



**Microrganismos Associados às Formigas Cortadeiras *Atta sexdens* Fabricius (Hymenoptera, Formicidae: Attini) no Município de Manaus, Amazonas**

Adriana Dantas Gonzaga<sup>1</sup>; Antônia Queiroz Lima de Souza<sup>2</sup>; Cristina Sayuri Maki<sup>3</sup>; José Odair Pereira<sup>4</sup>; Neliton Marques da Silva<sup>5</sup>

Submetido 29/01/2015 – Aceito 19/02/2015 – Publicado on-line 23/03/2015

**RESUMO**

Este trabalho teve por objetivo realizar o isolamento e identificação dos microrganismos associados às formigas cortadeiras *Atta sexdens*. Colônias de formigas com cinco meses foram coletadas e transferidas para o Laboratório de Genética de Microrganismos da UFAM, para assepsia, isolamento, purificação, cultivo e conservação dos microrganismos em meios de cultura, a partir de fragmentos da esponja de fungos dos formigueiros. Após sete dias, foram obtidas colônias monospóricas e destas, realizados microcultivos para identificação clássica e molecular. Os microrganismos identificados foram: *Leucoagaricus gongylophorus*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Aspergillus flavus*, *Bionectria ochroleuca*, *Fusarium solani*, leveduras e bactérias.

**Palavras-chave:** Saúvas, Microbiologia, PCR, Microcultivo.

**Microorganisms Associated with ants cutting machines *Atta sexdens* Fabricius (Hymenoptera, Formicidae: Attini) in the municipality of Manaus, Amazonas.** This study aimed to perform the isolation and identification of microorganisms associated with cutting ants *Atta sexdens*. Ant colonies with five months were collected and transferred to the microorganisms of Genetics Laboratory of UFAM, for disinfection, isolation, purification, cultivation and conservation of microorganisms in culture media from the fungal nests sponge fragments. After seven days, colonies were obtained and these monosporic performed microcultivations for classical and molecular identification. The microorganisms were identified: *Leucoagaricus gongylophorus*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Aspergillus flavus*, *Bionectria ochroleuca*, *Fusarium solani*, yeasts and bacteria.

**Palavras-chave:** Ants, Microbiology, PCR, Microcultivation.

<sup>1</sup> Docente da Universidade Federal do Amazonas – Campus do Instituto de Saúde e Biotecnologia – ISB/Coari, Estrada Coari Mamiá, 305, Bairro Espírito Santo, 69460-000, Coari, Amazonas Brasil – [adrianadantas1@gmail.com](mailto:adrianadantas1@gmail.com);

<sup>2</sup> Docente da Universidade Federal do Amazonas – Faculdade de Ciências Agrárias – UFAM/FCA, Av. General Rodrigo Octávio, 6200, Coroado I, 69077-000, Manaus, Amazonas Brasil – [antoniaqlsouza@yahoo.com.br](mailto:antoniaqlsouza@yahoo.com.br);

<sup>3</sup> Docente da Universidade Federal do Amazonas – Faculdade de Ciências Biológicas – UFAM/ICB, Av. General Rodrigo Octávio, 6200, Coroado I, 69077-000, Manaus, Amazonas Brasil – [cris.maki@gmail.com](mailto:cris.maki@gmail.com);

<sup>4</sup> Docente da Universidade Federal do Amazonas – Faculdade de Ciências Agrárias – UFAM/FCA, Av. General Rodrigo Octávio, 6200, Coroado I, 69077-000, Manaus, Amazonas Brasil – [joseodairpereira@yahoo.com.br](mailto:joseodairpereira@yahoo.com.br);

<sup>5</sup> Docente da Universidade Federal do Amazonas – Faculdade de Ciências Agrárias – UFAM/FCA, Av. General Rodrigo Octávio, 6200, Coroado I, 69077-000, Manaus, Amazonas Brasil – [nmerinato@gmail.com](mailto:nmerinato@gmail.com)



## 1. Introdução

Poucos animais apresentam capacidade de cultivar seu próprio alimento. Alguns insetos como formigas, cupins e besouros, desenvolveram a capacidade de cultivar fungos como alimento há aproximadamente 50-60 milhões de anos. Há insetos que tornaram-se dependentes do cultivo desses microrganismos para alimento e constituíram uma sociedade cooperativa com tarefas divididas, tornando-os ecologicamente muito importantes (Mueller & Geraldo 2002). Há grupos onde o consumo do fungo é a principal fonte de alimento, em outros, apenas uma complementação de dietas (Mueller *et al* 2001).

