estas medidas foram realizadas através de uma régua microscópica com auxílio de um microscópio estereoscópico. O tamanho médio obtido foi utilizado como gabarito para coleta das formigas dentro da colônia.

A coleta foi realizada utilizando-se uma pinça esterilizada, sendo necessárias 120 formigas por repetição no total (60 para os tratamentos e 60 para o grupo controle). As formigas foram transferidas para um recipiente plástico e transportadas ao laboratório, onde foram realizados os bioensaios.



Figura 2. Vista superior de uma operária de *A. subterraneus subterraneus* coberta pelas bactérias simbiotes.

6.3 Cultivo dos fungos entomopatogênicos

Para os testes de virulência, foi utilizado um isolado de *M. anisopliae* (ESALQ 818), proveniente da coleção do ESALQ São Paulo e um isolado de *B. bassiana* (CG24), proveniente da coleção do CENARGEN/EMBRAPA.

Os isolados de fungo foram mantidos em placas de Petri contendo meio SDA (Sabouraud Dextrose Agar), composto por dextrose 10g; peptona 2,5g; extrato de levedura 2,5g; ágar 20g e água destilada 1L, em câmara BOD a 26°C. Após 15 dias de cultivo, os conídios foram retirados do meio de cultura com uma espátula estéril e transferidos para arroz esterilizado dentro de erlenmeyers.

Para o preparo do meio de arroz foram despejados 25 g de arroz cru e 10 mL de água destilada dentro do erlenmeyer, que foi vedado por algodão e autoclavado por 20 minutos a 120°C.

Após a inoculação em arroz com os conídios dos isolados, os erlenmeyers foram mantidos sem câmara BOD a 26°C, onde permaneceram por 15 dias, tempo necessário ao desenvolvimento e produção de novos conídios pelo fungo.

6.4 Preparo das suspensões dos fungos entomopatogênicos

O preparo das suspensões dos conídios foi realizado utilizando-se água destilada autoclavada com 0,05% de Tween 80 (TW), em câmara de fluxo.

A quantificação dos conídios foi feita através de uma câmara de Neubauer, conforme descrição de Goettel e Inglis (1997), fazendo-se diluições até obtenção de suspensões de $1,0 \times 10^8$ (*M. anisoplaie*) e $1,0 \times 10^6$ (*B. bassiana*) conídios/mL, que foram utilizadas para infecção das formigas nos testes. As suspensões utilizadas para cada espécie de fungo entomopatogênico foram determinadas através de teste prévio de sobrevivência, em que se foi procurado qual resultava em uma curva de sobrevivência melhor definida.

6.5 Montagem dos testes de sobrevivência das formigas cortadeiras

Os bioensaios de sobrevivência foram compostos por três repetições. Cada uma delas foi dividida em duas etapas com tratamentos distintos apontados aqui como pré-tratamento e pós-tratamento.

Pré-tratamentos:

a) Formigas submersas em solução de antibiótico gentamicina (GENT): Neste pré-tratamento as formigas foram submersas, uma a uma, em solução de gentamicina 20% (Garamicina[®] 40mg fabricado pela Schering-Plough) por cinco segundos, com auxílio de pinça fina.

b) Formigas submersas em água destilada esterilizada (ADE): As formigas foram submersas, com auxílio de pinça fina, em água destilada esterilizada por cinco segundos.

Após uma hora da realização dos pré-tratamentos descritos anteriormente, os insetos foram expostos aos conídios dos fungos entomopatogênicos *M. anisopliae* (MET) ou *B. bassiana* (BB). Neste tratamento, foram utilizadas 30 formigas de cada pré-tratamento, distribuídas em seis placas de Petri contendo cinco formigas em cada placa.

As formigas foram expostas aos fungos em placas de Petri forradas com papel de filtro autoclavado, anteriormente impregnados com 750 µL de suspensão de conídios ($1,0 \times 10^8$ conídios/mL para *M. anisopliae* e $1,0 \times 10^6$ conídios/mL para *B. bassiana*), com auxílio de uma pipeta.

As formigas do grupo controle não entraram em contato com os conídios dos fungos entomopatogênicos, depois de passar pelos pré-tratamentos GENT e ADE. Para realização dos ensaios do grupo controle, foram pipetados 750 µL de solução TW nas placas de Petri contendo papel filtro autoclavado. Neste grupo, de cada pré-tratamento, foram usadas 30 formigas, distribuídas em seis placas, contendo cinco insetos em cada placa.

As placas contendo as formigas dos dois grupos foram identificadas de acordo com os pré-tratamentos recebidos e colocadas em câmara úmida por um período de 24 horas.

Tabela 1. Esquema da distribuição das formigas dentro dos tratamentos

Pré-tratamentos	Pós-tratamentos		
	<i>Metarhizium anisopliae</i> ($1,0 \times 10^8$ conídios/mL + TW)	<i>Beauveria bassiana</i> ($1,0 \times 10^6$ conídios/mL + TW)	TW (controle)
GENT	30 formigas	30 formigas	30 formigas
ADE	30 formigas	30 formigas	30 formigas

6.6 Avaliação de sobrevivência

Após 24 h em câmara úmida, as formigas foram transferidas para outras placas de Petri autoclavadas, contendo dois chumaços pequenos de algodão autoclavados, um umedecido em água destilada e o outro em solução de sacarose 10%. As placas foram então identificadas, numeradas e mantidas em câmara BOD a 26°C. A água e sacarose foram trocadas de dois em dois dias até o final das avaliações.

Diariamente, todas as placas de Petri foram verificadas, contabilizando-se a quantidade de formigas mortas em cada placa durante 10 dias. Através dos dados de mortalidade, foram obtidas as porcentagens de sobrevivência diárias e as médias de sobrevivência para análise dos resultados.

Os insetos mortos foram retirados diariamente e colocados em placas de Petri autoclavadas com papel filtro umedecido que foram mantidos em câmara úmida para posterior observação de conidiogênese. Desta forma foi feita a confirmação da infecção das formigas mortas pelos respectivos fungos entomopatogênicos.

6.7 Avaliação comportamental das formigas

Para avaliar diferenças no comportamento locomotor das formigas *A. subterraneus subterraneus* nos diferentes grupos de tratamento, foram realizados ensaios de avaliação comportamental das operárias. Para tanto, foi utilizado uma operária por placa de Petri que recebeu os tratamentos GENT/MET, GENT/TW, ADE/MET e ADE/TW. As placas de Petri usadas tinham nove centímetros de diâmetro, sendo as mesmas utilizadas nos testes de sobrevivência. Para os controles GENT/TW e ADE/TW, foram empregadas 10 repetições, e para os tratamentos GENT/MET e ADE/MET foram feitas 15 repetições.

Após a aplicação dos tratamentos as operárias foram aclimatadas em laboratório por 3 horas, onde posteriormente foram realizadas filmagens das formigas dentro das placas de Petri. As filmagens tiveram a duração de dez minutos cada, sendo a análise comportamental realizada através do software Ethovision, respeitando-se a área delimitada dentro de cada placa de Petri.

Através disso, foi possível se obter a distância percorrida pelas operárias em centímetros de acordo com cada grupo de tratamento.

6.8 Identificação das bactérias do tegumento

Para identificar as bactérias existentes no tegumento das operárias de *A. subterraneus subterraneus*, foram realizados dois procedimentos. O primeiro consistiu na tentativa de isolamento de bactérias em meio de cultivo, através da seleção de 10 operárias contendo bactérias no tegumento e provenientes da mesma colônia utilizada nos testes de sobrevivência. Estas operárias foram introduzidas dentro de um tubo de 1,5 mL contendo 0,5mL de solução de TW e agitada em vórtex por um minuto. O material sobrenadante foi pipetado e introduzido em placas de Petri contendo o meio Ágar-quitina, rico em carbono complexo e ideal para o crescimento das actinobactérias, que foram vedadas e mantidas em câmara de germinação a 26°C por 15 dias. Após este período, as bactérias obtidas foram re-isoladas em meio Ágar-nutriente. No segundo método, também foram selecionadas 10 operárias da colônia utilizada nos bioensaios. As formigas tiveram seus tegumentos raspados com auxílio de um pincel estéril e o material raspado foi introduzido em um tubo de 1,5 mL contendo 0,5mL de solução de TW. O tubo com o material raspado foi armazenado em um freezer a -4°C por quatro dias. Após este período, foi realizada a transferência de apenas uma das cepas bacterianas mantidas em meio de cultura para um tubo de 1,5 mL contendo 0,5 mL de TW. Os tubos com o material raspado e com o material isolado em meio de cultivo foram congelados em nitrogênio líquido e liofilizados. Este material foi então enviado para a empresa MR DNA situada no Texas (EUA) que realizou o sequenciamento das bactérias através do método de pirosequenciamento 454.

