

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
INSTITUTO DE SAÚDE E BIOTECNOLOGIA - ISB
CAMPUS MÉDIO SOLIMÕES – COARI
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO
CIENTÍFICA - PIBIC

**LEVANTAMENTO DOS MICRORGANISMOS ASSOCIADOS ÀS
FORMIGAS CORTADEIRAS *Atta sexdens sexdens* E O SEU
POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO**

Bolsista: Diana da Rocha Nepomuceno, FAPEAM

Coari-AM
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
INSTITUTO DE SAÚDE E BIOTECNOLOGIA - ISB
CAMPUS MÉDIO SOLIMÕES – COARI
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO
CIENTIFICA - PIBIC

RELATÓRIO FINAL

PIB-B/0002/2013

**LEVANTAMENTO DOS MICRORGANISMOS ASSOCIADOS AS
FORMIGAS CORTADEIRAS *Atta sexdens sexdens* E O SEU
POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO**

Bolsista: Diana da Rocha Nepomuceno, FAPEAM
Orientadora: Dra. Adriana Dantas Gonzaga

Coari-AM
2014

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, ao grupo de pesquisa “Microrganismos associados a insetos sociais na Amazônia” e aos seus autores. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Esta pesquisa foi financiada pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Amazonas – FAPEAM, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas, Grupo de Pesquisa “Microrganismos associados a insetos sociais na Amazônia”.

Ficha Catalográfica

Nepomuceno, Diana da Rocha

Levantamento dos microrganismos associados as formigas cortadeiras *Atta sexdens sexdens* e o seu potencial biotecnológico. 28 p.

Relatório Final apresentado à Universidade Federal do Amazonas. Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC).

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Dra. Adriana Dantas Gonzaga,

1. Saúvas, 2. Enzimas, 3. Biotecnologia.

RESUMO

Formigas que cultivam fungos pertencem à subfamília Myrmicinae, cujos membros caracterizam-se por serem simbioses obrigatórios de um fungo utilizado como alimento. Algumas enzimas proteolíticas produzidas pelo fungo são ingeridas, concentradas pelas formigas e depois excretadas através do líquido fecal para otimizar a utilização do substrato vegetal. Tendo esse contexto, teve como objetivo investigar o potencial dos fungos associados às formigas cortadeiras *Atta sexdens sexdens* bem como o seu potencial biotecnológico. Para executar esses experimentos, as formigas cortadeiras foram coletadas município de Coari-Amazonas e encaminhadas para o laboratório de microbiologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), onde foi realizado o isolamento, purificação, cultivo e identificação dos microrganismos presentes nas formigas cortadeiras. Os microrganismos isolados foram conservados por meio do método de Castelani e do glicerol a 15%, onde a solução de esporos foi armazenada e conservada no freezer. Os microrganismos associados às formigas em estudo, não foram identificados utilizando análises macroscópicas e microscópicas, sendo assim, houve necessidade de se fazer uma análise molecular realizando a extração de DNA e a amplificação dos fragmentos ITS do rDNA dos isolados, de forma a permitir uma posterior etapa de sequenciamento e possível identificação dos gêneros dos isolados obtidos neste trabalho. Teste de produção enzimática destes isolados foi realizado, acrescentando ao meio de cultura, Carboximetilcelulose (CMC) para testar a produção de enzima celulase pelos isolados. Os resultados não apresentaram a presença de produção de celulases, pois não houve formação de halos gerados pelos isolados. Sendo assim, concluiu-se que temos uma ferramenta promissora que serve de instrumento para futuros estudos de diagnósticos biotecnológicos, tanto enzimáticos, como moleculares.

Palavras-chaves: Saúvas, Enzimas, Biotecnologia.

ABSTRACT

Fungus-growing ants belong to the subfamily Myrmicinae, whose members are characterized by obligatory symbionts of a fungus used as food. Some proteolytic enzymes produced by the fungus are ingested, concentrated by ants and then excreted via the fecal fluid to optimize the use of vegetable substrate. Having this context, aimed to investigate the potential of fungi associated with leaf-cutting ant *Atta sexdens sexdens* and its biotechnological potential. These experiments, leaf-cutter ants from Coari Amazon were collected and sent to the microbiology laboratory of the Universidade Federal do Amazonas (UFAM), where the isolation, purification, cultivation and identification of microorganisms present in the leaf-cutting ants was performed. The isolated microorganisms were preserved by the method of Castelani and 15% glycerol, where the spore solution was stored and kept in the freezer. The microorganisms associated with ants in the study were not identified using analysis macroscopic and microscopic, so it was necessary to make a molecular performing analysis DNA extraction and amplification of the rDNA ITS fragments isolated in order to allow later sequencing and possible identification of the genera of the isolates. Production of enzyme testing of these isolates was performed by adding to the culture medium, carboxymethylcellulose (CMC) to test for production of cellulase enzyme isolated. The results did not show the presence of cellulase production, as there was no formation of halos generated by the isolates. To conclude that we have a promising tool that serves as an instrument for future studies of biotechnological diagnostics, both enzymatic as molecular.