Esta dependência de fungos como principal fonte de alimento ocorreu duas vezes em formigas (Formicidae), segundo Mueller *et al* (2001): no grupo monofilético formado por formigas da tribo Attini (Myrmicinae: Formicidae: Hymenoptera) (Brandão *et al* 2011), as quais são dependentes obrigatórias dos fungos cultivados (Hölldobler & Wilson 1990) 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 2000).

As formigas da tribo Attini que compreendem mais de 200 espécies, distribuídas em 16 gêneros (Brandão *et al* 2011), são herbívoras predominantes na região Neotropical, entre as latitudes 12° N e 33° S, com grande concentração de espécies na região Amazônica (Mueller *et al* 2001). Esta dominância é resultado da integração metabólica entre as formigas e seus simbiotes (North *et al* 1997; Siqueira 1998), estabelecida durante milhões de anos de co-evolução.

As formigas fornecem aos fungos, substratos predominantemente de origem vegetal. Os representantes dos gêneros *Acromyrmex* e *Atta* cortam folhas frescas e têm recebido atenção especial devido aos danos causados em plantas silvestres e cultivadas (Mayhe-Nunes 1995). Os demais atíneos cultivam fungos sobre fezes de animais, carcaças de insetos e, principalmente, material

vegetal em decomposição (Hölldobler & Wilson 1990).

A origem da tribo Attini não está bem esclarecida. Todos os representantes são cultivadores obrigatórios de fungos, e não se conhece, ainda, qualquer associação facultativa entre atíneos e fungos que possa refletir o estágio primitivo desta simbiose. Mesmo os parentes mais próximos dos atíneos não apresentam associação facultativa com fungos, o que sugere uma rápida transição evolucionária do ancestral caçador para a formiga cultivadora de fungos (Diniz *et al* 1998; Mueller *et al* 2001; Mueller 2002).

Existem dois principais modelos para a origem da fungicultura praticada por formigas. No modelo tradicional, acredita-se que, por acidente, um fungo cresceu em ninhos de formigas tornando-se parte da sua dieta. Em seguida, as formigas teriam desenvolvido a capacidade de cultivá-lo, adicionando substratos para esses microrganismos, os quais são transmitidos do ninho de origem para os descendentes (Weber 1972). No modelo alternativo, as formigas dispersariam fungos especializados que foram posteriormente incorporados à sua dieta e teriam desenvolvido a capacidade de cultivar esses fungos, adicionando-lhes substratos (Mueller *et al* 2001).

Considerando a inexistência de investigações sobre esses microrganismos na região Amazônica, este trabalho teve como objetivo estudar a comunidade de microrganismos associados às formigas cortadeiras *A. sexdens*.

## 2. Material e Método

Foram coletadas no município de Manaus (AM), 13 colônias da espécie *Atta sexdens* (com idade máxima de 5 meses), entre os meses de junho a julho de 2009. Imediatamente após a coleta, as colônias foram transportadas ao Laboratório de Genética de Microrganismos (LAGEM), da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), onde iniciou-se o processo de manutenção das colônias em recipientes de plástico. Nesta fase do desenvolvimento, os ninhos apresentam uma

única câmara de cultivo de fungos de aproximadamente 10 a 15 cm de diâmetro, localizada a poucos centímetros da superfície, facilitando sua escavação (Autuori 1941).

Os ninhos foram escavados de modo a minimizar a desestruturação e o contato das esponjas, também conhecidas como jardim de fungos, com partículas de solo.

No laboratório, os ninhos foram acomodados em recipientes de plástico transparente, os quais permitiram a observação das formigas, boa circulação das operárias e aeração adequada do sistema. As formigas receberam água e alimento, este último sendo basicamente constituído por folhas novas de laranjeira (*Citrus sinensis* L.) e mangueira (*Mangifera indica* L.). Após a estabilização dos formigueiros (cerca de 10 dias), iniciaram-se os ensaios de isolamento. A temperatura dos formigueiros montados em laboratório foi de aproximadamente 28° C.