6.9 Interação entre gentamicina e *M. anisopliae*

Na intenção de realizar testes de interação entre o antibiótico gentamicina e o fungo *M. anisopliae*, foram preparadas placas de Petri contendo o meio de

cultivo SDA 1/4. Preparou-se uma suspensão de $1,0 \times 10^8$ conídios/mL do isolado ESALQ 818 ao qual 10 μ L foram pipetados e espalhados na superfície do meio SDA 1/4 com o auxílio de uma alça de drigalski estéril. As placas foram mantidas em câmara de fluxo com a ventilação ligada até que a superfície do meio de cultivo secasse. Após este procedimento, foram introduzidos círculos de papel filtro de 0,5 cm de diâmetro embebidos em solução de gentamicina 20% em contato com o meio de cultura nas placas de Petri. As placas foram então vedadas e mantidas em câmara de germinação a 26°C por 15 dias.

6.10 Interação entre a actinobactéria e *M. anisopliae*

Para a realização dos testes de interação entre bactéria simbiote presentes no tegumento de operárias e *M. anisopliae*, foi necessário o isolamento de bactérias em meio de cultivo. Para tanto, foram retiradas 10 operárias da mesma colônia utilizada nos testes de sobrevivência, todas apresentando bactérias no tegumento. As formigas foram colocadas dentro de um tubo de 1,5 mL contendo 0,5 mL de TW que foi levado ao vórtex por um minuto. O material sobrenadante foi transferido com auxílio de uma pipeta para placas de Petri contendo o meio de cultura Ágar-quitina que foram mantidas por 15 dias em câmara de germinação a 26°C. Após este período as bactérias obtidas foram reisoladas para placas contendo o meio Ágar-nutriente que permaneceram outros 15 dias em câmara de germinação. Apenas uma cepa bacteriana foi obtida para o teste de interação com o fungo *M. anisopliae*.

Os testes de interação foram realizados em placas de Petri contendo o meio Ágar-nutriente. Em cada placa de Petri foi introduzido um fragmento da cepa bacteriana com auxílio de uma alça de platina estéril. Estas placas foram mantidas por 15 dias em câmara de germinação a 26°C para o desenvolvimento bacteriano. Após este período, foi preparada uma suspensão de $1,0 \times 10^8$ conídios/mL de *M. anisopliae*, onde, uma alíquota de 10 μ L foi transferida, através de uma pipeta, para cada placa de Petri contendo as bactérias. Estas alíquotas foram espalhadas no meio de cultivo com o auxílio de uma alça de drigalski ao redor da população bacteriana. As placas foram mantidas em câmara de germinação por mais 15 dias para o crescimento do fungo *M. anisopliae*.

6.11 Análise estatística dos bioensaios de sobrevivência

Os dados de sobrevivência dos tratamentos dentro dos grupos tratamento e controle foram transformados em curvas de sobrevivência através do programa GraphPad Prism 5[®], onde foram feitos testes de Log Rank para comparação das curvas. Além disso, os dados de sobrevivência foram analisados pelo programa SPSS[®], usando ANOVA com teste post-hoc de Duncan.

7. RESULTADOS

7.1 Testes de sobrevivência com o fungo *M. anisopliae*

As curvas de sobrevivência das operárias pré-tratadas com GENT ou ADE seguidas pela exposição a *M. anisopliae*, além dos seus respectivos controles, são mostrados na figura 3. Durante as três repetições observaram-se diferenças significativas entre as curvas de sobrevivência dos grupos tratados com *M. anisopliae* (GENT/MET e ADE/MET) e controle (GENT/TW e ADE/TW) (Figuras 4 A, B e C).

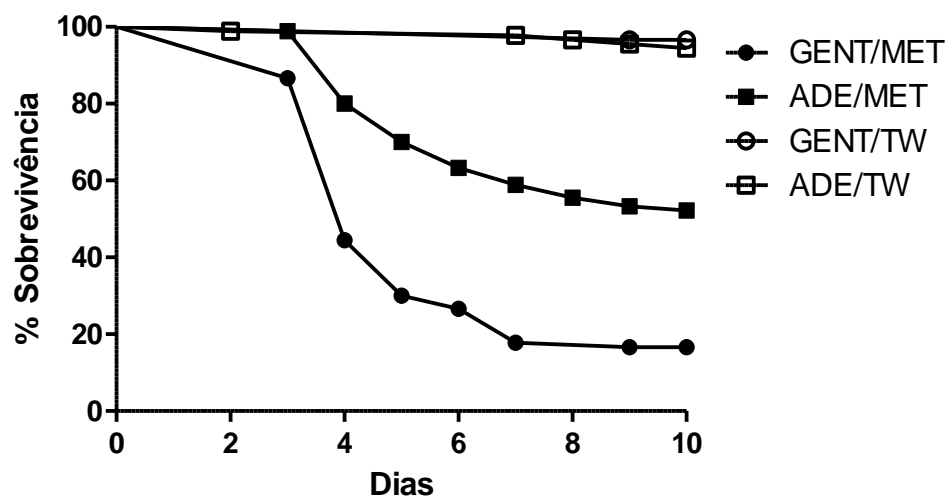
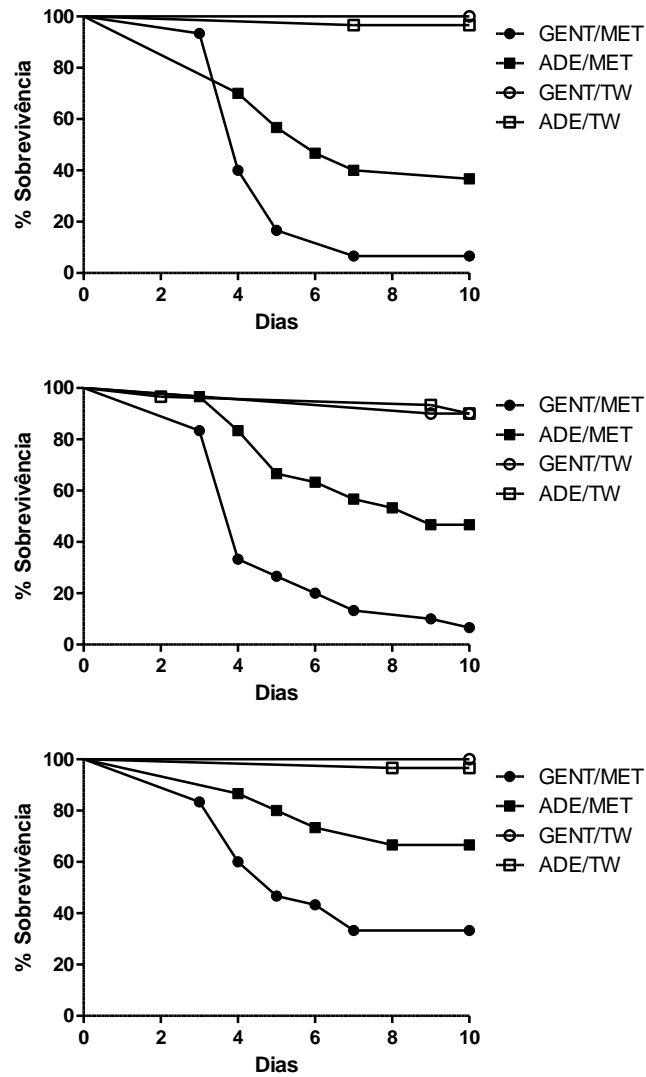


Figura 3. Curvas de sobrevivência de operárias de *A. subterraneus subterraneus* pré-tratadas com gentamicina (GENT) ou água destilada autoclavada (ADE) antes

de serem expostas ao entomopatógeno *M. anisopliae* (MET). Os controles foram pré-tratados com GENT ou ADE e, posteriormente, expostos a Tween (TW).



Figuras 4 A, B e C. Curvas de sobrevivência de operárias *A. subterraneus subterraneus* em contato com conídios de *M. anisopliae* (MET) mostrando cada repetição.

O pré-tratamento com GENT aumentou significativamente a susceptibilidade das formigas à infecção pelo fungo entomopatogênico, resultando em uma média de 15,5% de sobrevivência (s.e.m. \pm 8,9) no décimo dia de avaliação, em contraste com a média de sobrevivência de 49,9% (\pm 8,8) observado em operárias pré-tratadas com ADE e expostas a *M. anisopliae*.

Através da realização da ANOVA de duas vias, verificou-se que houve efeito dos tratamentos ($F_{3,8} = 17,10$; $p < 0,01$), mas não existiu efeito da unidade experimental (placas de Petri; $F_{5,30} = 0,83$; $p = 0,54$) e nenhuma interação entre os tratamentos e a unidade experimental ($F_{15,40} = 1,04$; $p = 0,44$). O teste de Duncan mostrou que o grupo GENT/MET teve o menor percentual de sobrevivência quando comparado com os outros grupos ($p < 0,05$). Além disso, os resultados mostraram que ADE/MET apresentou uma percentagem de sobrevivência inferior aos dos grupos GENT/TW e ADE/TW ($p < 0,05$). Não houve diferença entre GENT/TW e ADE/TW ($p > 0,05$). As percentagens de sobrevivência do controle foram 94,4% ($\pm 2,2$) em formigas pré-tratadas com ADE e 96,6% ($\pm 3,3$) para operárias pré-tratadas com GENT.

