



(Foto: Flickr. Reprodução)

Alterações no ambiente impactam atividades das formigas fungicultoras.

Microbiomas de formigas fungicultoras em diferentes biomas brasileiros

Estudos sobre esses insetos podem levar à compreensão da ecologia química e possíveis aplicações terapêuticas na saúde humana

* Carlismari O. Grundm

** Ivan L. F. Migliorini

*** Weilan G. P. Melo

**** Mônica T. Pupo

Resumo

Pesquisadores brasileiros e americanos revelaram uma descoberta extraordinária ao estudar formigas em diferentes regiões do Brasil. Esses insetos, conhecidos como formigas fungicultoras, têm uma relação íntima com fungos que cultivam para obter alimento, além de outros microrganismos que completam uma surpreendente simbiose multilateral. O estudo concentrou-se principalmente nos gêneros de formigas *Acromyrmex* e *Paratrachymyrmex*, encontrados em diferentes biomas como

a Amazônia, Mata Atlântica e a transição Cerrado-Mata Atlântica. Ao analisar essas formigas, os cientistas identificaram bactérias do gênero *Pseudonocardia* que estavam presentes em insetos de todos os biomas amostrados. Mas a grande surpresa foi a descoberta de uma substância inédita, chamada attinimicina, produzida por cerca de 73% das bactérias *Pseudonocardia* associadas às formigas. A attinimicina mostrou ter propriedades biológicas relevantes. Além de ajudar as formigas a se defenderem contra patógenos prejudiciais, ela também exibiu notável eficácia contra um fungo que comumente afeta humanos, a *Candida albicans*. Esse achado sugere que os microbiomas das formigas podem ter potencial terapêutico na saúde humana, oferecendo uma nova perspectiva para o campo da pesquisa biomédica. Essa pesquisa destaca não apenas a fascinante cooperação entre formigas e microrganismos, mediada por compostos químicos, mas também destaca a biodiversidade única dos biomas brasileiros, sistemas ricos que ainda carecem de estudos e que necessitam de preservação. Essas descobertas abrem portas para futuras investigações e destacam como a natureza continua a nos surpreender, revelando segredos valiosos em nossos próprios quintais.

Palavras-chave: Formigas agricultoras; Microrganismos; Produtos naturais; Simbiose.

A classe dos insetos compreende um dos grupos mais abundantes, diversificados e bem distribuídos existentes na Terra, representando mais de 70% de todas as espécies de seres vivos já descritas [1,2]. Muitos desses representantes pertencentes às ordens Hymenoptera (formigas e abelhas) [3,4], Isoptera (cupins) [5] e Coleoptera (besouros) [6] mantêm relações simbióticas multilaterais com diversos microrganismos que habitam suas colônias para garantir comida e proteção. Um exemplo de interação simbiótica entre inseto e microrganismo é a fungicultura. Essa prática consiste no cultivo e domesticação de um fungo pelo inseto em sua colônia, por meio do constante fornecimento de matéria orgânica para o microrganismo, que, em troca, degrada o material orgânico produzindo nutrientes assimiláveis para o animal [7]. Como existem benefícios para os dois organismos envolvidos na interação, esse tipo de interação é considerada mutualística.

Entre os insetos “agricultores” (também

conhecidos como fungicultores), ou seja, que cultivam seu próprio alimento, as formigas pertencentes à tribo Attini (subtribo Attina, subfamília Myrmicinae) se destacam nessa prática há mais de 60 milhões de anos [8]. Essas formigas se originaram na Amazônia [9] e, posteriormente, espalharam-se pela América Central e pelos Neotrópicos [10], classificadas em 19 gêneros e 245 espécies descritas [8]. Os gêneros mais popularmente conhecidos incluem as formigas saúvas (*Atta*) e as quenquéns (*Acromyrmex*), que cortam e utilizam material vegetal fresco, como folhas e flores, como substrato para o cultivo do fungo alimento [3,13], sendo, por isso, denominadas formigas cortadeiras. Esse fungo, também denominado cultivar, é um basidiomiceto representado por várias espécies da tribo Leucocoprineae, que coevoluiu em um tipo de mutualismo obrigatório com as formigas, vivendo em câmaras específicas (“jardins fúngicos”) dentro da colônia [13-15]. Muitas das espécies de cultivar possuem estruturas especializadas

em suas hifas chamadas de gongilídeos. Essas são pequenas protuberâncias esféricas ricas em nutrientes, como carboidratos e lipídeos, que servem como fonte de alimento para as formigas (Figura 1). Esses nutrientes, por sua vez, são provenientes do processamento realizado pelo fungo daquele material orgânico coletado pelas formigas [16-18].