Fragmentos das esponjas, com aproximadamente três centímetros de diâmetro, foram imersos sucessivamente em água destilada autoclavada (1 minuto), etanol 70% (1 minuto), hipoclorito de sódio (NaOCl) 3% (1 minuto), etanol 70% (30 segundos) e em água destilada autoclavada (30 segundos). Após esse processo, foram retirados fragmentos menores de aproximadamente 3 milímetros de diâmetro, os quais foram transferidos para placas de Petri contendo meios de cultura BDA (Himedia) e Pagnocca (Pagnocca *et al* 1996), acrescidos de ampicilina e tetraciclina (100 µg/mL). As placas foram incubadas em estufa tipo B.O.D (Biological Oxygen Demand) a 26°C por 7 dias. Após esse período, fragmentos das colônias fúngicas foram transferidas para novas placas contendo os mesmos meios de cultura. Após o desenvolvimento das colônias, procedeu-se à obtenção de colônias monospóricas, inoculando-se suspensões de esporos em diluição seriada em placas de Petri contendo os meios de cultivo anteriormente descritos. Para *Leucoagaricus gongylophorus*, o basidiomiceto simbiote, foi realizada diretamente a análise de microcultivo para observação de gongilídeos. Os isolados

purificados foram conservados por meio de 3 processos: (1) método segundo Castellani (1939), mantidos à temperatura ambiente; (2) método do glicerol, onde a suspensão de esporos foi armazenada e conservada em glicerol (15%) a -20°C e (3) método do tubo de ensaio com meio inclinado, onde a colônia fúngica desenvolvida em tubo de ensaio contendo meio de cultura foi submersa em óleo mineral autoclavado e mantida à temperatura ambiente.

As bactérias, aproximadamente seis colônias resistentes aos antibióticos nas concentrações utilizadas foram isoladas e purificadas pela metodologia de esgotamento com estrias cruzadas e cultivadas em 1mL de caldo nutriente por 24h. Após a incubação, foram acrescidos 150µL de glicerol aos tubos, os quais foram mantidos a -20°C. Outro método utilizado foi o de meio de cultura nutriente *soft*, onde as bactérias foram inoculadas no meio de cultura sólido mantido em tubo de microcentrífuga com o auxílio de uma agulha de platina e incubadas por 24h a 26°C. Após a incubação, os tubos foram lacrados e conservados a -4°C.

A identificação dos fungos foi feita pela complementação de análises macromorfológicas (coloração, textura, borda e verso da colônia, produção de pigmentos, taxa de crescimento) e micromorfológicas (hifas, estruturas reprodutivas, estruturas vegetativas) das colônias, bem como pela utilização de métodos moleculares (extração de DNA, amplificação de rDNA e sequenciamento). Estas análises foram realizadas através das técnicas de micro e macrocultivos e visualizados em microscópios estereoscópico.

A extração de DNA dos fungos foi realizada conforme protocolo descrito por Souza (2006). A reação de amplificação para a região ITS-1 e ITS2 do rDNA foi realizada utilizando os *primers* descritos por White *et al* (1990). As condições para amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C por 2,5 min; seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 seg; anelamento a 58°C por 30 seg e extensão a 72°C por 1,5 min, concluindo com uma etapa de extensão final a 72°C por 10 min.

O produto da PCR foi conferido por eletroforese em gel de agarose (1,5%) em tampão TBE (Tris base 108g, ácido bórico 55g, EDTA 7,4g, água destilada 1000mL), corado com gel blue green (Unisciencev - Biotium) e visualizado sob luz ultravioleta.

As reações de seqüenciamento foram feitas com o *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for Mega BACE* (Amersham Biosciences), seguindo-se as orientações do fabricante. Os produtos das reações de seqüenciamento foram submetidos ao seqüenciador automático e as seqüências foram comparadas e confrontadas por meio do BLASTn, com seqüências já depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

### 3. Resultados e Discussão

Os fungos filamentosos mitospóricos (*Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp.), o basidiomiceto (*Leucoagaricus gongylophorus*), as leveduras e as bactérias Gram negativas e Gram positivas foram coletados e identificados pelas suas características morfológicas e moleculares em formigueiros de *Atta sexdens* estabelecidos na região de Manaus (AM).

Wheeler (1907), Brown Junior & Mclean, D. M (1966) e Weber (1969) descreveram estes mesmos microrganismos em associação nos jardins de fungos associados às formigas cortadeiras. A literatura registra ainda, a presença de *Lipaugus weberi*; *Escovopsis weberi* (Muchovej *et al* 1991); *Cyphia aspergilloides* (Seifert *et al* 1995) e actinomicetos da família *Pseudonocardiaceae* (Currie *et al* 1999, 2003) como microrganismos associados a estas formigas na região Sudeste do Brasil.