A avaliação da conidiogênese demonstrou que apesar da menor susceptibilidade do grupo ADE/MET à infecção por *M. anisopliae*, o fungo entomopatogênico foi o causador da morte de todas as operárias neste grupo com 100% de ocorrência de esporulação. No grupo GENT/MET o fungo *M. anisopliae* também foi responsável pela morte de todos os indivíduos com 100% de esporulação em operárias mortas (Fig. 5). Os insetos mortos nos grupos GENT/TW 66,6% não apresentaram a presença de infecção enquanto 33,3% apresentaram a presença de fungos saprófitos. Em ADE/TW 60% das operárias não apresentaram nenhum sinal de infecção, enquanto 40% apresentaram saprófitos.



Figura 5. Operária do grupo GENT/MET infectada pelo fungo *M. anisopliae*.

7.2 Testes de sobrevivência com o fungo *B. bassiana*

As curvas de sobrevivência de operárias pré-tratadas com GENT e ADE e posteriormente tratadas com *B. bassiana* (BB) ou TW são mostradas na figura 6. Nas três repetições observou-se diferença significativa entre as curvas dos grupos tratados com *B. bassiana* (GENT/BB e ADE/BB) e as curvas dos controles (GENT/TW e ADE/TW) (Fig. 7 A, B e C).

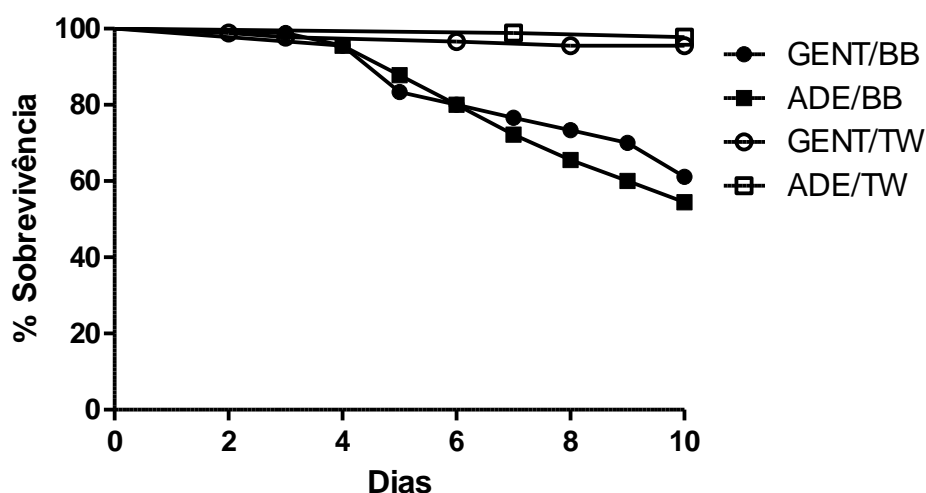
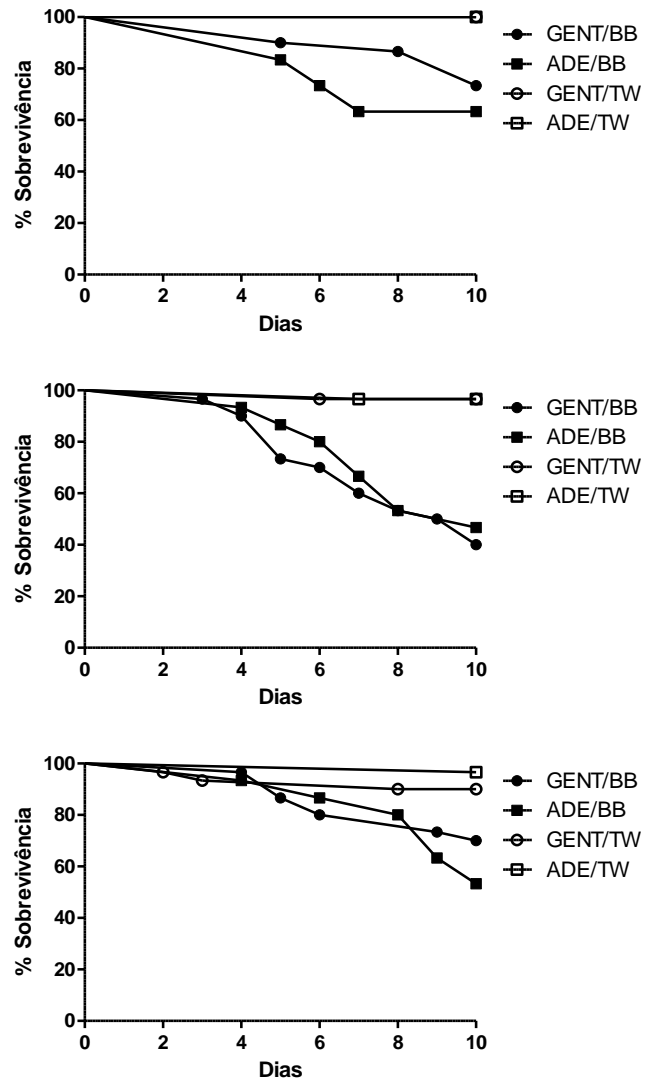


Figura 6. Curvas de sobrevivência de operárias *A. subterraneus subterraneus* pré-tratadas com gentamicina (GENT) ou água destilada autoclavada (ADE) antes de serem expostas ao entomopatógeno *B. bassiana* (BB). Os controles foram pré-tratados com GENT ou ADE e posteriormente expostos a Tween (TW).

Ambas as operárias pré-tratadas com GENT e ADE foram susceptíveis à infecção pelo entomopatógeno *B. bassiana* com médias de 61,1% e 54,4% de sobrevivência no décimo dia de avaliação respectivamente, não havendo diferença significativa entre as curvas.

O teste de Duncan mostrou que os grupos GENT/BB e ADE/BB apresentaram os menores percentuais de sobrevivência se comparado com os grupos controle GENT/TW e ADE/TW ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os percentuais de sobrevivência dos tratamentos com *B. bassiana* GENT/BB e ADE/BB ($p > 0,05$). Também não houve diferença entre os controles GENT/TW e ADE/TW ($p > 0,05$).

A ocorrência de conidiogênese mostrou que todos os indivíduos mortos tanto em GENT/BB quanto em ADE/BB foram infectados pelo fungo *B. bassiana* apresentando 100% de esporulação (Fig. 8). No controle GENT/TW verificou-se a ocorrência de 25% de operárias com saprófitos e 75% sem contaminação aparente. Em ADE/TW foram observados saprófitos em 50% dos indivíduos, enquanto que os outros 50% não apresentaram agentes infecciosos na inspeção visual.



Figuras 7 A, B e C. Curvas de sobrevivência das operárias em contato com conídios de *B. bassiana* (BB) mostrando as três repetições individuais.



Figura 8. Operária do grupo GENT/BB infectada com *B. bassiana*.

7.3 População bacteriana no tegumento de operárias após pré-tratamentos

O tratamento com GENT reduziu visivelmente a população de bactérias na cutícula das operárias (Figura 9a: antes do tratamento com antibiótico; Figura 9b: posteriormente ao tratamento com antibiótico), entretanto o pré-tratamento com ADE não demonstrou nenhum efeito visível sobre o biofilme bacteriano (Figura 9c).

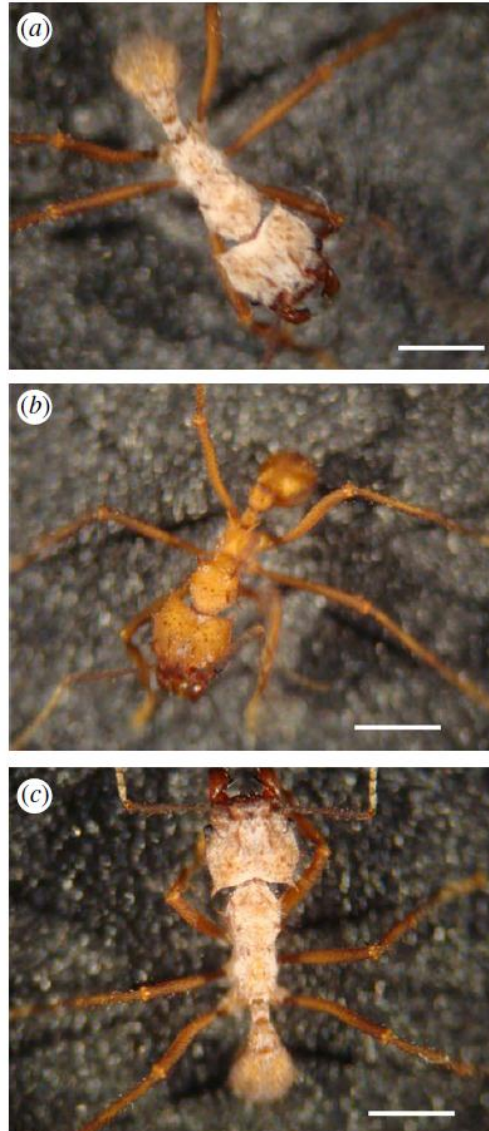


Figura 9. Efeitos dos tratamentos com antibiótico e água estéril sobre o biofilme bacteriano: (a) operárias maiores de *A. subterraneus subterraneus* contendo biofilme bacteriano antes do tratamento com antibiótico; (b) tratamento com antibiótico; (c) tratamento com água estéril. Escala da barra: 2mm.