Como essas formigas vivem em grandes comunidades, elas possuem uma alta demanda de nutrientes dentro das colônias. Dessa forma, esse ambiente é extremamente vulnerável a infestações por outros microrganismos patogênicos como os fungos filamentosos dos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Escovopsis* [19]. *Escovopsis* em particular também coevoluiu com as formigas agricultoras e se especializou em parasitar os jardins fúngicos de suas colônias. Por meio do consumo do cultivar, o fungo *Escovopsis* diminui a sobrevivência e a taxa de reprodução das formigas, podendo causar a destruição completa de uma colônia. Esse patógeno é considerado

específico dentro desse contexto, pois não é encontrado de forma livre na natureza, e tem sido isolado apenas do jardim de fungo e das pilhas de lixo das colônias de formigas, em uma relação simbiótica do tipo parasitismo obrigatório [20-23].

Ao longo de sua evolução, as formigas da subtribo *Attina* desenvolveram diferentes mecanismos comportamentais e químicos para auxiliar na proteção dos seus ninhos frente à dispersão desses microrganismos invasores. Entre os mecanismos comportamentais pode-se destacar o pré-processamento do material orgânico coletado antes de sua incorporação no jardim de fungos e a constante limpeza do local. Essa higienização inclui a remoção de esporos patogênicos e de fragmentos infectados do próprio cultivar [21,24,25]. Já os mecanismos químicos englobam a produção de compostos antimicrobianos produzidos pela formiga e secretados através de suas glândulas metapleurais e fezes [26-28]. Adicionalmente, actinobactérias, especialmente do gênero *Pseudonocardia*,

hospedadas nas cutículas das formigas *attina*, também são capazes de produzir substâncias bioativas. Esses compostos químicos auxiliam na defesa da colônia contra espécies patogênicas de maneira seletiva, sem prejudicar o fungo alimento, o que torna as actinobactérias mutualistas obrigatórias desse sistema [29-31] (Figura 2).

Nesse contexto, o estudo dos microbiomas das formigas fungicultoras pode levar a melhor compreensão da ecologia química envolvida no sistema, ou seja, como os compostos químicos produzidos por microrganismos simbiotes participam da intermediação das interações entre as diferentes espécies envolvidas. Além disso, como esses compostos químicos (produtos naturais ou metabólitos secundários) exercem funções específicas no ambiente natural, eles também podem ter aplicações terapêuticas na saúde humana.

De fato, a descoberta da simbiose entre actinobactérias e formigas *attina* levou à identificação de compostos biologicamente

ativos e estruturalmente diversos. Alguns exemplos incluem dentigeromicinas [36,37], pseudonocardonas [38], selvamicina [39] e 9-metoxirebecamicina [40] produzidas por diferentes linhagens de *Pseudonocardia*. Notavelmente, esses compostos apresentam uma distribuição limitada e não partilham de um padrão estrutural abrangente. Isso pode ser reflexo de uma história evolutiva altamente fragmentada entre as formigas e as linhagens de actinobactérias estudadas até o momento, aliado ao fato de que a maioria dos estudos relatados se refere a simbiotes bacterianos de formigas coletadas na América Central.

“O estudo dos microbiomas das formigas fungicultoras pode levar a melhor compreensão da ecologia química envolvida no sistema, ou seja, como os compostos químicos produzidos por microrganismos simbiotes participam da intermediação das interações entre as diferentes espécies envolvidas.”

