

Simbiosis entre las hormigas Attini, hongos y bacterias: una perspectiva metagenómica

Esmeralda **Escobar Muciño**

La tribu de hormigas Attini incluye 12 géneros y más de 230 especies de hormigas herbívoras que cultivan hongos mutualistas como fuente de alimento (Barke *et al.*, 2010). Las especies de hormigas productoras de hongos se dividen en cinco sistemas agrícolas: cultivadora de hongos coralinos, cultivadora de hongos de levadura, cultivadora de hongos superiores, cultivadora de hongos inferiores y las que gustan de forrajear hojas. Estas últimas hormigas tienen un impacto significativo en la renovación del suelo, el reciclaje del carbono y la disponibilidad de recursos (Suen *et al.*, 2011).

Existen diferentes sistemas de castas de hormigas que forrajean hojas y cultivan hongos (*Leucoagaricus gongylophorus*). Estas castas de hormigas incluyen a las reinas reproductoras, machos reproductores alados, obreras y larvas. Mientras la reina y los machos aseguran la perpetuación de la colonia, las crías son consideradas como la “casta digestiva” de la colonia de hormigas porque poseen enzimas que degradan las hojas que sirven como sustrato del hongo.

El papel de las hormigas obreras es muy variado. Se encargan de buscar alimento, incorporar sustrato, mantener el nido, del cuidado de las crías, de la plantación de hifas fúngicas, de la limpieza de la colonia y de la producción de defensas químicas que dependen de las secreciones glandulares y las bacterias mutualistas (Aylward *et al.*, 2012; Goes *et al.*, 2020).

La principal actividad de las hormigas Attini consiste en recolectar hojas para alimentar a ciertas especies de hongos. Estos hongos actúan como un “sistema digestivo auxiliar”, encargándose de degradar polímeros que sirven de alimento a las hormigas, lo que a su vez aumenta la durabilidad del nido (Aylward *et al.*, 2012). Básicamente, los hongos convierten el material vegetal que se considera difícil de descomponer o “recalcitrante” en nutrientes ricos y disponibles para las hormigas (Barcoto *et al.*, 2020). Los linajes de hormigas que cultivan hongos y que han evolucionado de manera independiente pertenecen a los grupos *Hymenoptera*, *Formicidae* y *Myrmicinae* (Barcoto *et al.*, 2020).

Un aspecto fascinante de la interacción entre microorganismos es la relación que establecen las bacterias y los hongos en el entorno de las hormigas. Estas hormigas crean una estructura especial conocida como “jardín de hongos”, donde cultivan hongos que son esenciales para la supervivencia. En este ecosistema, las bacterias desempeñan un papel crucial al ayudar a descomponer la lignocelulosa, fijar nitrógeno y producir aminoácidos y vitaminas que benefician a las hormigas. Tal colaboración forma un “mutualismo tripartito” donde las hormigas, los hongos y las bacterias se ayudan mutuamente, lo que no solo proporciona alimento a las hormigas, sino que también produce metabolitos que actúan como defensa para la colonia (Barke *et al.*, 2010).

HERRAMIENTAS EN EL ESTUDIO DE LOS MICROORGANISMOS HALLADOS EN LAS HORMIGAS

La metagenómica, en palabras sencillas, es obtener el ácido desoxirribonucleico (ADN) de un insecto, una bacteria o un hongo sin necesidad de aislar los microorganismos en el laboratorio. El ADN de hongos y bacterias se encuentra en el cuerpo de las hormigas y puede ser obtenido a partir de un muestreo de colonias de hormigas recolectadas en campo o criadas en laboratorios. Posteriormente, se secuencian el ADN y los resultados de la secuenciación se analizan por medio de métodos bioinformáticos

para el armado o ensamble del metagenoma con el objetivo de interpretarlo. Todo, con la finalidad de dilucidar las familias de genes y proteínas funcionales que conforman el genoma de la hormiga y sus microorganismos (Figura 1A) (Barcoto *et al.*, 2020).

Además, por medio del análisis metagenómico, se puede conocer la abundancia de las familias de bacterias presentes en las hormigas, así como algunas estadísticas sobre la diversidad bacteriana basándose en la comparación de secuencias metagenómicas con bancos de datos como SILVA, que contiene una gran cantidad de secuencias del gen ribosomal del 16S rARN de microorganismos que son cultivables o no cultivables en el laboratorio (Figura 1B) (Barcoto *et al.*, 2020). El gen 16S rARN es de gran importancia, se encuentra en las bacterias y es el encargado de fabricar una molécula que forma parte de los ribosomas, que son las “fábricas” de proteínas de las células bacterianas. Al estudiar el gen 16S rARN, los científicos pueden identificar diferentes tipos de bacterias, ya que este gen es único para cada especie. Es como una huella digital de las bacterias que ayuda a entender la diversidad de la vida microbiana.