7.4 Identificação e quantificação das populações bacterianas

O resultado da identificação e quantificação das bactérias, cultiváveis ou não cultiváveis em meio de cultura, presentes no tegumento das formigas *A. subterraneus subterraneus* através de pirosequenciamento 454 é mostrado na tabela 2.

Tabela 2. Percentagens das populações bacterianas presentes no tegumento das operárias de *A. subterraneus subterraneus* da colônia AsC1, e percentagem das cepas bacterianas, isoladas a partir do tegumento de operárias da colônia AsC1 em meio de cultivo, de onde foi obtida a amostra CiA. Dados obtidos através de pirosequenciamento 454

Espécies	AsC1	CiA
<i>Aquamicrobium (espécie desconhecida)</i>	0,0076	0
<i>Dermacoccus (espécie desconhecida)</i>	0,2596	0
<i>Friedmanniella (espécie desconhecida)</i>	0,0305	0
<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	0,1451	0
<i>Pseudonocardia halophobica</i>	0,4200	0
<i>Pseudonocardia sulfidoxydans</i>	96,0369	0,1337
<i>Pseudonocardia yunnanensis</i>	3,0773	0
<i>Streptomyces flavoviridis</i>	0	99,6857
<i>Streptomyces lanatus</i>	0	0,0201
<i>Streptomyces rochei</i>	0	0,0736
<i>Tsukamurella inchonensis</i>	0,0229	0
<i>Wolbachia endosimbionte de Chorthippus parallelus</i>	0	0,0736
<i>Wolbachia endosimbionte de Culex quinquefasciatus</i>	0	0,0134

A colônia utilizada durante os bioensaios de sobrevivência (AsC1) apresentou três espécies diferentes de *Pseudonocardia*, porém a espécie *Pseudonocardia sulfidoxydans* correspondeu à maior população encontrada no tegumento das operárias com 96,03% do total encontrado na amostra analisada. A população da bactéria *P. yunnanensis*, apesar de bastante inferior à da bactéria *P. sulfidoxydans*, foi a segunda maior encontrada no tegumento das operárias com 3,07%. Além disto, a população de outra espécie *P. halophobica*, foi encontrada em quantidade ínfima (0,42%), porém, isto indica a ocorrência de mais de uma espécie de *Pseudonocardia* na cutícula de operárias de uma mesma colônia.

A bactéria isolada em meio de cultivo (CiA) que foi confrontada com o fungo *M. anisopliae* correspondeu à espécie *Streptomyces flavoviridis*, porém a mesma não foi encontrada durante o pirosequenciamento de amostras da colônia AsC1 utilizada nos bioensaios de sobrevivência.

7.5 Avaliação comportamental

Segundo a ANOVA de um fator, não houve diferença significativa no comportamento de locomoção entre os diferentes tratamentos ($F_{3,49} = 0,036$; $p > 0,05$) (Figura 10). Isso mostrou que a presença de conídios no tegumento das formigas não alterou a locomoção e igualmente a remoção das bactérias não teve efeito nesse comportamento.

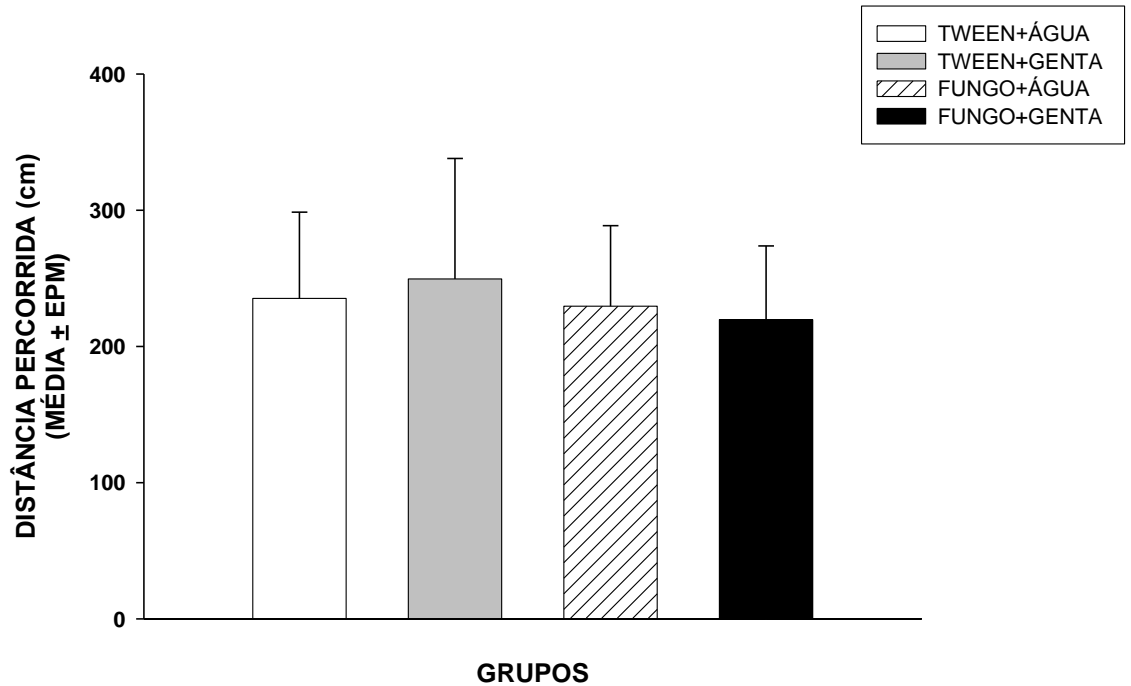


Figura 10. Distância total percorrida em centímetros pelas operárias dentro de placas de Petri após os diferentes tratamentos. As filmagens foram analisadas usando o programa EthoVision (Noldus, Holanda).

7.6 Testes de interações em meio de cultivo

O antibiótico gentamicina não mostrou efeito sobre *M. anisopliae* em bioensaios de desafio. Discos de papel filtro impregnados em solução de gentamicina colocados no centro de placas de Petri não afetaram o crescimento de *M. anisopliae* em meio de cultivo SDA, ou seja, não houve inibição de crescimento (Figura 11).

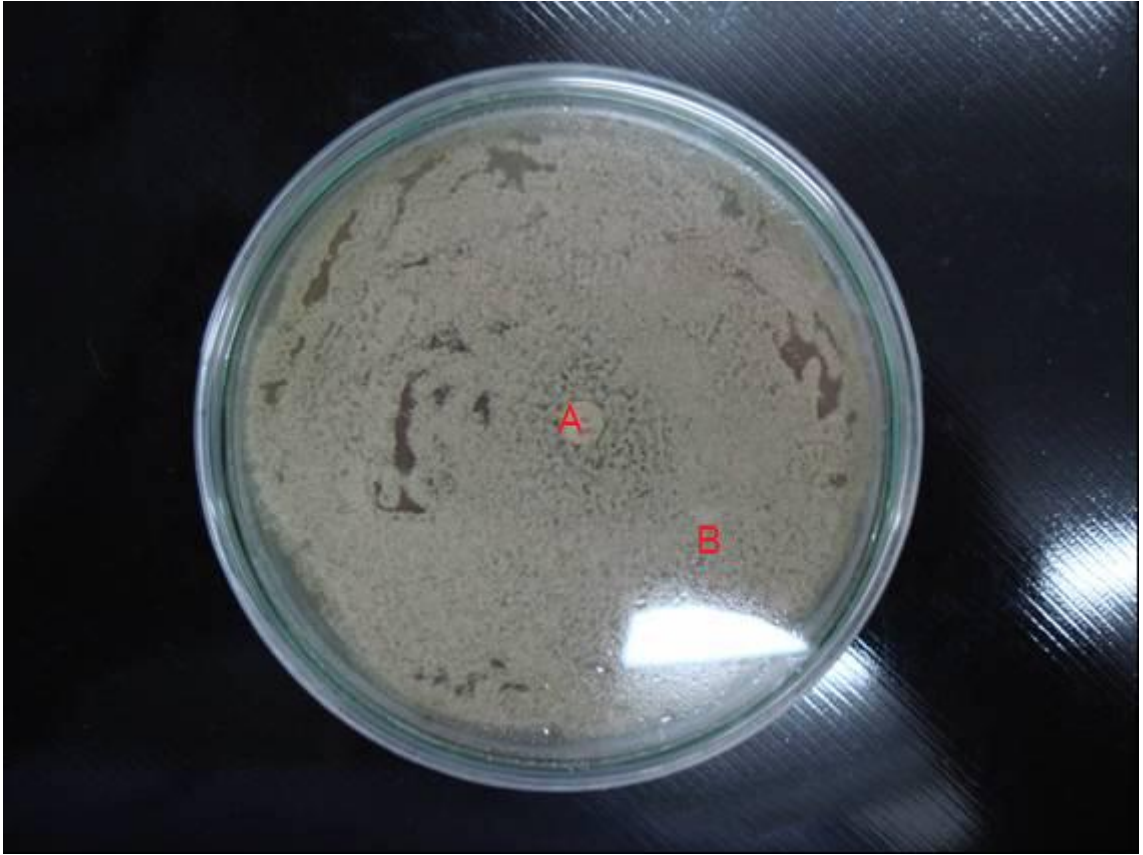


Figura 11. (A) disco de papel filtro impregnado com gentamicina; (B) *M. anisopliae* em desenvolvimento.