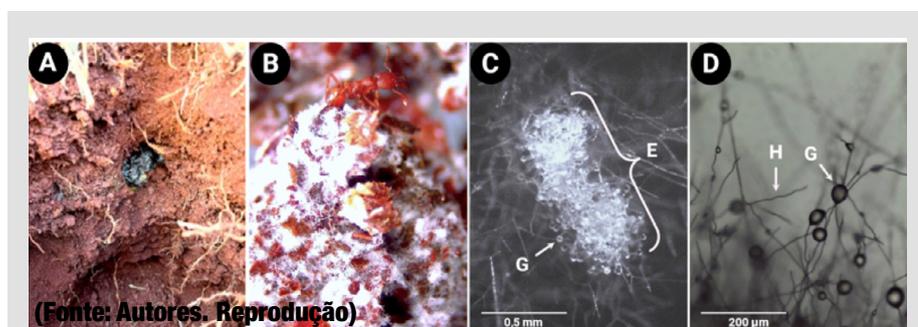
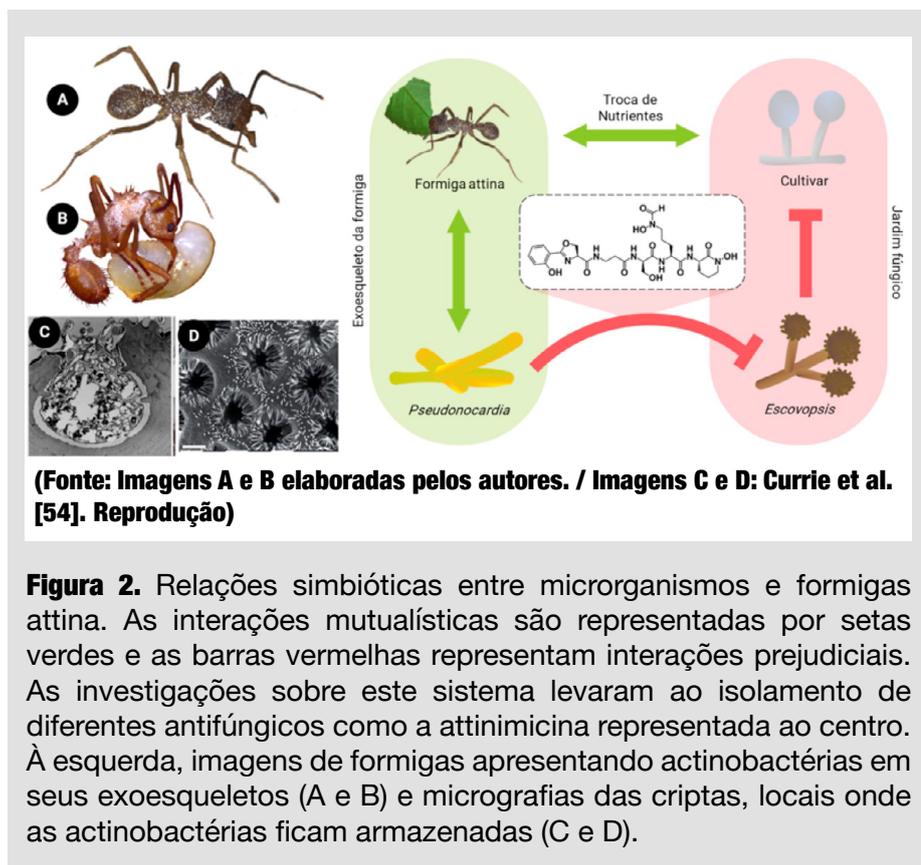


Figura 1. Visão geral do fungo alimento de algumas formigas *attina*. A. Escavação de formigueiro, pertencente a formigas *attina*, com exposição do jardim fúngico. B. Imagem ampliada do jardim fúngico, com presença do substrato vegetal e do fungo alimento (branco). C. Estáfida (E) e gongilídeos (G) presentes no fungo alimento após 14 dias de cultivo. D. Microscopia do fungo evidenciando as hifas (H) e os gongilídeos (G).



(14 colônias), *Apterostigma* (2 colônias), *Paratrachymyrmex* (2 colônias) e quatro outros gêneros de attina não identificados também foram coletados. Curiosamente, no estudo de Feitosa e colaboradores (2022) [42] sobre formigas do Brasil, foram reunidas informações em um panorama baseado em 50 anos de estudos de diversidade, e foi observado que o gênero *Acromyrmex* também foi o mais prevalente no bioma Mata Atlântica.

As coletas no bioma Floresta Amazônica foram realizadas no Parque Nacional de Anavilhanas (Novo Airão, AM) e Reserva Ducke (Manaus, AM). Nessas coletas, cerca de 198 colônias de formigas fungicultoras foram recuperadas. Os gêneros mais prevalentes foram *Apterostigma* (79 colônias) e *Paratrachymyrmex* (70 colônias). *Acromyrmex* (10 colônias), *Cyphomyrmex* (9 colônias) e outras 22 colônias de formigas attina não identificadas também foram recuperadas. Curiosamente, a prevalência dos gêneros *Apterostigma* e *Paratrachymyrmex* também foi observada no estudo de Feitosa

Mais recentemente, estudos sobre microbiomas de formigas attina foram realizados no Brasil, envolvendo uma ampla amostragem de formigueiros provenientes de várias regiões brasileiras, incluindo Amazônia, Mata Atlântica e uma região de ecótono desta para o Cerrado. Esses estudos foram conduzidos por uma equipe multidisciplinar integrada em um projeto financiado conjuntamente pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) e pelo *Fogarty International Center, National Institutes of Health (FIC/NIH)*, dos Estados Unidos, constituindo o primeiro e único *International Cooperative Biodiversity Group (ICBG)* no Brasil [41]. Nesse projeto, pesquisadores brasileiros e norte-americanos trabalharam de forma colaborativa, desenvolvendo atividades desde a coleta de colônias de formigas em parques nacionais

e estaduais brasileiros (Figura 3) até os estudos em laboratório, envolvendo métodos microbiológicos, evolutivos, genéticos e químicos.

Foram realizadas diversas expedições por esses biomas, e as coletas foram realizadas de forma direta, sem uso de armadilhas, geralmente por meio da localização dos ninhos das espécies mais evidentes. Assim, foi possível coletar cerca de 393 colônias de formigas da subtribo Attina pertencentes aos gêneros *Acromyrmex*, *Paratrachymyrmex* (*Trachymyrmex*), *Atta*, *Apterostigma*, *Cyphomyrmex*, *Mycocepurus*, *Mycetophylax* e outras formigas attina não identificadas.