Estudos bioquímicos e micromorfológicos confirmam que os fungos simbioses de Attini são basidiomicetos, os quais estão divididos em três grupos: G1- inclui basidiomicetos que apresentam gongilídeos e são cultivados pelos gêneros *Atta*, *Acromyrmex*, *Trachymyrmex* e *Sericomyrmex*; G2- inclui basidiomicetos que apresentam abundantes grampos de conexão e hifas aéreas extremamente longas, que em algumas espécies servem como proteção aos

ninhos; são cultivados pelas espécies de formigas morfológicamente derivadas do gênero primitivo *Apterostigma*; G3- inclui basidiomicetos com características heterogêneas, os quais são cultivados pelos gêneros *Cyphomyrmex*, *Mycetosorites*, *Mycetophylax*, *Mycocephalus*, *Mycetarotes* e *Myrmecocrypta* (Chapela *et al* 1994).

Com o auxílio de ferramentas moleculares foram identificados *L. gongylophorus*; *Bionectria ochroleuca*; *A. flavus*; *T. longibrachiatum*; *F. solani*, leveduras e bactérias Gram positivas e Gram negativas como os microrganismos associados às formigas.

A simbiose entre as formigas e os seus microrganismos associados é considerada uma das razões de seu sucesso evolutivo na natureza.

Fungos associados à Attini são pouco estudados devido à dificuldade em identificá-los. Na maioria dos formigueiros, apenas desenvolvem-se estruturas vegetativas, o mesmo ocorrendo em culturas isoladas em laboratório, fato este que dificulta a taxonomia tradicional dos basidiomicetos, a qual é baseada nas características morfológicas do basidioma, estrutura de reprodução destes fungos e, indispensável na identificação ao nível de espécie.

Estudos visando estudar a ocorrência de uma mesma espécie de fungo sendo cultivada por diferentes espécies de Attini foram realizados por Stradling e Powell (1986), que procederam aos testes de interação entre linhagens isoladas de *A. sexdens*, *A. cephalotes*, *Acromyrmex octospinosus* e *Trachymyrmex urichi*, os quais sugeriram que as diferentes espécies estudadas cultivam a mesma espécie de fungo, *L. gongylophorus*. Estudos moleculares realizados por Chapella *et al* (1994) demonstraram diferenças em nível de Família para os fungos cultivados por diferentes 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. Silva-Pinhati *et al* (2004) confirmou esta hipótese, após avaliar rDNA e espaçadores gênicos de diferentes linhagens de fungos cultivados por *Atta* e *Acromyrmex*.

Tabela 1 – Compatibilidade via Blast e índice de similaridade dos fungos isolados do jardim de fungos simbiotes das formigas cortadeiras *Atta sexdens* coletados no município de Manaus, Amazonas

Sigla dos fungos	Índice de similaridade	Sequência blast
P L	30%	<i>Leucoagaricus gongylophorus</i>
P 5.1	97%	<i>Bionectria ochroleuca</i>
P 2.1	87%	<i>Pichia caribbica</i>
P 4.2	98%	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
P 2.1b	99%	<i>Nectria haematococca</i>
P1.1.b	97%	<i>Aspergillus flavus</i>
P 2.2 <sup>a</sup>	94%	<i>Fusarium solani</i>

Fonte: Dados da pesquisa Outubro de 2011

Os resultados encontrados nesta pesquisa confirmam a presença de microrganismos predominantes nos ninhos de *A. sexdens*, tais como *L. gongylophorus*, *Bionectria ochroleuca*, *A. flavus*, *T. longibrachiatum*, *F. solani*, leveduras e bactérias gram positivas e gram negativas, os quais vivem em associação simbiótica com essas formigas cortadeiras.

#### 4. Considerações finais

Fungos associados à *Attini* são pouco estudados na Amazônia brasileira devido à dificuldade em identificá-los. Na maioria dos formigueiros, apenas desenvolvem-se estruturas vegetativas, o mesmo ocorrendo em culturas isoladas em laboratório, fato este que dificulta a taxonomia tradicional dos basidiomycetos, a qual é baseada nas características morfológicas do basidioma, estrutura de reprodução destes fungos e, indispensável na identificação ao nível de espécie.

Novos estudos estão sendo desenvolvidos para determinar quem são os

microrganismos associados a estas formigas e sua importância biotecnológica.

#### Divulgação

Este artigo é inédito e não está sendo considerado para qualquer outra publicação. O(s) autor(es) e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico.

#### Referências

Adams, M. D. The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science**. 2000 287: 2185-2195.

Autuori, M. Longevidade de uma colônia de saúva (*Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908) em condições de laboratório. **Ciência e Cultura**, 1950.2: 285-286.

Brandão C. Os Guaranis: Índios do Sul – Religião, Resistência e Adaptação. **Revista de Estudos Avançados**. 1990. 04: 53-90.

