

VARIABILIDADE GENÉTICA DO FUNGO CULTIVADO POR *Acromyrmex spp* NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL – RESULTADOS PARCIAIS

STOLL, Franciele Elisa¹; DONATTI, Michele Guimarães; SILVEIRA, Júlia de Souza; MARONEZE, Beatriz; PEREIRA, Daniela Isabel Brayer; LOECK, Alci Enimar⁴

¹Ciências Biológicas-UFPEL; ⁴ Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Departamento de Fitossanidade.e-mail:alcienimar@yahoo.com.br

1 INTRODUÇÃO

As formigas cortadeiras dos gêneros *Acromyrmex* e *Atta* estão incluídas dentro do grupo de insetos sociais com maior grau de desenvolvimento e organização. Essas formigas são consideradas herbívoras dominantes na região neotropical (Hölldoblerer;Wilson,1990), sendo dependentes obrigatórias do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* (Mueller et al., 2001). Os benefícios e custos na relação mutualística entre fungos e formigas estão bem definidos. As formigas dependem do fungo como fonte essencial de alimento e, em troca, fornecem a ele substrato adequado para o seu crescimento, proteção contra competidores e patógenos (Mehdiabadi et al., 2006).

O fungo tem sido propagado assexuadamente pelas formigas cortadeiras durante milhões de anos (Chapela et al.,1994).Esse fato pode ser o responsável pela ausência ou dificuldade da formação de estruturas de frutificação observadas no fungo (Mueller et al., 2001). Por isso, sua taxonomia ainda não está claramente definida e aceita entre os especialistas (Borba et al., 2006), embora estudos sugiram que todos os fungos cultivados pelos *Attini* pertençam ao filo *Basidiomycota*.

A identificação laboratorial do *Leucoagaricus gongylophorus* é feita pela presença de hifas estéreis e gongilídeos que são tidos como a principal fonte de nutrientes para as formigas, especialmente para as larvas (Quinlan & Cherrett, 1979).

Diferentes espécies de formigas cortadeiras utilizam distintos substratos para cultivar o seu fungo simbiote, sendo algumas formigas bastante específicas na utilização de mono ou dicotiledôneas. Esta condição indica a possibilidade de existir variabilidade genética entre os fungos que cultivam para seu alimento (Borba et al., 2006).Baseado nesse fato, Borba et al.(2008), formaram 10 grupos de pareamentos de fungos isolados de diferentes espécies de formigas provenientes de quatro regiões do RS e verificaram que as combinações dos isolados de fungos oriundos de *Acromyrmex heyeri* (Santa Maria) x *Atta Sexdens piriventris* (Fortaleza dos Valos) e *A. heyeri* (Pelotas) x *Acromyrmex lundii* (Bento Gonçalves) não foram compatíveis, evidenciando diferenças entre os fungos cultivados pelas formigas. Já Silva-Pinhati et al. (2004) não encontraram variabilidade genética do fungo cultivado por outras espécies de *Acromyrmex* e *Atta* no Estado de São Paulo. Sendo assim, estudos que avaliem as variações genéticas do fungo simbiote no Brasil tornam-se necessários.

Este experimento tem como objetivo isolar o fungo cultivado por formigas das espécies *Acromyrmex heyeri* e *Acromyrmex ambiguus* em quatro regiões distintas do RS e posteriormente comparar, por análise filogenética, a variabilidade genotípica entre os fungos cultivados pelas diferentes espécies de formigas.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