No Bioma Mata Atlântica, as coletas foram concentradas no Parque Nacional do Itatiaia (Itatiaia, RJ), e cerca de 126 colônias de formigas do gênero *Acromyrmex* foram recuperadas. Os gêneros *Cyphomyrmex*

“A descoberta da simbiose entre actinobactérias e formigas attina levou à identificação de compostos biologicamente ativos e estruturalmente diversos.”



(Foto: Autores. Reprodução)

Figura 3. Trabalhos de coleta do jardim fúngico de diferentes espécies de formigas attina realizados nos biomas de ecótono Cerrado – Mata Atlântica e Mata Atlântica

e colaboradores (2022) [42] para esse bioma.

Na interface de ecótono Cerrado - Mata Atlântica, as coletas foram concentradas principalmente no campus da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto (USP/RP). Cerca de 45 colônias de formigas attina foram coletadas, sendo prevalentes os gêneros *Acromyrmex* (17 colônias) e *Atta* (14 colônias), seguidos de *Paratrachymyrmex* (9 colônias) e *Cyphomyrmex* (5 colônias). Nesse caso, como se trata de uma área de transição entre dois biomas, não há informações compiladas de formigas agricultoras. Porém, pode-se afirmar que o gênero *Acromyrmex* é prevalente nos biomas Mata Atlântica e Cerrado. O gênero *Atta*, por sua vez, também é abundante no bioma Mata Atlântica e Cerrado. Assim sendo, essa prevalência dos gêneros *Acromyrmex* e *Atta* nessa interface de ecótono também está presente, segundo o levantamento realizado por

Feitosa e colaboradores (2022) [42] (Figura 4).

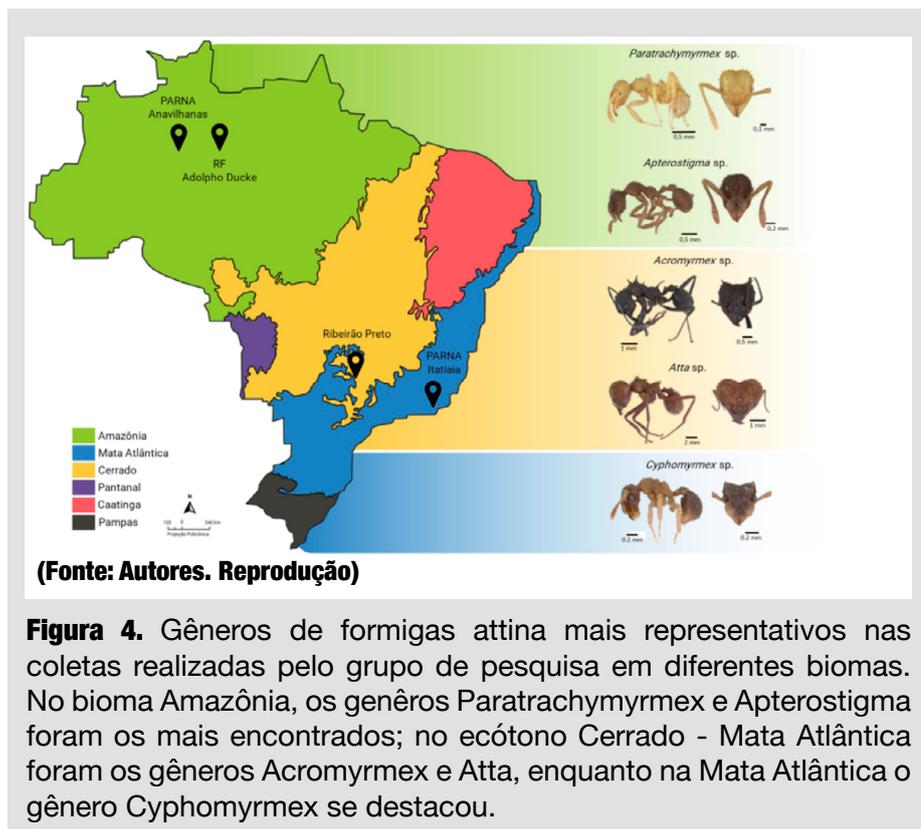
Os microbiomas associados a essa ampla diversidade de formigas foram estudados, e confirmou-se a associação de *Pseudonocardia* a esses insetos em todos os biomas. Surpreendentemente, os estudos indicaram, pela primeira vez na literatura, a ampla distribuição geográfica de um novo composto chamado attinimicina [43]. Esse peptídeo linear foi detectado em 73% das linhagens de *Pseudonocardia* associadas a formigas agricultoras coletadas no Brasil.