Nos testes de interações entre *M. anisopliae* e a bactéria *Streptomyces flavoviridis* isolada a partir do tegumento de operarias de *A. subterraneus subterraneus* verificaram que compostos antifúngicos liberados por esta bactéria foram capazes de inibir o crescimento do fungo entomopatogênico, formando halos de inibição (Figura 12).

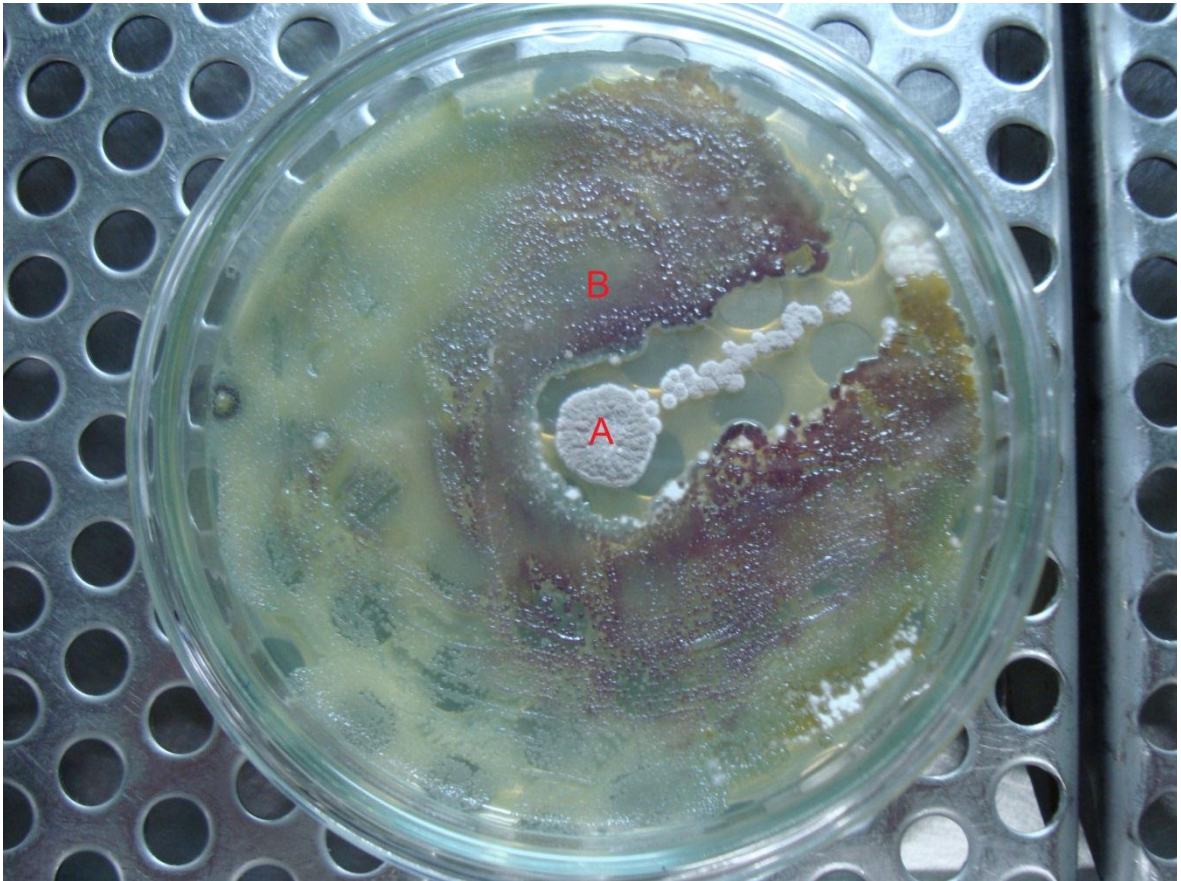


Figura 12. (A) *Streptomyces flavoviridis* isolada a partir do tegumento de operárias; (B) *M. anisopliae*. Na intercessão entre os dois microrganismos, observa-se a formação de halo de inibição.

8. DISCUSSÃO

Durante a fase adulta, com 12 a 15 dias de idade, o tegumento de operárias de *A. subterraneus subterraneus* fica repleto de uma crescente e extensiva cobertura bacteriana (Poulsen *et al.*, 2003a). Poulsen e colaboradores (2003a) na tentativa de avaliar o custo-benefício das bactérias simbiotes para as operárias de *A. octospinosus*, verificaram as taxas respiratórias das formigas pinceladas com água (controle) ou solução de antibiótico a base de penicilina e streptomicina. O tratamento com antibiótico promoveu a redução da taxa respiratória das operárias, o que pode estar associado à retirada das bactérias presentes na cutícula. A remoção deste biofilme bacteriano resultou no aumento de incidência do parasita *Escovopsis* infestando os jardins de fungo simbiote (Currie *et al.*, 1999). Contudo, estas bactérias podem desempenhar funções protetoras às colônias contra outros microrganismos patogênicos.

Currie *et al.* (2003b) discutiram a possibilidade do biofilme bacteriano servir como uma barreira física que previne o contato entre o exoesqueleto do inseto e os esporos dos fungos entomopatogênicos. No presente trabalho a aplicação de antibiótico reduziu visivelmente o biofilme bacteriano e aumentou a susceptibilidade das operárias de *A. subterraneus subterraneus* à infecção pelo fungo entomopatogênico *M. anisopliae* após o contato com seus conídios. Portanto, a retirada do biofilme bacteriano reduz a concentração de compostos antifúngicos na superfície da cutícula, aumentando as chances de germinação dos conídios ou formação do tubo germinativo, resultando no aumento da taxa de infecção.

O resultado do bioensaio com *M. anisopliae* dá suporte à hipótese de Sen *et al.* (2009) de que as bactérias simbiontes no tegumento das formigas Attini não são especializadas no combate do fungo parasita *Escovopsis*, podendo então ser utilizadas para defender as formigas contra diversos patógenos invasores dentro das colônias.

Apesar do resultado encontrado com *M. anisopliae*, a remoção do biofilme bacteriano pela ação do antibiótico não alterou a susceptibilidade das operárias à infecção pelo fungo *B. bassiana*. Contudo, vale ressaltar que as duas espécies de fungo entomopatogênico utilizados neste trabalho possuem características morfológicas distintas (Liu *et al.*, 2003), além de ocorrer e se desenvolver em ambientes diferenciados (Bidochka *et al.*, 1998; Meyling e Eilenberg, 2007). Shimazu *et al.* (2002) verificaram que a introdução de *B. bassiana* no solo não afeta a densidade populacional das actinobactérias, porém, pouco se sabe sobre os efeitos destas bactérias sobre a densidade do fungo *B. bassiana*. Testes de inibição em meio de cultura realizados por Sen *et al.* (2009) demonstraram que algumas linhagens de actinobactéria *Pseudonocardia* inibiam ou não o desenvolvimento de linhagens diferentes de *B. bassiana*. No mesmo trabalho, uma linhagem de actinobactéria foi observada inibindo o entomopatógeno *M. anisopliae*, enquanto que o fungo *B. bassiana* era pouco inibido, portanto, diferenças nas interações entre diferentes estirpes de organismos são passíveis de ocorrer.

Testes de interação em placas de Petri, contendo meio de cultura, mostraram que a bactéria *S. flavoviridis*, isolada a partir do tegumento de operárias provenientes da mesma colônia, produz compostos antifúngicos que inibem o desenvolvimento do fungo *M. anisopliae*. Apesar desta bactéria não ter sido encontrada nos resultados de pirosequenciamento (454) das amostras de raspagem do tegumento das formigas usadas nos bioensaios, é sabido que bactérias do gênero *Streptomyces* estão associadas às colônias de formigas cortadeiras como um importante simbiote (Haeder *et al.*, 2009), assim como a bactéria do gênero *Burkholderia* em colônias de *A. sexdens rubropilosa* (Santos *et al.*, 2004).

Os simbiontes *Streptomyces* sp. utilizam os gongylídios produzidos pelo fungo basidiomiceto como fonte de lipídios e carboidratos em colônias de *A. octospinosus*. Em troca, as colônias utilizam os compostos antifúngicos

produzidos pelos *Streptomyces* e outros actinomicetos para defesa dos jardins de fungos contra parasitas (Seipke *et al.*, 2011). As bactérias *Streptomyces* são reportadas por produzir compostos antibióticos como Antimicinas, Valinomicinas, Actinomicina e Candicidina, que podem estar presentes no tegumento das operárias e são capazes de apresentar efeitos sinérgicos na inibição do crescimento de diversos microrganismos patogênicos, incluindo os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* em meio de cultivo (Haeder *et al.*, 2009; Schoenian *et al.*, 2011).

