

## **Isolamento, purificação, identificação e conservação de microrganismos associados ao jardim de fungos simbióticos das formigas cortadeiras *Atta sexdens***

Gonzaga A. D<sup>1</sup>, A. Q. L. Souza<sup>1</sup>; Pereira J O<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus, AM

E:mail:adrianadantas1@gmail.com, antoniaqlsouza@yahoo.com.br; joseodairpereira@yahoo.com.br

### **Resumo**

Algumas formigas tornaram-se dependentes do cultivo de fungos como alimento e desenvolveram uma sociedade de cooperação com tarefas divididas, que os tornam ecologicamente muito importantes. Esta dependência de fungos ocorre em formigas (Formicidae) no monofilético grupo formado por formigas da tribo Attini (Myrmicinae: Formicidae: Hymenoptera), dependentes obrigatórias dos fungos que cultivam para alimento e nas formigas *Megalomyrmex silvestrii* (Myrmicinae, tribo Solenopsidini), que são parasitas sociais de formigas da tribo Attini e que consomem os fungos cultivados por atíneos hospedeiros. Esta pesquisa teve como objetivo isolar, purificar, identificar e conservar de microrganismos associados ao jardim de fungos simbióticos das formigas cortadeiras *Atta sexdens*. Foram isolados seis microrganismos, representados por fungos filamentosos mitospóricos (*Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp.), basidiomiceto (*Leucoagaricus gongylophorus*) Leveduras e Bactérias gram negativas e positivas, que cresceram mesmo na presença de antibióticos. Os resultados do sequenciamento de DNA indicaram a presença de: *Leucoagaricus gongylophorus*; *Bionectria ochroleuca*; *Aspergillus flavus*; *Trichoderma longibrachiatum*; *Fusarium solani* e Leveduras como os microrganismos associados às formigas. Todos os microrganismos isolados e identificados foram preservados para estudos posteriores em ensaios de antagonismo. Recomendamos a continuação dos estudos, pois outros microrganismos podem ser associados a estas formigas cortadeiras, incluindo aqueles de importância biotecnológica.

**Palavras-chave:** *Leucoagaricus gongylophorus*, *Bionectria ochroleuca*, *Aspergillus flavus*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Fusarium solani*

## Introdução

Poucos animais apresentam capacidade de cultivar seu próprio alimento. Algumas linhagens de insetos, entre elas, formigas, cupins e besouros, há aproximadamente 50-60 milhões de anos desenvolveram a capacidade de cultivar fungos para alimento. Alguns destes insetos tornaram-se dependentes do cultivo para alimento e desenvolvem uma sociedade de cooperação com tarefas divididas, que os tornam ecologicamente muito importantes (Mueller e Geraldo, 2002).

Esta dependência de fungos como principal fonte de alimento ocorreu duas vezes em formigas (Formicidae) no monofilético grupo formado por formigas da tribo Attini (Myrmicinae: Formicidae: Hymenoptera) que são dependentes obrigatórias dos fungos que cultivam para alimento e nas formigas *Megalomyrmex silvestrii* (Myrmicinae, tribo Solenopsidini), que são parasitas sociais de formigas da tribo Attini e que consomem os fungos cultivados por atíneos hospedeiros (Adams *et al.*, 2000).

As formigas fornecem aos fungos substratos predominantemente de origem vegetal. As formigas das espécies dos gêneros *Acromyrmex* e *Atta* cortam folhas frescas e têm recebido atenção especial dos pesquisadores devido aos danos causados a plantas silvestres e cultivadas (Currie *et al.*, 2003).

Fungos e formigas se beneficiam com a relação simbiótica; os fungos são utilizados na dieta das formigas que, por sua vez, fornecem aos fungos substratos para crescimento e proteção contra parasitas e competidores (Currie e Stuart, 2001). Portanto, esta pesquisa teve como objetivo verificar o isolamento, purificação, identificação e conservação de microrganismos associados ao jardim de fungos simbióticos das formigas cortadeiras *Atta sexdens*.

## Material e Métodos

Treze colônias da espécie *Atta sexdens*, foram coletados no município de Manaus, AM e transportados para o Laboratório LABGEMMA da Universidade Federal do Amazonas, UFAM. Os ninhos foram acomodados em recipientes de plástico transparente, recebendo água, alimento e outros cuidados.