Inicialmente, análises metabômicas dos extratos de diversas linhagens de *Pseudonocardia* coletadas revelaram a presença desse metabólito em ampla ocorrência entre essas amostras. Em seguida, os genomas de algumas linhagens de *Pseudonocardia* foram avaliados para encontrar o grupo de genes responsáveis pela biossíntese da attinimicina e assim confirmar a sequência

de aminoácidos na estrutura química. Posteriormente, *primers* (pequenos fragmentos de DNA complementares ao material genético que se deseja estudar) foram desenhados para avaliar se esse mesmo grupo de genes estava presente em *Pseudonocardia* simbiotes de outras espécies de formigas attina provenientes do Panamá. Curiosamente, os genes relacionados à biossíntese da attinimicina só foram encontrados nas linhagens de *Pseudonocardia* brasileiras. Isso demonstra que possivelmente durante o processo evolutivo dessas formigas de diferentes localidades, elas coevoluíram com subfamílias distintas deste gênero de actinobactéria.

A attinimicina demonstrou ser um tipo de sideróforo produzido por *Pseudonocardia*. Os sideróforos são moléculas produzidas por microrganismos capazes de complexar seletivamente a íons de ferro, para auxiliar na captação e aquisição desse metal, essencial para processos metabólicos vitais [44,45]. Os sideróforos também desempenham um papel crítico em competições por ferro no ambiente, onde diferentes microrganismos competem pela aquisição desse micronutriente escasso [46,47]. Adicionalmente, attinimicina

“Attinimicina também apresentou resultados antifúngicos significativos em ensaios utilizando modelos animais.”



de *Pseudonocardia* spp. do Brasil destaca este composto como o primeiro metabólito especializado produzido por bactérias associadas a formigas attina descrito na literatura. Isso enfatiza a importância da ampla amostragem para estudos da biodiversidade dos biomas brasileiros, realçando o potencial para descoberta de novas moléculas bioativas, por meio da investigação desses ecossistemas únicos que abrigam as formigas attina.

Esse maior entendimento da química envolvida na simbiose defensiva em formigas agricultoras no Brasil e a descoberta de um novo produto natural com ação antifúngica em modelos *in vivo* só foram possíveis graças à equipe multidisciplinar de pesquisadores reunidos no projeto ICBG (FAPESP/FIC-NIH).

Microbiota é geralmente definida como o conjunto de microrganismos (bactérias, fungos, protistas, arqueas, algas) vivos presentes em um determinado ambiente [48].

Microbioma refere-se à comunidade microbiana (microbiota) de um determinado ambiente e toda sua atividade bioquímica, incluindo elementos estruturais (ácidos nucleicos, proteínas, lipídios, polissacarídeos), metabólitos (moléculas de sinalização, toxinas, moléculas orgânicas e inorgânicas) e moléculas produzidas por hospedeiros coexistentes e estruturados pelas condições ambientais do entorno [49].

Metabolômica é uma abordagem científica que visa à análise abrangente e quantitativa de todos os metabólitos detectáveis (**metaboloma**) em um organismo. Pode ser direcionada (*target*), priorizando

em sua forma livre apresentou atividade antifúngica seletiva contra *Escovopsis*, mas nenhuma atividade contra o fungo cultivar, exibindo, portanto, atividade antifúngica seletiva contra o patógeno natural das formigas. Com isso, levantou-se a hipótese de que attinimicina poderia ter um papel ecológico na proteção da colônia de formigas contra a dispersão de patógenos.

Para avaliar a possibilidade de produção de attinimicina no ambiente natural e validar a hipótese de seu papel ecológico, novas coletas foram realizadas no Parque Nacional do Itatiaia (RJ) e no campus da USP em Ribeirão Preto (SP). Ao contrário das coletas iniciais, nas quais as bactérias isoladas das formigas foram cultivadas em laboratório e os metabólitos foram extraídos a partir dessas culturas *in vitro*, nestas novas coletas a extração de fragmentos do jardim fúngico, bem como de formigas operárias, foi conduzida no próprio local

de coleta. A detecção *in situ* dessa molécula foi confirmada por espectrometria de massas em aproximadamente 40% das amostras analisadas, o que corrobora a importância desse composto no contexto ecológico em questão.

Attinimicina também apresentou resultados antifúngicos significativos em ensaios utilizando modelos animais infectados com *Candida albicans*. Esse patógeno frequentemente acomete humanos, causando lesões em diferentes tecidos, especialmente as mucosas oral e vaginal. O tratamento de camundongos infectados com attinimicina, em sua forma não complexada com ferro, resultou em uma redução da carga fúngica equiparada com fármacos clinicamente relevantes da classe dos azóis.

A ampla distribuição geográfica do conjunto de genes responsáveis pela biossíntese da attinimicina em linhagens

a análise de metabólitos específicos conhecidos, ou não direcionada (*untarget*), buscando uma análise global do perfil químico, envolvendo todos os metabólitos presentes na amostra, incluindo aqueles não identificados previamente. As técnicas analíticas usualmente empregadas para avaliação do metaboloma incluem a ressonância magnética nuclear e a espectrometria de massa [50-53].