O fungo *B. bassiana* é comumente encontrado no solo, enquanto *M. anisopliae* já foi observado nos jardins de fungos e nas câmaras de lixo de colônias de formiga cortadeiras (Hughes *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2005). Isto pode implicar na necessidade das formigas se defenderem constantemente contra patógenos em suas colônias, e o uso de substâncias antibióticas provenientes de organismos simbioses pode ajudar a superar esses desafios.

O papel dos antibióticos secretados pela glândula metapleurar merece ser destacado neste trabalho, pois diferentes espécies de formigas Attine parecem depender das secreções da glândula metapleurar ou do biofilme bacteriano tegumentar como defesa primária contra entomopatógenos. Fernández-Marín *et al.* (2009) demonstraram que operárias de *Atta* e *Sericomyrmex*, sem biofilme bacteriano visível, responderam a desafios dos patógenos aumentando as taxas de lambertura das glândulas metapleurais em resposta às infecções, enquanto *Acromyrmex* e *Trachymyrmex* (que possuem biofilme bacteriano abundante) exibiram taxas menores de lambertura desta glândula em retorno às infecções.

Segundo Poulsen *et al.* (2003b), a secreção obtida pela glândula metapleurar parece prolongar a permanência da bactéria *Pseudonocardia* no tegumento de *A. octospinosus* durante o período de declínio da carga bacteriana tegumentar, podendo esta glândula regular a quantidade de bactérias no exoesqueleto de formigas maduras. No mesmo trabalho, operárias que tiveram as glândulas metapleurais fechadas com esmalte foram mais susceptíveis à infecção pelo fungo *M. anisopliae* (97,7% de mortalidade) se comparadas ao controle (14,2%). Portanto, a interferência na secreção desta glândula possivelmente impediu a manutenção das bactérias *Pseudonocardia* no tegumento das operárias, reduzindo as populações bacterianas, e tornando as operárias mais susceptíveis a infecções.

As operárias mais jovens servem às necessidades da colônia protegendo-a por um longo período de tempo, oferecendo o melhor retorno ao investimento na defesa contra doenças. Contudo, operárias recém-emergidas podem estar particularmente vulneráveis à infecção como (I) o tegumento tem ainda que desenvolver todas as suas camadas protetoras (Reynolds e Samuels, 1996); (II) o sistema imune em formigas mais jovens está pouco ativo (Armitage e Boomsma, 2010); e a glândula metapleurial de formigas jovens pode não secretar antibióticos imediatamente (Poulsen *et al.*, 2003b). Assim, a extensão do biofilme bacteriano presente durante as primeiras semanas da vida do adulto pode apresentar um custo-benefício específico para proteção dos membros mais vulneráveis da colônia.

Como já visto em alguns trabalhos, a presença de conídios de fungos entomopatogênicos pode alterar o comportamento das formigas cortadeiras, aumentando as taxas de limpeza do tegumento, porém, pouco se sabe sobre a alteração em suas locomoções frente a esses patógenos (Currie e Stuart, 2001; Fernández-Marín *et al.*, 2009). Neste trabalho, verificou-se que a presença de esporos de *M. anisopliae* não alterou a distância total percorrida das formigas, mesmo quando as bactérias simbiotes eram removidas pela ação do antibiótico gentamicina. Tendo em vista que, quanto maior o percurso de uma formiga sobre uma superfície contaminada maior será a chance desta se infectar, os resultados aqui podem demonstrar que nenhum tratamento alterou a locomoção das operárias.

Os resultados do pirosequenciamento 454 deste trabalho revelaram que diferentes espécies de *Pseudonocardia* (*P. sulfidoxydans*, *P. halophobica* e *P. yunnanensis*) podem co-ocorrer em operárias de uma mesma colônia. Sen *et al.* (2009) observaram a ocorrência de mais de uma linhagem de *Pseudonocardia* em formigas da tribo Attini. Haeder *et al.* (2009) obtiveram cinco linhagens de *Pseudonocardia* a partir de operárias de *A. octospinosus*, *A. echinator* e *A. volcanus*. Isto sustenta a possibilidade das formigas adquirirem vários isolados a partir do ambiente, contradizendo o modelo de coevolução proposto por Currie e colaboradores em 1999, onde apenas uma cepa bacteriana seria transferida de uma colônia para as colônias descendentes via transmissão vertical (Sen *et al.*, 2009).

Diversos trabalhos utilizaram o antibiótico gentamicina para compor o meio de cultura de crescimento do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* na intenção de impedir a contaminação por bactérias, portanto, a não formação de halo quando *M. anisopliae* foi confrontado com discos impregnados com gentamicina já era esperado, comprovando a não interferência sobre tal fungo durante os ensaios.

Os resultados aqui apresentados apoiam o papel das actinobactérias como uma primeira linha de defesa contra o ataque de fungos patogênicos em colônias de formigas cortadeiras. O tegumento é conhecido por ser uma barreira eficaz contra pesticidas, predadores e agentes patogênicos. No caso de *Acromyrmex*, esta barreira defensiva é reforçada por bactérias do gênero *Pseudonocardia*, secretoras de compostos antifúngicos. Além das bactérias presentes no tegumento, estas formigas apresentam outros simbiossiontes do gênero *Streptomyces* associados às suas colônias que podem ajudar a combater diversos patógenos, incluindo fungos entomopatogênicos. A avaliação dos resultados deste trabalho vai de encontro ao modelo de coevolução, abrindo a discussão quanto à especificidade de ação das actinobactérias, o que não descarta a importância de seus papéis frente ao parasita dos jardins de fungo *Escovopsis*.

9. CONCLUSÕES

- Este trabalho reforça os resultados de Sen *et al.* (2009), levando ao entendimento de que as actinobactérias não atuam somente contra o fungo parasita *Escovopsis* (Currie *et al.*, 1999);
- A remoção do biofilme bacteriano no tegumento das operárias aumentou consideravelmente a susceptibilidade das operárias à infecção pelo fungo *M. anisopliae*;
- O tratamento com antibiótico Gentamicina reduziu a população bacteriana visível no tegumento das operárias;
- O antibiótico Gentamicina não possui efeitos antagônicos ao fungo *M. anisopliae*;
- As actinobactérias podem atuar não somente em prol das colônias, mas também das próprias operárias;
- As bactérias presentes no tegumento das operárias pertencem ao gênero *Pseudonocardia*, e participam na redução das taxas de infecção pelo fungo *M. anisopliae*;

- Apesar das bactérias *Streptomyces* não estarem presentes no tegumento das operárias, estas podem estar associadas ao sistema de defesa das colônias de *A. subterraneus subterraneus* contra patógenos.

10. PESPECTIVAS FUTURAS

Como as respostas de interação entre os microrganismos podem variar de acordo com as linhagens estudadas, verifica-se a necessidade da realização de novos bioensaios de sobrevivência utilizando-se colônias distintas, bem como o emprego de outros isolados de fungos entomopatogênicos diferentes dos utilizados neste trabalho.

A identificação e quantificação das bactérias cultiváveis contidas no tegumento das formigas se faz necessária para o reconhecimento de suas importâncias dentro das colônias, portanto, é preciso realizar outros testes de inibição com outras bactérias assim como com outros patógenos.

Como a alteração das populações de bactérias na cutícula das formigas pode torná-las susceptíveis à infecção, seria interessante a realização de estudos de comportamento das colônias frente à aplicação de antibióticos comerciais, o que pode contribuir para o surgimento de novas técnicas de controle de formigas cortadeiras.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade A.P.P. (2002) *Biologia e taxonomia comparada das subespécies de Acromyrmex subterraneus Forel, 1893 (Hymenoptera, Formicidae) e contaminação das operárias por iscas tóxicas*. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Botucatu – SP, Universidade Estadual Paulista, 168p.
- Alves S.B. (1998) Fungos Entomopatogênicos. *In: Alves S.B., Controle microbiano de insetos*. 2. ed. Piracicaba, Fealq, p: 289-381.
- Armitage S.A.O., Boomsma J. J. (2010) The effects of age and social interactions on innate immunity in a leaf-cutting ant. *J. Insect Physiol.*, 56: 780-787.
- Bacci M., Ribeiro S.B., Casarotto M.E.F., Pagnocca F.C. (1995) Biopolymer-degrading bacteria from nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 28: 79-82.
- Ballari S., Farji-Brener A., Tadey M. (2007) Waste management in the leaf-cutting ant *Acromyrmex lobicornis*: division of labour, aggressive behaviour, and location of external refuse dumps. *J. Ins. Behav.*, 20: 87–98.
- Bidochka M.J., Kasperski J.E., Wild, G.A.M. (1998) Occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperate and near northern habitats. *Can. J. Bot.*, 76: 1198-1204.