Brandão, C. R. F.; Mayhé-nunes, A. J.; Sanhudo, C. E. D. Taxonomia e filogenia das formigas-cortadeiras. In: Della Lucia, T. M. C. (Ed). **Formigas-cortadeiras da bioecologia ao manejo**. Viçosa: Editora UFV. 2011, 27-48.

Brown, J. R.; Mclean, D. M. Observations on Halogens as Bathing Water Disinfectants. **Journal of Applied Microbiology**. 1966. 29 (3): 559–565.

Castelani, A. Viability of mold culture of fungi in distilled water. **Journal Tropical Medicine Hygiene**, 1939. 42: 225.

Chapela, I. H.; Rehner, S. A.; Schultz, T. R.; Mueller, U. G. Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi. **Science**, 1994. 266: 1691-1694.

Currie, C. R.; Mueller, U. G.; Malloch, D. The agricultural pathology of ant fungus gardens. **PNAS**, 1999a. 96: 7998-8002.

Currie, C. R.; Scott, J. A.; Summerbell, R. C.; Malloch, D. Fungus-growing ants use



antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. **Nature**, 1999b. 398: 701-704.

Diniz, A. R.; Andrade, M. J. de; Carvalho, J. G. de; Ramalho, M. A. P.; Bergo, C. L. Avaliação preliminar da resposta do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) à aplicação foliar de molibdênio e adubação nitrogenada em cobertura. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, 1998. 22 (2): 226-231.

Hölldobler, B.; Wilson, E. O. **The ants**. Cambridge, Harvard University Press. 1990. 733 p.

Mayhé-Nunes, A. J. Filogenia de los Attini (Hymenoptera, Formicidae): un aporte al conocimiento de las hormigas fungívoras. **Tese de Doutorado**, Universidad Simón Bolívar, Caracas. 1995. 274 p.

Mueller, U. G. Ant versus fungus versus mutualism: Ant-cultivar conflict and the deconstruction of the attine ant-fungus symbiosis. **American Naturalist**. 2002. 160: 67-98.

Mueller, U. G.; Geraldo, N. Fungus-farming insects: Multiple origins and diverse evolutionary histories. **PNAS**. 2002. 23:15247-15249.

Muchovej, J. J.; Della Lucia, T. M.; Muchovej, R. M. C. *Leucoagaricus weberi* sp. nov. from a live nest of leaf-cutting ants. **Mycology Research**, 1991.95 (11): 1308-1311.

Mueller, U. G.; Schultz, T. R.; Currie, C. R.; Adams, R. M. M.; Malloch, D. The origin of the attine ant-fungus symbiosis. **Quarterly Review Biol.**, 2001. 76: 169-197 p.

North, R. D.; Jackson, C. W.; Howse, P. E. Evolutionary aspects of ant-fungus interactions in leaf-cutting ants. **Tree**, 1997. 12: 386-389.

Pagnocca, F. C.; Carreiro, S. C.; Bueno, O. C.; Hebling, M. J.; Da Silva, O. A. Microbiological changes in the nests of leaf-cutting ants fed on sesame leaves. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, 1996. v. 120, n. 5, 317-320.

Seifert, K. A. *Escovopsis aspergilloides*, a rediscovered hyphomycete from leaf-cutting ant nests. **Mycologia**, 1995. 87 (3): 407-413.

Silva-Pinhati, A. C. O.; Bacci, M.; Hinkle, G.; Sogin, M. L.; Pagnocca, F. C.; Martins, V. G.; Bueno, O. C.; Hebling, M. J. Low diversity within sympatric and allopatric fungal symbiotic with leaf-cutting ants (Attini: Formicidae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 2004. 37: 1463-1472.

Siqueira, C. G. Metabolism of plant polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, 1998. 64 (12): 4820-4822.

Souza, A.Q.L. Potencial Genético e Químico dos endófitos de *Murray paniculata* L. (Jack). **Tese de doutorado**, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil, 2006.128 p.

Stradling, D.J., Powell, R.J. The cloning of more highly productive fungal strains: a factor in the speciation of fungus-growing ants. **Experientia**, 42 (1986), 962-964p.

Weber, J., R., Greer, B., Voight, E., Unusual strength properties of echinoderm calcite related to structure. **Journal Ultrastruct. Research**, 1969. 26: 355-366.

Weber, N.A.. Gardening ants: the Attines. Philadelphia: **The American Philosophical Society**, 1972: 87-115.

Wheeler, W. M. The polymorphism of ants, with an account of some singular abnormalities due to parasitism. **Bulletin American Museum Natural History**. 1907. 23: 1-93.

White, T. J., Brun s, T., Lee, S., Taylor, J. Amplificação e seqüenciamento 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**, 1990.