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro das agências de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos 2013/50954-0 (MTP), 2020/06430-0 (COG), 2015/01001-6 (WGPM), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo 307893/2022-7 (MTP) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

* Carlismari O. Grundmann é doutoranda em Ciências pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP), Universidade de São Paulo (USP).

** Ivan L. F. Migliorini é doutorando em Ciências pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, FCFRP-USP.

*** Weilan G. P. Melo é professora substituta no Centro de Ciências Agrárias, Naturais e Letras da Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão (CCANL-Uemasul), Estreito, MA.

**** Mônica T. Pupo é professora titular do Departamento Ciências Farmacêuticas, orientadora do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, FCFRP-USP, e bolsista do CNPq.

Referências

- [1] CHAPMAN, A. D. *Numbers of living species in Australia and the world*. 2. ed. Washington: Heritage, 2009.
- [2] WILSON, E. O. *The diversity of life*. Cambridge: Harvard University Press, 2010.
- [3] CURRIE, C. R. A community of ants, fungi, and bacteria: A multilateral approach to studying symbiosis. *Annual Review of Microbiology*, v. 55, p. 357-80, 2001.
- [4] PALUDO, C. R.; MENEZES, C.; SILVA-JUNIOR, E. A.; VOLLET-NETO, A.; ANDRADE-DOMINGUEZ, A.; PISHCHANY, G. et al. Stingless bee larvae require fungal steroid to pupate. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1122, 2018.
- [5] AANEN, D. K.; EGGLETON, P.; ROULAND-LEFÈVRE, C.; GULDBERG-FROSLEY, T.; ROSENDAHL, S.; BOOMSMA, J. J. The evolution of fungus-growing termites and their mutualistic fungal symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 99, n. 23, p. 14887-14892, 2002.
- [6] FARRELL, B. D.; SEQUEIRA, A. S.; O'MEARA, B. C.; NORMARK, B. B.; CHUNG, J. H.; JORDAL, B. H. The evolution of agriculture in beetles (Curculionidae: Scolytinae and Platypodinae). *Evolution*, v. 55, n. 10, p. 2011-2027, 2001.
- [7] BIEDERMANN, P. H. W.; VEGA, F. E. Ecology and evolution of insect-fungus mutualisms. *Annual Review of Entomology*, v. 65, p. 431-455, 2020.
- [8] SCHULTZ, T. R. Fungus-Farming Ants (Attini in Part). In: STARR, C. *Encyclopedia of social insects*. New York: Springer, 2020.
- [9] SCHULTZ, T. R.; MEIER, R. A. phylogenetic analysis of the fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini) based on morphological characters of the larvae. *Systematic Entomology*, v. 20, n. 4, p. 337-370, 1995.
- [10] BRANSTETTER, M. G.; JESOVNIK, A.; SOSA-CALVO, J.; LLOYD, M. W.; FAIRCLOTH, B. C.; BRADY, S. G. et al. Dry habitats were crucibles of domestication in the evolution of agriculture in ants. *Proceedings of the Royal Society B, Biological Sciences*, v. 284, n. 1852, 2017.
- [11] BOLTON, B. *AntCat: an online catalog of the ants of the world*. Disponível em: <http://antcat.org>. Acesso em: 15 ago. 2016.
- [12] WARD, P. S.; BRADY, S. G.; FISHER, B. L.; SCHULTZ, T. R. The evolution of myrmicine ants: Phylogeny and biogeography of a hyperdiverse ant clade (Hymenoptera: Formicidae). *Systematic Entomology*, v. 40, n. 1, p. 61-81, 2014.
- [13] SCHULTZ, T. R.; BRADY, S. G. Major evolutionary transitions in ant agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 105, n. 14, p. 5435-5440, 2008.
- [14] MUELLER, U. G.; REHNER, S. A.; SCHULTZ, T. R. The evolution of agriculture in ants. *Science*, v. 281, n. 5385, p. 2034-2038, 1998.
- [15] MEHDIABADI, N. J.; SCHULTZ, T. R. Natural history and phylogeny of the fungus-farming ants (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae: Attini). *Myrmecological News*, v. 13, p. 37-55, 2009.
- [16] DE FINE LICHT, H. H.; BOOMSMA, J. J.; TUNLID, A. Symbiotic adaptations in the fungal cultivar of leaf-cutting ants. *Nature Communications*, v. 5, n. 5675, 2014.
- [17] QUILAN, R. J.; CHERRETT, J. M. The role of fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.). *Ecological Entomology*, v. 4, n. 2, p. 151-160, 1979.
- [18] DE FINE LICHT, H. H.; BOOMSMA, J. J. Forage collection, substrate preparation, and diet composition in fungus-growing ants. *Ecological Entomology*, v. 35, n. 3, p. 259-269, 2010.