Para o isolamento, fragmentos dos jardins (esponjas) foram imersas em água destilada autoclavada por um minuto, etanol 70% por um minuto, hipoclorito de sódio (NaOCl) 3% por um minuto, novamente lavados em etanol 70% por 30 segundos e por último em água destilada esterilizada. Após esse processo de assepsia foram retirados fragmentos do fungo simbionte e transferidos para placas de Petri contendo diferentes meios de cultura (BDA e

Pagnocca). Também foi isolado o fungo diretamente do formigueiro, transferindo-se pequenos fragmentos das esponjas para placa de Petri. As placas de cultivo foram transferidas para estufa tipo B.O.D (Biological Oxygen Demand) a 26°C.

Todos os fungos isolados do formigueiro foram submetidos aos procedimentos de cultivos a fim de se obter uma nova colônia a partir de um único esporo. Para tal, utilizou-se a técnica de diluição seriada seguida de plaqueamento de acordo com o protocolo de Azevedo e Costa (1973).

Os isolados utilizados no presente trabalho foram conservados por meio de 3 processos: (1) método segundo Castellani (1939); (2) método do glicerol a 15%, onde a solução de esporos foi armazenada e conservada a -20°C e (3) método dos tubos de ensaio com meio inclinado coberto por óleo mineral.

A extração de DNA dos fungos foi realizada conforme o protocolo utilizado por SOUZA (2006). A PCR foi realizada a partir dos “*primers*” descritos por WHITE et al. (1990) para a região ITS-1 do rDNA. O produto da PCR foi conferido por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com gel blue green e visualizado sob luz ultravioleta.

### **Resultados e Discussão**

A partir do jardim de fungos associados às formigas cortadeiras, foram isolados seis microrganismos, representados por fungos filamentosos mitospóricos (*Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp.), basidiomiceto (*Leucoagaricus gongylophorus*) Leveduras e Bactérias gram negativas e positivas, que cresceram mesmo na presença de antibióticos.

Posteriormente estes fungos foram identificados com auxílio de ferramentas moleculares para a confirmação da espécie. Os resultados do seqüenciamento de DNA indicaram a presença de: *Leucoagaricus gongylophorus*; *Bionectria ochroleuca*; *Aspergillus flavus*; *Trichoderma longibrachiatum*; *Fusarium solani* e Leveduras como os microrganismos associados às formigas. Todos os microrganismos isolados e identificados foram preservados para estudos posteriores em ensaios de antagonismo.

A associação simbiótica entre as formigas que foram objetos deste estudo, juntamente com os fungos por elas cultivados é considerada uma das razões de seu sucesso ecológico na natureza. Aparentemente o desafio continua.

Uma das razões dos poucos estudos realizados com fungos de Attini é a sua difícil identificação. Os estudos realizados até o momento indicam ser basidiomicetos os cultivares de todos os gêneros de Attini (Weber, 1969), porém há dificuldades na definição do táxon

destes fungos, devido ao fato de, na maioria dos casos, apenas desenvolvem hifas estéreis, seja no ninho ou em culturas isoladas de laboratório, dificultando a taxonomia tradicional deste grupo, que é baseada na morfologia do basidioma, estrutura de reprodução destes fungos e que é indispensável na identificação até nível de espécie.

Os resultados encontrados nesta pesquisa confirmam a presença de fungos predominantes nos ninhos de *Atta sexdens* e descreve a presença de outros microrganismos que vivem em associação simbiótica com essas formigas cortadeiras.

Wheeler (1907), Weber (1969) descreveram também estes mesmos microrganismos fazendo parte dos jardins de fungos associados às formigas cortadeiras. A literatura registra ainda a presença de *Leucoagaricus weberi*; *Escovopsis weberi* (Muchovej et al., 1991) e *Escovopsis aspergilloides* e Actinomicetos da família *Pseudonocardiaceae*), como sendo também microrganismos encontrados associados a estas formigas.