¿CUÁL ES LA FUNCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS EN LAS HORMIGAS?

Las hormigas presentan modificaciones genéticas que reflejan su dependencia obligada con un “hongo saprófito” que se alimenta de materia orgánica muerta, con la finalidad de obtener nutrientes que las hormigas no pueden producir por sí mismas. Como ejemplo, la vía de la biosíntesis de aminoácidos como la arginina y de producción de la proteína hexamerina; ambos como vbnm, puestos son necesarios para la obtención de nutrientes y son probablemente obtenidos de los hongos cultivados por las hormigas (Suen *et al.*, 2011).

En general, las hormigas attinas llevan a cabo un mutualismo tripartito con el hongo *Leucoagaricus gongylophorus*, que proporciona alimento, y con bacterias como los actinomicetos, que producen una gran variedad de compuestos con propiedades antimicrobianas, como la canicidina y la dentigerumicina (Barke *et al.*, 2010).

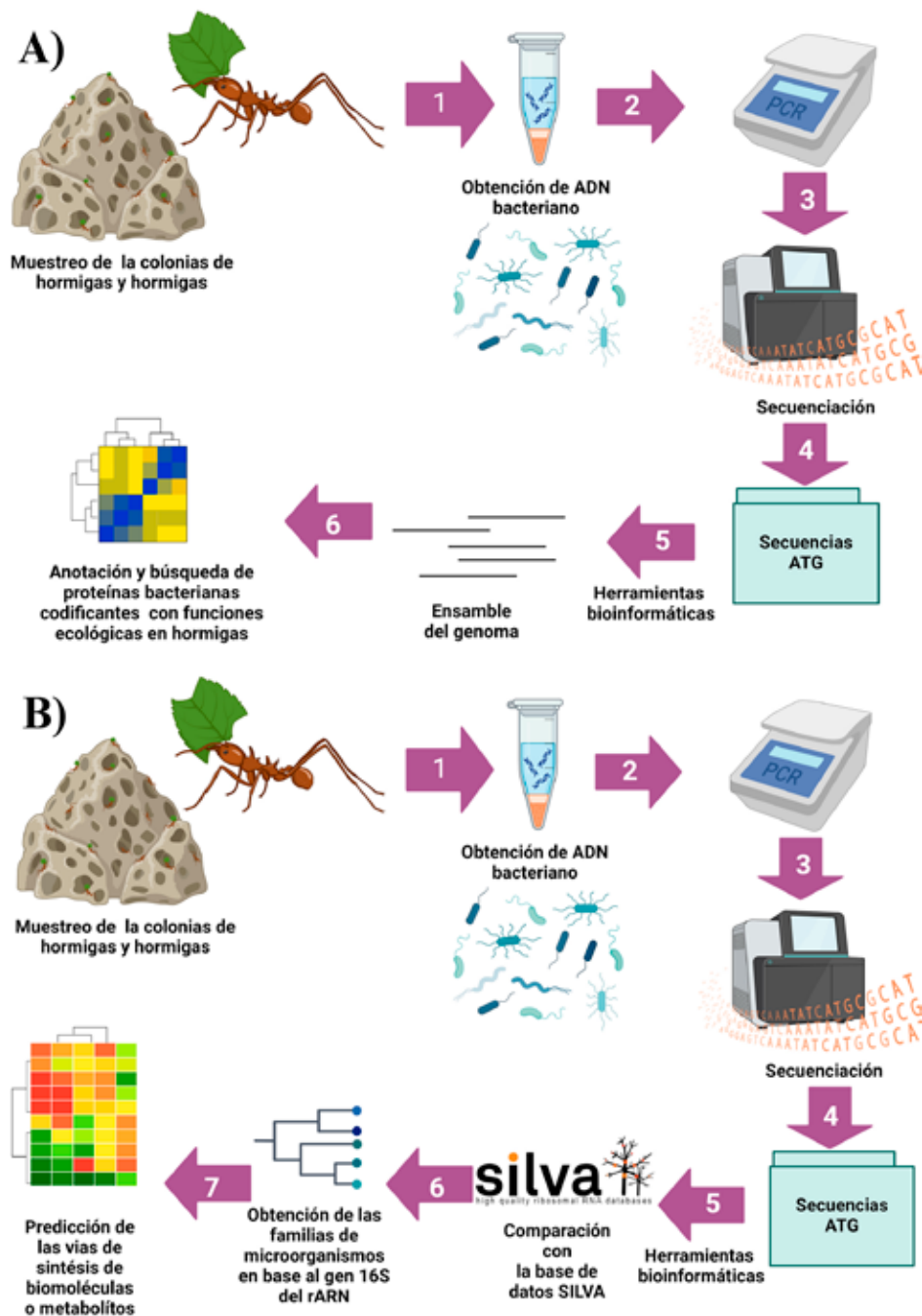


Figura 1. Técnicas metagenómicas usadas para comprender la ecología de las hormigas y bacterias simbióticas. (A) Secuenciación metagenómica de los genomas de hormigas. (B) Secuenciación del gen 16S rARN en bacterias provenientes de hormigas. Figura elaborada en BioRender bajo una licencia institucional.

Los actinomicetos se pueden encontrar en la cutícula de las hormigas y son capaces de inhibir el crecimiento de hongos patógenos de hormigas como *Escovopsis* (Worsley *et al.*, 2019; do Nascimento *et al.*, 2022). Una característica importante de las hormigas es que pueden heredar simbiontes microbianos compartiéndolos o enredándose a sus crías. Las hormigas cortadoras de hojas, así como la

microbiota intestinal y del nido, desempeñan funciones que incluyen la fijación de nitrógeno, la producción de antibióticos y enzimas degradadoras de carbohidratos, la síntesis de vitaminas y la conversión de arginina en amoníaco. Todos estos compuestos son necesarios para los procesos vitales de las hormigas