- Boomsma J.J., Aanen D.K. (2009) Rethinking crop-disease management in fungus-growing ants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 106: 17611-17612.
- Bot A.N.M., Currie C.R., Hart A.G., Boomsma J.J. (2001) Waste management in leaf-cutting ants. *Ethol. Ecol. Evol.* 13: 225-237.
- Cafaro M.J. e Currie C.R. (2005) Phylogenetic analysis of mutualistic filamentous bacteria associated with fungus-growing ants. *Can. J. Microbiol.*, 51: 441-446.
- Carreiro S.C., Pagnocca F.C., Bueno O.C., Bacci M., Hebling M.J.A., Silva O.A. (1997) Yeasts associated with the nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908. *Antonie van Leeuwenhoek*, 71: 243-248.
- Charnley A. K. (1997) Entomopathogenic fungi and their role in pest control. In: Wicklow D.T., Soderstrom M., (eds) *The mycota IV - environmental and microbial relationships*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag., p. 185-201.
- Costa A.N., Vasconcelos, H.L., Veira-neto, E.H.M. & Bruna, E.M. (2008) Do herbivores exert top-down effects in neotropical savannas? Estimates of biomass consumption by leaf-cutter ants. *Journal of Vegetation Science*, 19: 849-854.
- Currie C.R., Scott J.A., Summerbell R.C., Malloch D. (1999) Fungus growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *Nature*, 398: 701-704.
- Currie C.R., Stuart A.E. (2001a) Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 268: 1033-1039.
- Currie C.R. (2001b) A community of ants, fungi, and bacteria: a multilateral approach to studying symbiosis. *Annu. Rev. Microbiol.*, 55: 357-380.

- Currie C.R., Scott J. A., Summerbell R.C., Malloch D. (2003a) Corrigendum: fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *Nature*, 423-461.
- Currie C.R., Bot A.N.M., Boomsma J.J. (2003b) Experimental evidence of a tripartite mutualism: bacteria protect ant fungus gardens from specialized parasites. *Oikos*, 101: 91-102.
- Currie C.R., Poulsen M., Mendenhall J., Boomsma J.J., Billen J. (2006) Coevolved crypts and exocrine glands support mutualistic bacteria in fungus-growing ants. *Science*, 311: 81-83.
- Cremer S., Sixt M. (2009) Analogies in the evolution of individual and social immunity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 364: 129-142.
- Della Lucia T.M.C., Vilela E.F., Anjos N., Moreira D.D.O. (1993a) Criação de formigas cortadeiras em laboratório. In: Della Lucia, T.M.C., *As Formigas cortadeiras*. 1. ed. Viçosa: Folha de Viçosa, p.151-162.
- Della Lucia T.M.C., Moreira D.D.O. (1993b) Caracterização dos Ninhos. In: Della Lucia, T.M.C. (ed.) *As formigas cortadeiras*. 1.ed. Viçosa: Folha de Viçosa, p. 32-42.
- Della Lucia T.M.C. (2003) Hormigas de importancia económica en la region neotropical. In: Fernando Fernandez. (org.) *Introducción a las hormigas de la region neotropical*. 1. ed. Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt, p. 337-349.
- Della Lucia T.M.C., Souza, D.J. (2011) Importância e história de vida das formigas-cortadeiras. In: (Della Lucia T.M.C. ed.) *Formigas cortadeiras: da bioecologia ao manejo*. 1. ed. Viçosa: Editora UFV, 420p.

- Diehl-Fleig E., Lucchese M.E.P. (1991) Reações comportamentais de operárias de *Acromyrmex striatus* (Hymenoptera: Formicidae) na presença de fungos entomopatogênicos. *Rev. Bras. Entomol.*, 35: 101-107.
- Diehl-Fleig E., Luciano H. (1995) Organismos associados a uma colônia de *Acromyrmex heyeri* (Hymenoptera: Formicidae) mantida em laboratório. *Acta Biologica Leopoldensia*. 17 (2): 47-56.
- Diehl-Fleig E., Silva M.E., Labres M.E.V., Specht A. (1992) Ocorrência natural de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. no Rio Grande do Sul. *Acta Biologica Leopoldensia*, 14(1): 99-104.
- Dimbi S., Maniania N.K., Lux S.A., Ekesi S., Mueke M., (2003) Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin and *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, to three adult fruit fly species: *Ceratitis capitata* (Weidemann), *C. rosa* var. *fasciventris* Karsch and *C. cosyra* (Walker) (Diptera: Tephritidae). *Mycopathologia*, 156: 375-832.
- Evans H.C. (1989) Mycopathogens of insects in epigeal and aerial habitats. In: Wilding N., Collins N.M., Hammond P.M., Weber J.F. (eds) *Insect-Fungus Interactions*. London: London Academic Press, p. 205-238.
- Fernández-Marín H., Zimmerman J.K., Rehner S. A., Wcislo W.T. (2006) Active use of metapleural glands by ants in controlling fungal infection. *Proc. R. Soc.*, 273: 1689-1695.
- Fernandez-Marin H., Zimmerman J.K., Nash D.R., Boomsma J.J., Wcislo W.T. (2009) Reduced biological control and enhanced chemical pest management in the evolution of fungus farming in ants. *Proc. R. Soc. London Ser. B*, 276: 2263-2269.
- Fritsh S., Diehl-Fleig E. (1996) Reações comportamentais de *Acromyrmex heyeri* e *A. striatus* (Hymenoptera - Formicidae) a fungos filamentosos. *Acta Biologica Leopoldensia*, 18 (2): 77-92.

- Goettel M.S. e Inglis G.D. (1997) Fungi: Hyphomycetes. In: Lacey L. (ed.) *Manual de técnicas em patologia de insetos*. San Diego, Academic Press, inc. 409p.
- Gonçalves C.R. (1961) O gênero *Acromyrmex* no Brasil (Hymenoptera: Formicidae). *Studia Entom.* 4: 113-180.
- Hajek A.E., St. Leger R.J. (1994) Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review of Entomology*, 39: 293-322.
- Hallsworth J.E., Magan N. (1999) Water and temperature relations of growth of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 74: 261-266.
- Hart A.G., Ratnieks F.L.W. (2002) Waste management in the leaf-cutting ant *Atta colombica*. *Behavioral Ecology*, 13: 224-231.
- 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*. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 4742-4746.
- Hywel-Jones N. L., Gillespie A. T. (1990) Effect of temperature on spore germination in *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Mycol. Res.*, 94: 389-392.
- Hölldobler B. e Wilson E. (1990) *The Ants*. 1. ed. Cambridge: Belknap Press of Harvard University Press, 732p.
- Hughes W.O.H., Eilenberg J., Boomsma J.J. (2002) Trade-offs in group living: transmission and disease resistance in leaf-cutting ants. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 269: 1811-1819.
- Hughes W.H.O., Boomsma J.J. (2004) Let or enemy do the work: within-host interactions between two fungal parasites of leaf-cutting ants. *Proceedings of the Royal Society of London B (Suppl.)*, 271: 104-106.

- Hughes D.P., Evans H.C., Hywel-Jones N.; Boomsma J.J., Armitage S.A.O. (2009) Novel fungal disease in complex leaf-cutting ant societies. *Ecological Entomology*, 34: 214-220.
- Jaccoud D.J., Hughes W.O.H., Jackson C.W. (1999) The epizootiology of a *Metarhizium* infection in mini-nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Ent Exp Appl.*, 93: 51-61.
- Kermarrec A., Decharme M. (1982) Ecopathological aspects in the control of *Acromyrmex octospinosus* Reich (Form., Attini) by entomophagous fungi. In: Breed M. D., Michener C. D., Evans H. E. (eds), *Biology of Social Insects*. Boulder, Colorado: Westview Press, p. 148.
- Kermarrec A., Febvay G., Decharme M. (1986) Protection of leafcutting ants from biohazards: is there a future for microbiological control? In: Lofgren C. S., Vander Meer R. K. (eds) *Fire Ants and Leaf-Cutting Ants: Biology and Management*. Boulder, Colorado: Westview Press, p. 339-356.
- Knapp J.J., Jackson C.W., Howse P.E., Vilela E.F. (1994) Mandibular gland secretions of leaf-cutting ants: role in defense against alien fungi. *XII Congress of the International Union for the Study of Social Insects*, Paris, p. 109.
- Kost C., Lakatos T., Böttcher I., Arendholz W.R., Redenbach M., Wirth R. (2007) Non-specific association between filamentous bacteria and fungus-growing ants. *Naturwissenschaften*, 94 (10): 821-828.
- Lacerda F.G., Della Lucia T.M.C., Serrao J.E., Cecon P.R., Souza L.M., Souza D.J. (2010) Morphometry of the metapleural gland of workers engaged in different behavioral tasks in the ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Animal Biology*, 60: 229-236.