Estudos bioquímicos e micromorfológicos confirmam que os fungos simbiossiontes de Attini são basidiomicetos, os quais estão divididos em três grupos: G1- inclui os fungos cultivados pelos gêneros *Atta*, *Acromyrmex*, *Trachymyrmex* e *Sericomyrmex*; único grupo que possui gongilídeos; G2- cultivados pelas espécies morfológicamente derivadas do gênero primitivo *Apterostigma*, possuem abundantes grampos de conexão e hifas aéreas extremamente alongadas, que em algumas espécies servem como proteção aos ninhos; G3- cultivados pelos gêneros *Cyphomyrmex*, *Mycetosorites*, *Mycetophylax* *Mycocephalus*, *Mycetarotes* e *Myrmecocrypta*, são relativamente mais heterogêneos, com alguns exemplares mais próximos ao grupo G1, enquanto outros estão mais relacionados a espécies de basidiomicetos não domesticados pelas formigas (Currie et al. 2003).

Wheeler, em 1910, já previa este fato dizendo: “*O estudo das Attini está apenas começando, e o avanço neste fascinante tema será mais difícil para micologistas do que para entomologistas* (Mueller, 2002).

Em estudos moleculares realizados por Currie *et al.*, (2003) observaram-se diferenças até em nível taxonômico de Família entre os fungos cultivados por diferentes categorias de Attini. MUELLER (2002) faz um relato de todas as ocorrências de basidiomas em ninhos de formigas forrageadoras e, a partir deste trabalho pode-se inferir que, ao menos para as espécies dos gêneros considerados mais evoluídos (*Atta* e *Acromyrmex*) há o cultivo da mesma espécie de fungo.

## Conclusões

A partir do jardim de fungos associados às formigas cortadeiras, foram isolados seis microrganismos, representados por fungos filamentosos mitospóricos (*Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp.), basidiomiceto (*Leucoagaricus gongylophorus*) Leveduras e Bactérias gram negativas e positivas, que cresceram mesmo na presença de antibióticos.

Os resultados do sequenciamento de DNA indicaram a presença de: *Leucoagaricus gongylophorus*; *Bionectria ochroleuca*; *Aspergillus flavus*; *Trichoderma longibrachiatum*; *Fusarium solani* e Leveduras como os microrganismos associados às formigas. Todos os microrganismos isolados e identificados foram preservados para estudos posteriores em ensaios de antagonismo.

Recomendamos a continuação dos estudos, pois outros microrganismos podem ser associados a estas formigas cortadeiras, incluindo aqueles de importância biotecnológica.

### Referencias

Adams MD et al., (2000). The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*. 287(5461):2185-2195.

Azevedo, JL, Costa SOP (1973). Exercícios práticos de genética, São Paulo: EDUSP, 288p.

Castelani A (1939). Viability of mold culture of fungi in distilled water. *J. Trop. Med. Hyg.*, 42:225.

Currie CR; Stuart AE. (2001). Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. *Proceedings. Biological sciences The Royal Society* .

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

Mueller, UG (2002) Ant versus fungus versus mutualism: Ant-cultivar conflict and the deconstruction of the attine ant-fungus symbiosis. *American Naturalist*, 160: S67-S98.

Mueller UG, Geraldo N (2002). Fungus-farming insects: Multiple origins and diverse evolutionary histories. *PNAS*. 23:15247-15249.

Muchovej JJ, Della Lucia TM, Muchovej RM C (1991). *Leucoagaricus weberi* sp. nov. from a live nest of leaf-cutting ants. *Mycol. Res.*, 95(11):1308-1311.

Souza, AQL (2006). Potencial Genético e Químico dos endófitos de *Murray paniculata* L. (Jack). (Tese) Doutorado em Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil, 128 p.

Weber JR, Greer, B, Voight E, White RR. (1969). Unusual strength properties of echinoderm calcite related to structure. *J. Ultrastruct. Res.*, 26: 355-366.

Wheeler WM (1907). The polymorphism of ants, with an account of some singular abnormalities due to parasitism. *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.* 23:1-93.

White T J, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990). Amplificação e sequenciamento de genes de fungos ribossomal RNA para filogenética. In: Innis MA, Gelfand DH, Shinsky JJ, White TJ, editors. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, p.315-322.