(Aylward *et al.*, 2012; Worsley *et al.*, 2019). Además, las hormigas suelen tener resistencia natural a los hongos y pueden producir compuestos antifúngicos que incluyen proteínas especializadas, venenos, fluidos corporales conocidos como hemolinfas y otros metabolitos secundarios que ayudan a combatir infecciones causadas por hongos (Kett *et al.*, 2021).

En las colonias existen mecanismos de limpieza en los que participan microorganismos que viven en el exoesqueleto de las hormigas. Por ejemplo, los actinomicetos que funcionan como una primera línea de defensa.

Además, las hormigas forrajeras tienden a rechazar ciertas plantas utilizando su memoria olfativa, que se forma por medio del aprendizaje por evitación, lo que le ayuda a identificar que no son adecuadas para cultivar su hongo simbiótico. Este mecanismo se aplica a las crías de hormiga: las adultas establecen un sistema de limpieza mediante la absorción y propagación de veneno, cuyo componente principal es el ácido fórmico. Este proceso actúa como un mecanismo de inmunidad social contra patógenos como los hongos que afectan a las hormigas, y ayuda a reducir la contaminación microbiana del material de las hojas antes de que ingresen al nido.

En resumen, se trata de un tipo de inmunidad social que se basa en mecanismos de reconocimiento químico. Así es como se crea una memoria que relaciona los daños a la colonia con señales específicas provenientes de microorganismos patógenos (Goes *et al.*, 2020). En las hormigas del género *Atta*, la secuenciación del metagenoma ha sido muy útil para predecir las proteínas codificantes que realizan diversas funciones bacterianas. Un ejemplo son las enzimas hidrolíticas conocidas como “CaZymas”, que degradan material vegetal y liberan nutrientes (Barcoto *et al.*, 2020).

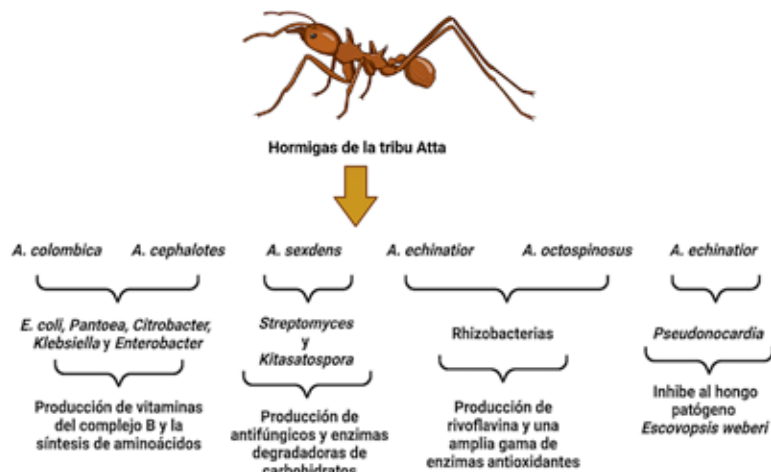


Figura 2. Simbiosis bacterianas en hormigas *Atta* y *Acromyrmex* obtenidos a partir del ensamble metagenómico, la experimentación con procesos bacterianos y la integración de herramientas de predicción (Aylward *et al.*, 2012; Worsley *et al.*, 2019; do Nascimento *et al.*, 2022; Zhukova *et al.*, 2022). Figura elaborada en BioRender bajo una licencia institucional.