- [19] PAGNOCCA, F. C.; MASIULIONIS, V. E.; RODRIGUES, A. Specialized fungal parasites and opportunistic fungi in gardens of attine ants. *Psyche A Journal of Entomology*, v. 2012, n. 905109, 2012.
- [20] CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G.; MALLOCH, D. The agricultural pathology of ant fungus gardens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 96, n. 14, p. 7998-8002, 1999.
- [21] CURRIE, C. R.; STUART, A. E. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. *Proceedings of the Royal Society B, Biological Sciences*, v. 268, n. 1471, p. 1033-1039, 2001.
- [22] BOT, A. N. M.; CURRIE, C. R.; HART, A. G.; BOOMSMA, J. J. Waste management in leaf-cutting ants. *Ethology Ecology & Evolution*, v. 13, n. 3, p. 225-237, 2001.
- [23] REYNOLDS, H. T.; CURRIE, C. R. Pathogenicity of *Escovopsis weberi*: The parasite of the attine ant-microbe symbiosis directly consumes the ant-cultivated fungus. *Mycologia*, v. 96, n. 5, p. 955-959, 2004.
- [24] ABRAMOWSKI, D.; CURRIE, C. R.; POULSEN, M. Caste specialization in behavioral defenses against fungus garden parasites in *Acromyrmex octospinosus* leaf-cutting ants. *Insectes Sociaux*, v. 58, p. 65-75, 2011.
- [25] GOES, A. C.; BARCOTO, M. O.; KOOJI, P. W.; BUENO, O. C.; RODRIGUES, A. How Do Leaf-Cutting Ants Recognize Antagonistic Microbes in Their Fungal Crops? *Frontiers in Ecology and Evolution*, v. 8, n. 95, 2020.
- [26] FERNÁNDEZ-MARÍN, H.; ZIMMERMAN, J. K.; REHNER, S. A.; WCISLO, W. T. Active use of the metapleural glands by ants in controlling fungal infection. *Proceedings of the Royal Society B - Biological Sciences*, v. 273, n. 1594, 2006.
- [27] FERNÁNDEZ-MARÍN, H.; NASH, D. R.; HIGGINBOTHAM, S.; ESTRADA, C.; VAN, ZWEDEN, J. S.; D'ETTORRE, P. et al. Functional role of phenylacetic acid from metapleural gland secretions in controlling fungal pathogens in evolutionarily derived leaf-cutting ants. *Proceedings of the Royal Society B - Biological Sciences*, v. 282, n. 1807, 2015.
- [28] RODRIGUES, A.; CARLETTI, C. D.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C. Leaf-cutting ant faecal fluid and mandibular gland secretion: effects on microfungi spore germination. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 39, n. 1, p. 64-67, 2008.
- [29] CURRIE, C. R.; SCOTT, J. A.; SUMMERBELL, R. C.; MALLOCH, D. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *Nature*, v. 398, p. 701-704, 1999.
- [30] POULSEN, M.; CAFARO, M. J.; ERHARDT, D. P.; LITTLE, A. E. F.; GERARDO, N. M.; TEBBETS, B. et al. Variation in *Pseudonocardia* antibiotic defence helps govern parasite-induced morbidity in *Acromyrmex* leaf-cutting ants. *Environmental Microbiology Reports*, v. 2, n. 4, p. 534-540, 2010.
- [31] CAFARO, M. J.; POULSEN, M.; LITTLE, A. E. F.; PRICE, S. L.; GERARDO, N. M.; WONG, B. et al. Specificity in the symbiotic association between fungus-growing ants and protective *Pseudonocardia* bacteria. *Proceedings of the Royal Society B - Biological Sciences*, v. 278, n. 1713, p. 1814-1822, 2011.
- [32] CHEVRETTE, M. G.; CARLSON, C. M.; OORTEGA, H. E.; THOMAS, C.; ANANIEV, G. E.; BARNS, K. J. et al. The antimicrobial potential of *Streptomyces* from insect microbiomes. *Nature Communications*, v. 10, n. 516, 2019.
- [33] HAEDER, S.; WIRTH, R.; HERZ, H.; SPITELLER, D. Candicidin-producing *Streptomyces* support leaf-cutting ants to protect their fungus garden against the pathogenic fungus *Escovopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 106, n. 12, p. 4742-4746, 2009.
- [34] SCHOENIAN, I.; SPITELLER, M.; GHASTE, M.; WIRTH, R.; HERZ, H.; SPITELLER, D. Chemical basis of the synergism and antagonism in microbial communities in the nests of leaf-cutting ants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 108, n. 5, p. 1955-1960, 2011.
- [35] SEIPKE, R. F.; BARKE, J.; BREARLEY, C.; HILL, L.; YU, D. W.; GOSS, R. J. M. et al. A single *Streptomyces* symbiont makes multiple antifungals to support the fungus farming ant *acromyrmex octospinosus*. *PLOS One*, v. 6, n. 8, p. e22028, 2011.
- [36] OH, D. C.; POULSEN, M.; CURRIE, C. R.; CLARDY, J. Dentigerumycin: A bacterial mediator of an ant-fungus symbiosis. *Nature Chemical Biology*, v. 5, p. 391-393, 2009.
- [37] BAE, M.; MEVERS, E.; PISHCHANY, G.; WHALEY, S. G.; ROCK, C. O.; ANDES, D. R. et al. Chemical Exchanges between Multilateral Symbionts. *Organic Letters*, v. 23, n. 5, p. 1648-1652, 2021.
- [38] CARR, G.; DERBYSHIRE, E. R.; CALDERA, E.; CURRIE, C. R.; CLARDY, J. Antibiotic and antimalarial quinones from fungus-growing ant-associated *pseudonocardia* sp. *Journal of Natural Products*, v. 75, n. 10, p. 1806-1809, 2021.
- [39] VAN ARNAM, E. B.; RUZZINI, A. C.; SIT, C. S.; HORN, H.; PINTO-TOMÁS, A. A.; CURRIE, C. R. et al. Selvamycin, an atypical antifungal polyene from two alternative genomic contexts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 113, n. 46, p. 12940-12945, 2016.
- [40] VAN ARNAM, E. B.; RUZZINI, A. C.; SIT, C. S.; CURRIE, C. R.; CLARDY, J. A Rebeccamycin Analog Provides Plasmid-Encoded Niche Defense. *Journal of the American Chemical Society*, v. 137, n. 45, p. 14272-14274, 2015.
- [41] PUPO, M. T.; CURRIE, C. R.; CLARDY, J. Microbial symbionts of insects are the focus of the first International Cooperative Biodiversity Group (ICBG) in Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 28, p. 393-401, 2017.