O estudo foi realizado com o fungo cultivado pelas espécies de formigas *Acromyrmex heyeri* e *Acromyrmex ambiguus*. Quatro regiões do Estado do Rio Grande do Sul foram selecionadas: 1-Região Sul (Pelotas), 2- Região da Campanha (Bagé), 3-Região Central (Santa Maria) e 4-Região Centro-Sul (Tapes). As coletas foram realizadas diretamente do ninho retirando-se uma porção do jardim de fungo juntamente com as formigas que ali se encontravam. O material foi armazenado em caixas de acrílico do tipo Gerbox esterilizadas e encaminhadas ao laboratório de Micologia do Instituto de Biologia, UFPel para isolamento. Através de técnicas assépticas, os micélios foram coletados e transferidos para placas de Petri contendo o meio de cultura YNBGC (agar base nitrogênio levedura com glicose e cloranfenicol). Cinco pequenos fragmentos de esponja foram semeados em cada placa de Petri, sendo que para cada amostra coletada de formigueiro, foram utilizadas 60 placas com o meio nutritivo, as quais foram identificadas de acordo com a localidade de coleta. As placas foram mantidas em estufa a 25°C, por aproximadamente dois meses. Após o crescimento de colônias suspeitas do fungo, foram realizados exames diretos corados com lactofenol azul de algodão para visualização de gongilídeos, estruturas características do *Leucoagaricus gongylophorus*. Posteriormente, procedeu-se o repique das colônias fúngicas para placas de Petri contendo meio cultura de manutenção Pagnocca. Com o objetivo de produzir biomassa micelial para extração de DNA e posteriores análises moleculares e filogenéticas, pequenos fragmentos de colônia fúngica de cada isolado obtido, foram transferidos para frascos contendo 100 mL de caldo Sabouraud dextrose e incubados em estufa de agitação orbital a 25°C/120rpm, durante 2 semanas. O micélio obtido foi armazenado em tubos tipo eppendorf e congelado em nitrogênio líquido até a realização das análises moleculares.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Até o presente momento foram coletadas 11 amostras de jardim de fungos, das quais seis foram provenientes de ninhos de *A. heyeri* e cinco de *A. ambiguus*. Em todas as amostras houve o crescimento de um micélio fúngico, cuja característica macroscópica apresentou-se de aspecto algodinoso e de cor branca. Estas características foram também descritas por Silva-Pinhati et al. (2005) e Borba et al. (2006) em seus estudos com basidiomicetos isolados de formigas das espécies *A. crassispinus*, *A. ambiguus*, *A. heyeri* e *A. lundii*. Os gongilídeos foram visualizados como intumescências nas extremidades das hifas, similar ao descrito por Weber (1972). Estas estruturas são consideradas elementos adaptativos à longa existência conjunta entre os fungos e as formigas deste gênero. Apresentam vacúolos ricos em glicogênio, aminoácidos e pequena quantidade de lipídeos que servem como fonte de alimento para as larvas das *Attini* (Mueller et al., 2001). Com base nas características macro e microscópicas o fungo isolado foi identificado preliminarmente como *Leucoagaricus gongylophorus*. Entretanto, a identificação final do fungo por métodos moleculares, assim como o estudo da variabilidade genética, encontram-se em fase inicial, estando as amostras isoladas sendo submetidas a

extração de DNA e realização das reações de PCR (reação em cadeia da polimerase).

4 CONCLUSÃO

O fungo isolado a partir de ninhos de formigas cortadeiras das espécies *A. heyeri* e *A. ambiguus* em quatro regiões distintas do RS apresentam características macro e micromorfológicas do basidiomiceto *Leucoagaricus gongylophorus*.

5 REFERÊNCIAS

BELT, T. The Naturalist in Nicaragua. **J. Murray**, London, 1874.

BORBA, R.S. et al. Crescimento do fungo simbionte de formigas cortadeiras do gênero ***Acromyrmex*** em meios de cultura com diferentes extratos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.3, p.725-730, 2006.

BORBA, R.S.; LOECK, A.E.; BONOW, J. Pareamento de fungos cultivados por diferentes espécies de formigas cortadeiras no Estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, V.38, p. 1214-1219, 2008.

CHAPELA, I.H.; REHNER, S.A.; SCHULTZ, T.R.; MULLER. Evolutionary history of the symbiosis between fungus growing ants and their fungi. **Science**, U.G. 1994 v. 266, p.1691-1694.