También ha sido importante empalmar los datos de secuenciación y predicción con la experimentación en el laboratorio. Un ejemplo es el aislamiento de la bacteria Gram-positiva *Pseudocardia* a partir de la cutícula de la hormiga *Acromyrmex* (Worsley *et al.*, 2019).

Asimismo, en el intestino de *Acromyrmex* se han identificado microorganismos que, como los rizobios, desempeñan un papel biológico importante al proporcionar vitaminas a las hormigas. Además, se ha estudiado el uso del sistema inmunitario adaptativo de las bacterias, en particular del sistema CRISPR, que actúa como un mecanismo de defensa contra virus que afectan a los microorganismos simbióticos de las hormigas conocidos como “fagos”. Cuando las bacterias son atacadas por estos virus, pueden reconocerlo y defenderse de futuras interacciones con los fagos almacenando fragmentos de su ADN en una región especial del ADN bacteriano, que es nada menos que el sistema CRISPR. Posteriormente, se produce una proteína nombrada Cas, la cual tiene la función de cortar el ADN viral neutralizando así la amenaza y evitando el proceso infectivo (Zhukova *et al.*, 2022).

El cambio climático ha sido un factor ante el cual los simbiosis microbianos han logrado adaptarse de manera eficaz. Un ejemplo son las bacterias anhidrobióticas que viven en la cutícula de las hormigas. Estas bacterias han desarrollado mecanismos de tolerancia a la desecación que mejoran la

supervivencia de estos insectos. Estas adaptaciones también permiten a las bacterias regular la temperatura corporal de las hormigas, ayudándolas a enfrentar las condiciones de sequía (Duarte *et al.*, 2019).

La Figura 2 ilustra el papel de los microorganismos aislados de diversas partes del cuerpo de las hormigas y de los nidos de la tribu *Atta*.

INTERACCIONES ECOLÓGICAS ENTRE LAS BACTERIAS SIMBIÓTICAS Y LAS HORMIGAS

La secuenciación del metagenoma ayuda a conocer cuáles son las familias de bacterias que interactúan con las colonias de hormigas y a entender cómo funcionan las proteínas que producen estos microorganismos. Con ello se facilita entender cómo es que las bacterias y las hormigas van adaptándose mutuamente con la finalidad de preservar la supervivencia mutua, tal como se ha señalado en la interacción entre la bacteria *Rhizobium* y las hormigas (Zhukova *et al.*, 2022).

Por otro lado, importa conocer las funciones metabólicas y nutricionales de las bacterias porque las hormigas constantemente están procesando material vegetal como las hojas, que colectan para romperlas mecánicamente con sus mandíbulas, macerarlas y formar una especie de bolo alimenticio con la finalidad de construir y mantener su colonia. Al mismo tiempo, las hormigas cultivan hongos. Esto significa que impregnan o “inoculan” las masas de hojas con un hongo saprófito que llevan en su cutícula y que ha sido heredado de otras hormigas. Esta actividad es la más importante para la vida de la hormiga, ya que el hongo proporciona alimento a toda la colonia y es por ello que la hormiga cuida constantemente del hongo. Esto les permite obtener nutrientes que se hacen digeribles gracias a la acción de los hongos. También hay bacterias especializadas que viven en simbiosis con las hormigas.

Estas bacterias actúan como defensa para las hormigas al producir compuestos antifúngicos. Otra habilidad de las bacterias es que poseen un arsenal muy vasto de enzimas que degradan el material vegetal y lo convierten en azúcares digeribles, lo cual es por sí mismo un mecanismo de supervivencia. En este caso, las enterobacterias, actinobacterias y

firmicutes son los principales microorganismos responsables de estas funciones (Barcoto *et al.*, 2020).

Finalmente, los aminoácidos y vitaminas son esenciales en los insectos, ya que desempeñan funciones vitales relacionadas con el crecimiento, la reproducción y el metabolismo. Es importante conocer los principales microorganismos involucrados en los procesos de síntesis de biomoléculas. Para lograrlo, existen bacterias que dedican su existencia a suministrar estas moléculas a los insectos, ya que estos no pueden sintetizar aminoácidos y vitaminas por sí mismos. Por lo tanto, las hormigas actúan como hospedadores que proporcionan nutrientes, como fuente de carbono, y un ambiente favorable para la multiplicación de las bacterias simbióticas como las Gram-negativas (Aylward *et al.*, 2012; Zhukova *et al.*, 2022).