- [42] FEITOSA, R. M.; CAMACHO, G. P.; SILVA, T. S.; ULYSSÉA, M. A.; LADINO, N.; OLIVEIRA, A. M. et al. Ants of Brazil: an overview based on 50 years of diversity studies. *Systematics and Biodiversity*, v. 20, n. 1, p. 1-27, 2022.
- [43] FUKUDA, T. T. H.; HELFRICH, E. J. N.; MEVERS, E.; MELO, W. G. P.; VAN ARNAM, E. B.; ANDES, D. R. et al. Specialized metabolites reveal evolutionary history and geographic dispersion of a multilateral symbiosis. *ACS Central Science*, v. 7, n. 2, p. 292-299, 2021.
- [44] NEILANDS, J. B. Siderophores: Structure and function of microbial iron transport compounds. *Journal of Biological Chemistry*, v. 270, n. 45, p. 26723-26726, 1995.
- [45] HIDER, R. C.; KONG, X. Chemistry and biology of siderophores. *Natural Product Reports*, v. 27, p. 637-657, 2010.
- [46] NEUHUS, R.; PICOT, A.; OLIVEIRA, N. M.; MITRI, S.; FOSTER, K. R. The evolution of siderophore production as a competitive trait. *Evolution*, v. 71, n. 6, p. 1443-1455, 2017.
- [47] KRAMER, J.; ÖZKAYA, Ö.; KUMMERLI, R. Bacterial siderophores in community and host interactions. *Nature Reviews Microbiology*, v. 18, n. 3, p. 152-163, 2020.
- [48] MARCHESI, J. R.; RAVEL, J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*, v. 3, n. 31, 2015.
- [49] BERG, G.; RYBAKOVA, D.; FISCHER, D.; CERNAVA, T.; VERGES, M. C. C.; CHERLES, T. et al. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*, v. 8, n. 103, 2020.
- [50] PUTRI, S. P.; YAMAMOTO, S.; TSUGAWA, H.; FUKUSAKI, E. Current metabolomics: Technological advances. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 116, n. 1, p. 9-16, 2013.
- [51] ALSEEKH, S.; AHARONI, A.; BROTMAN, Y.; CONTREPOIS, K.; D'AURIA, J.; EWALD, J. et al. Mass spectrometry-based metabolomics: a guide for annotation, quantification and best reporting practices. *Nature Methods*, v. 18, n. 7, p. 747-756, 2021.
- [52] DETTMER, K.; ARONOV, P. A.; HAMMOCK, B. D. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrometry Reviews*, v. 26, n. 1, p. 51-78, 2007.
- [53] GOWDA, G. A. N.; RAFTERY, D. NMR-Based Metabolomics. *Cancer Metabolomics: Methods and Applications*, v. 1280, p. 19-37, 2021.
- [54] CURRIE, C. R.; POULSEN, M.; MENDENHALL, J.; BOOMSMA, J. J.; BILLEN, J. Coevolved crypts and exocrine glands support mutualistic bacteria in fungus-growing ants. *Science*, v. 311, n. 5757, p. 81-83, 2006.