- Leal, R.I., Wirth, R., Tabarelli, M. (2011) Dispersão de sementes por formigas-cortadeiras. In: Della Lucia T.M.C. (ed.) *Formigas cortadeiras: da bioecologia ao manejo*. 1. ed. Viçosa: Editora UFV, 420p.
- Liu H.P., Skinner M., Brownbridge M., Parker B.L., (2003) Characterization of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates for management of tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). *J. Invertebr. Pathol.*, 82: 139-147.
- Lourenco F.R. e Pinto T.J.A. (2009) Comparison of three experimental designs employed in gentamicin microbiological assay through agar diffusion. *J. Pharm. Sci., Brasil*, 45 (3): 559-566.
- Luz C., Tigano M. S., Silva I. G., Cordeiro C. M., Alajanabi S. M. (1998) Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 93: 839-846.
- Mayhé-Nunes A.J. (1991) *Estudo de Acromyrmex (Hymenoptera: Formicidae) com ocorrência constatada no Brasil: Subsídios para uma análise filogenética*. (Tese Mestrado) - Viçosa - MG, UFV, 122p.
- Marinho C.G.S., Della Lucia T.M.C., Picanço M.C. (2006) Fatores que dificultam o controle das formigas cortadeiras. *Bahia Agrícola*, 7 (2): 18-21.
- Marsaro A.L.Jr., Della Lucia T.M.C., Barbosa L.C.A., Maffia L.A., Morandi M.A.B. (2001) Efeito de secreções da glândula mandibular de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) sobre a germinação de conídios de *Botrytis cinerea* Pers. *Fr. Neotrop. Entomol.*, 30: 403-406.
- Meyling N., Eilenberg J. (2007) Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation biological control. *Biological Control*, 43: 145-155.

- Moreira D.D.O., Della Lucia T.M.C. (1993) Duração do feromônio de trilha de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* e sua capacidade de atração em diferentes concentrações. *Revista Arvore*, 17(2): 202-212.
- Mueller U.G., Dash D., Rabeling C., Rodrigues A. (2008) Coevolution between attine ants and actinomycete bacteria: a reevaluation. *Evol.* 11: 2894-2912.
- Mueller U.G., Ishak H., Lee J.C., Sen R., Gutell R.R. (2010) Placement of attine ant-associated *Pseudonocardia* in a global *Pseudonocardia* phylogeny (Pseudonocardiaceae: Actinomycetales): A test of two symbiont-association models. *Antonie van Leeuwenhoek*, 98: 195-212.
- Oh D-C, Scott J.J., Poulsen M.Z., Currie C.R., Clardy J. (2008) Discovery of new secondary metabolites mediating insect-microorganism symbioses. *Planta Med*, 74: 906–906.
- Oh D-C, Poulsen M., Currie C.R., Clardy J. (2009) Dentigerumycin, the bacterially produced molecular mediator of a fungus growing ant symbiosis. *Nat. Chem. Biol.*, 5: 391-393.
- Pagnocca F.C. (1997) Microbiota associada aos ninhos de formigas cortadeiras. *Encontro de mirmecologia*, 13, Ilhéus, Bahia: UESC, 24p.
- Pagnocca, F.C., Rodrigues, A., Bacci Jr., M. (2011) Microrganismos associados às formigas-cortadeiras. In: Della Lucia T.M.C. (ed.) *Formigas cortadeiras: da bioecologia ao manejo*. 1. ed. Viçosa: Editora UFV, 420p.
- Pereira R.C., Della Lucia T.M.C. (1998) Estimativa populacional em ninhos de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* Forel, 1893 (Hymenoptera: Formicidae). *Revista Ceres*, 45: 573-578.
- Poulsen M., Bot A.N.M., Currie C.R. e Boomsma, J.J. (2002a) Mutualistic bacteria and a possible trade-off between alternative defence mechanisms in *Acromyrmex* leaf-cutting ants. *Insectes Sociaux*, 49: 15-19.

- Poulsen M., Bot A.N.M., Nielsen M.G., Boomsma J.J. (2002b) Experimental evidence for the costs and hygienic significance of the antibiotic metapleural gland secretion in leaf-cutting ants. *Behav Ecol Sociobiol*, 52: 151-157.
- Poulsen M., Bot N. M., Currie C.R., Nielsen M. G., Boomsma J.J. (2003a) Within-Colony Transmission and Cost of a mutualistic bacterium in the leafcutting ant *Acromyrmex octospinosus*. *Functional Ecology*, 17 (2): 260-269.
- Poulsen M., Bot A.N.M., Boomsma J.J. (2003b) The effect of metapleural gland on the growth of a mutualistic bacterium on the cuticle of leafcutting ants. *Naturwissenschaften*, 90 (9): 406-409.
- Poulsen M., Cafaro M., Boomsma J.J., Currie C.R. (2005) Specificity of the mutualistic association between actinomycete bacteria and two sympatric species of *Acromyrmex* leaf-cutting ants. *Mol. Ecol.* 14: 3597-3604.
- Poulsen M., Hughes W.O.H., Boomsma J.J. (2006) Differential resistance and the importance of antibiotic production in *Acromyrmex echinator* leaf-cutting ant castes towards the entomopathogenic fungus *Aspergillus nomius*. *Insect. Soc.*, 53: 349-355.
- Poulsen M., Erhardt D.P., Molinaro D.J., Ting-Li L., and Currie C.R. (2007) Antagonistic bacterial interactions help shape host-symbiont dynamics within the fungus-growing ant-microbe mutualism. *PLoS One*, 2: 960p.
- Reynolds S.E., Samuels R.I. (1996) Physiology and biochemistry of insect moulting fluid. *Adv. Insect Physiol.*, 26: 157-232.
- Ribeiro S.B. (2000) *Caracterização de espécies bacterianas encontradas em ninhos de Atta sexdens L. e isolamento de Streptomyces de formigas da tribo Attini*. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) – Rio Claro – SP, Universidade Estadual Paulista.

- Rodrigues A., Pagnocca F.C., Bacci Jr. M., Hebling M.J.A., Bueno O.C., Pfenning L.H., (2005) Variability of non-mutualistic filamentous fungi associated with *Atta sexdens rubropilosa* Nests. *Folia Microbiologica*, 5 (50): 421–425.
- Rodrigues A., Carletti C.D., Bueno O.C., Pagnocca F.C. (2008) Leaf-cutting ant faecal fluid and mandibular gland secretion: effects on microfungi spore germination. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39: 64-67.
- Rodrigues A.R., Cable N., Mueller U.G., Bacci M., Pagnocca F.C. (2009) Antagonistic interactions between garden yeasts and microfungal garden pathogens of leaf-cutting ants. *Antonie van Leeuwenhoek*, 6: 331-342.
- Santos A.V., Dillon R.J., Dillon V.M., Reynolds S.E., Samuels R.I. (2004) Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *FEMS Microbiology Letters*, 239: 319-323.
- Santos A.V., Oliveira B.L., Samuels R.I. (2007) Selection of entomopathogenic fungi for use in combination with sub-lethal doses of imidacloprid: perspectives for the control of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). *Mycopathologia, Netherlands*. 163 (4): 223-240.
- Seipke R.F., Crossman L., Drou N., Heavens D., Bibb M.J., Caccamo M., Hutchings M.I. (2011) Draft genome sequence of *Streptomyces* S4, a symbiont of the leafcutter ant *Acromyrmex octospinosus*. *J. Bacteriol*, 193: 4270-4271.
- Schmid-Hempel P. (1998) Parasites in social insects: monographs in behavior and ecology. *Princeton University Press*, 409 p.
- Schultz T.R., Brady S.G. (2008) Major evolutionary transitions in ant agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 14 (105): 5435-5440.

- Seifert K.A., Samson R.A., Chapela I.H. (1995) *Escovopsis aspergilloides*, a rediscovered hyphomycete from leaf-cutting ant nests. *Mycologia*, 87: 407-413.
- Shimazu M., Maehara N., Sato H. (2002) Density dynamics of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* Vuillemin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) introduced into forest soil, and its influence on other soil microorganisms. *Appl. Entomol. Zool.*, 37 (2): 263-269.
- Schoenian I., Spiteller M., Ghaste M., Wirth R., Herz H., Spiteller D. (2011) Chemical basis of the synergism and antagonism in microbial communities in the nests of leaf-cutting ants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108: 1955-1960.
- Sen R., Ishak H.D., Estrada D., Dowd S.E., Hong E., Mueller U.G. (2009) Generalized antifungal activity and 454-screening of *Pseudonocardia* and *Amycolatopsis* bacteria in nests of fungus-growing ants. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 106: 17805-17810.
- St Leger R.J., Staples R.C., Roberts D.W. (1991) Entomopathogenic isolates of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Aspergillus flavus* produce multiple extracellular chitinase isozymes. *J. Invertr. Pathol.*, 61: 81-84.
- St. Leger R.J., Joshi L., Bidochka M.J., Rizzo N.W., Roberts, D. (1996) Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride*, and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 907-912.
- Tabashnik B. (1994) Evolution of Resistance to *Bacillus Thuringiensis*. *Annual Review of Entomology*. 39: 47-79.
- Wilson E.O. (1971) *The Insect Societies*. 1. ed. Cambridge: Harvard University, 548p.

- Zhang M.M., Poulsen M., Currie C.R. (2007) Symbiont recognition of mutualistic bacteria by *Acromyrmex* leaf-cutting ants. *The ISME Journal*, 1: 313-320.
- Zimmerman G. (1993) The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. *Pesticide Science*, 37: 375-379.
- Zimmermann G., (2007a). Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Sci. Technol.*, 17: 879-920.
- Zimmermann G., (2007b). Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Sci. Technol.*, 17: 553-596.
- Zucchi T.D., Guidolin A.S., Côtoli F.L. (2010) Isolation and characterization of actinobacteria ectosymbionts from *Acromyrmex subterraneus brunneus* (Hymenoptera: Formicidae). *Microbiol. Res.*, 166: 68-76.