CONCLUSIÓN

La metagenómica ha sido una herramienta muy poderosa para determinar las familias de bacterias que interactúan con las hormigas. El uso de herramientas de predicción ha permitido a los investigadores comprender mejor las posibles funciones de los microorganismos en el ciclo de vida de las hormigas. Simultáneamente, ha sido crucial determinar los procesos bacterianos relacionados con la adquisición de nutrientes y la producción de antibióticos como línea de defensa. Esto ha marcado el inicio de la comprensión de las interacciones tripartitas entre hormigas, hongos y bacterias. Es de esperarse que, en un futuro, se investigarán estas interacciones en nuevas especies de hormigas cuya principal actividad es el forrajeo de hojas y el cultivo de hongos.

AGRADECIMIENTOS

Al CONAHCYT, por otorgar la beca de estancia postdoctoral de la autora (CVU 406969).

R E F E R E N C I A S

Aylward FO, Burnum KE, Scott JJ, Suen G, Tringe SG, Adams SM, Barry KW, Nicora CD, Piehowski PD, Purvine SO, Starrett GJ, Goodwin



LA, Smith RD, Lipton MS and Currie CR (2012). Metagenomic and metaproteomic insights into bacterial communities in leaf-cutter ant fungus gardens. *The ISME Journal*, 6(9):1688-1701.

Barcoto MO, Carlos-Shanley C, Fan H, Ferro M, Nagamoto NS, Bacci M, Currie CR and Rodrigues A (2020). Fungus-growing insects host a distinctive microbiota apparently adapted to the fungiculture environment. *Scientific Reports*, 10:1-13.

Barke J, Seipke RF, Grünschow S, Heavens D, Drou N, Bibb MJ, Goss RJ, Yu DW and Hutchings MI (2010). A mixed community of actinomycetes produce multiple antibiotics for the fungus farming ant *Acromyrmex octospinosus*. *BMC Biology*, 8(1):1-10.

do Nascimento MO, Teles Tenório AC, Sarmento RA, Melo R de CC, Della Lucia TMC, Dias AK and de Souza DJ (2022). Soil actinobacteria inhibit antagonistic fungi of leafcutter ant colonies. *Journal of Basic Microbiology*, 62(1):63-73.

Duarte BF, Michelutti KB, Antonialli-Junior WF, Cardoso CAL (2019). Effect of temperature on survival and cuticular composition of three different ant species. *Journal of Thermal Biology*, 80:178-189.

Goes AC, Barcoto MO, Kooij PW, Bueno OC, Rodrigues A (2020). How do leaf-cutting ants recognize antagonistic microbes in their fungal crops? *Frontiers in Ecology and Evolution*, 8:1-2.

Kett S, Pathak A, Turillazzi S, Cavaliere D, Marvasi M (2021). Antifungals, arthropods and antifungal resistance prevention: lessons from ecological

interactions. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 288(1944):1-7.

Suen G, Teiling C, Li L, Holt C, Abouheif E, Bornberg-Bauer E, Bouffard P, Caldera EJ, Cash E, Cavanaugh A, Denas O, Elhaik E, Favé M-J, Gadau J, Gibson JD, Graur D, Grubbs KJ, Hagen DE, Harkins TT, Helmkamp M, Hu H, Johnson BR, Kim J, Marsh SE, Moeller JA, Muñoz-Torres M C, Murphy MC, Naughton MC, Nigam S, Overson R, Rajakumar R, Reese JT, Scott JJ, Smith CR, Tao S, Tsutsui ND, Viljakainen L, Wissler L, Yandell MD, Zimmer F, Taylor J, Slater SC, Clifton SW, Warren WC (2011). The genome sequence of the leaf-cutter ant *atta cephalotes* reveals insights into its obligate symbiotic lifestyle. *PLOS Genetics*, 7(2):1-11.

Worsley S, Hutchings M, Murrell C (2019). The chemical ecology of protective microbiomes in plant roots and leafcutter ants. *Access Microbiology*, 1.

Zhukova M, Sapountzis P, Schiøtt M Boomsma JJ (2022). Phylogenomic analysis and metabolic role reconstruction of mutualistic Rhizobiales hindgut symbionts of *Acromyrmex* leaf-cutting ants. *FEMS Microbiology Ecology*, 98(9):1-13.

Esmeralda Escobar Muciño
Instituto Potosino de Investigación Científica
y Tecnológica A.C.
Postgrado en Ciencias Ambientales
esmeralda.escobar@ipicyt.edu.mx