DOHERTY, K.R., ZWEIFEL, E.W., ELDE, N.C., McKone, M.J; ZWEIFEL, S.G. 2003. Random Amplified Polymorphic DNA Markers Reveal Genetic Variation in the Symbiotic Fungus of Leaf-Cutting Ants. **Mycologia** 95 : 19-23.

FISHER, P.J; STRADLING, D.J; PEGLER, D.N. 1994. Leaf-cutting ants, their fungus gardens and the formation of basidiomata of *Leucoagaricus gongylophorus*. **Mycologist** 8: 128-131.

FORTI, L.C., PROTTI, A.P. & Ramos. Biologia e comportamento de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae): implicações no seu controle. **Série Técnica IPEF** 13: 103-114, V.M 2000.

HINKLE, G.; WETTERER, J.K.; SCHULTZ, T.R.; SOGIN, M.L. 1994. Phylogeny of the attine ant fungi based on analysis of small subunit ribosomal RNA gene sequences. **Science**, 266:1695-1697.

HÖLLDOBLER, B. & Wilson. The Ants. Cambridge, Massachusetts, **Belknap Press**, E.O. 1990

MEHDIABADI, N.J. et al. Cooperation, conflict, and coevolution in the attine ant-fungus symbiosis. **Behavioral Ecology**, v.17, n.2, p.291-296, 2006.

MONTOYA-LERMA, J., CHACÓN DE U, P., & Manzano, M.R. Caracterización de nidos de la hormiga arriera *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Myrmicinae) em Cali (Colombia). **Revista Colombiana de Entomología** 32(2): 151-158, 2006.

MUCHOVEJ, J.J.; DELLA LUCIA, T.M., MUCHOVEJ, R.M.C. *Leucoagaricus veberi* sp. Nov. from a live nest of leaf-cutting ants. **Mycological Research**, 95:1308-1311, 1991.

MUELLER, U.G., SCHULTZ, T.R., CURRIE, C.R., ADAMS, R.M.M., MALLOCH, D. 2001. The origin of the Attine ant-fungus symbiosis. **Quarterly Review of Biology**. 76:169-1997.

NEI, M. & W.H. Li. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 76:5269-5273, 1979.

PAGNOCCA, F.C., BACCI JR., M., FUNGARO, M.H., BUENO, O.C., HEBLING, M.J., Sant'anna, A., Capelari, M. RAPD analysis of the sexual state and sterile mycelium of the fungus cultivated by the leaf-cutting ant *Acromyrmex hispidus* **falx**. **Mycol.** 105:173-176. Parker, 2001.

QUINLAN, R.J.; CHERRETT, J.M. The role of fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.). **Ecology Entomology**, v.2, n.4, p.151-160, 1979.

RODRIGUES, A. O papel dos microfungos associados aos jardins das formigas *Attini* (Hymenoptera: Formicidae). Tese de doutorado. Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2008.

SILVA-PINHATI et al. Low variation in ribosomal DNA and internal transcribed spacers of the symbiotic fungi of leaf-cutting ants (Attini: Formicidae). **Brasilian journal of Medical and Biological Research** (2004) 37: 1463-1472, 2004.

SILVA-PINHATI, A.C.O. et al. Isolation and Maintenance of Symbiotic Fungi of Ants in the Tribe Attini (Hymenoptera: Formicidae). **Neotropical Entomology**, v.34, n.1, p.1-5, 2005.

WETTERER, J.K., SCHUKTZ, T.R., MEJER, R. Phylogeny of fungus-growing ants (Tribe Attini) Based on mt DNA sequence and morphology. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 9:42-47, 1998.

ZIETKIEWIEZ, E., A. Rafalski & D. Labuda. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSP)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics** 20:176-183, 1994.

WEBER, N. A. **Gardening ants: The Attines**. American Philosophical Society, Philadelphia: v 13, n.9, p. 146, 1972.