Keywords: Ants, Enzyme Biotechnology.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Processo de fragmentação dos insetos em cabeça, tórax e abdômen (A) e Placas de isolamento de fungos (B).....20
- Figura 2.** Isolados de fungos associados à *Atta sexdens sexdens*, armazenados conforme o método Castellani (A) e do glicerol a 15% (B).....21
- Figura 3.** Gel de agarose-TAE 1%, utilizado para quantificar o DNA das amostras. Utilizou-se o marcador de 50pb, porque de acordo com o que o fabricante diz, suas bandas atuam como padrões de quantificação de DNA.....22
- Figura 4.** Amplificação das regiões ITS do rDNA dos isolados fúngicos associados a formiga cortadeira. Legenda: (M) Marcador 1Kb.....23
- Figura 5.** Formação de halo. Placa sem a formação de halo (A) e com a formação de halo (B).....24

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	9
1. REFERENCIAL TEÓRICO	10
1.1 FORMIGAS CORTADEIRAS.....	12
1.2 ASSOCIAÇÃO DE FUNGOS COM AS FORMIGAS.....	13
1.3. ENZIMAS.....	13
1.3.1 Celulase.....	13
2. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 COLETA DOS INSETOS.....	15
3.2 ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS.....	15
3.3 OBTENÇÃO DE COLÔNIAS MONOSPÓRICAS.....	16
3.4 CONSERVAÇÃO DOS MICRORGANISMOS.....	17
3.4.1 Método de Castellani (1939).....	15
3.4.2 Método do Glicerol a 15%.....	15
3.5 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS.....	18
3.6 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS.....	18
3.7 AMPLIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS REGIÕES ITS DO RDNA.....	19
3.8 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS.....	20
3.9 PRODUÇÃO DE ENZIMAS: MEIO PARA O CRESCIMENTO FÚNGICO E INDUÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	21
3.10 CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	22
3.11 DETERMINAÇÃO ENZIMÁTICA QUALITATIVA.....	23
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
CONCLUSÃO.....	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23

INTRODUÇÃO

Trabalhos envolvendo formigas cultivadoras de fungo, concluíram que sua evolução é muito mais abrangente do que se esperava, sendo que, em algumas espécies de *Attini* inferiores, a transmissão do fungo simbiote não ocorre apenas por “transmissão vertical” (intraespecífica), mas também, por “transmissão lateral” (interespecífico) (MULLER et al., 1998, 2001; GREEN et al., 2002; ANTUNES et al., 2005).

Uma grande maioria de fungos cultivados pelas formigas da tribo *Attini* pertencem a dois gêneros, *Leucocoprinus* e *Leucoagaricus* (tribo *Leucocoprinae*, Família Lepiotaceae) (ANTUNES et al., 2005), com exceção do gênero *Apterostigma*, a qual cultiva um fungo da família Tricholomataceae (CHAPELA et al., 1994).

Uma das dificuldades na identificação do fungo simbiote se deve ao fato de que a fase sexuada não é muito comum, pois as formigas limitam o seu desenvolvimento a uma fase vegetativa (ANTUNES et al., 2000), resultando na ausência das estruturas de frutificação e dificultando sua taxonomia. No entanto, alguns casos já foram observados (BONONI et al., 1981; MUCHOVEJ et al., 1991; CRUZ; BATISTA-FILHO, 1993; PAGNOCCA et al, 2001).

Após as análises das descrições morfológicas de basidiomas fúngicos realizadas anteriormente, Singer (1986) renomeou o fungo das formigas *Attini* como *Leucoagaricus gongylophorus*, denominação esta, aceita atualmente. Como todas essas descrições foram baseadas em aspectos morfológicos e muitas vezes, em ninhos mortos ou em processo de regressão, a suspeita de que tais estruturas poderiam pertencer a contaminantes nunca foi completamente descartada.

No entanto, Pagnocca et al., (2001), descreveram a ocorrência da fase sexuada do fungo em um ninho natural de *Acromyrmex fallax* Santschi comprovando pela primeira vez, através de técnicas moleculares (RAPD), tratar-se do *Leucoagaricus gongylophorus* e não de um eventual contaminante.

O fungo produz estruturas especializadas chamadas gongilídeos, as quais constituem um entumescimento da porção terminal das hifas, ricos em lipídeos e carboidratos (QUILAN; CHERRET, 1979; ANTUNES et al., 2000) e que são fornecidos diretamente na boca das larvas, pelas operárias que as alimentam.

As relações simbióticas nutricionais em várias ordens de insetos desenvolveram-se independentemente com diferentes tipos de microrganismos. Alguns grupos de insetos desenvolveram sistemas de cultivo onde o simbionte fúngico é mantido externamente servindo de alimento para o inseto (ectossimbiose). Outros grupos mantêm relações mais íntimas carregando os simbiontes internamente (endossimbiose), esses simbiontes podem ainda estar presentes no lúmen do intestino na forma livre, os extracelulares, ou dentro de células especializadas, os intracelulares.

Esse trabalho teve como objetivo investigar o potencial dos fungos associados às formigas cortadeiras *Atta sexdens sexdens*, bem como o seu potencial biotecnológico. Realizando o isolamento, purificação, identificação e conservação dos fungos associados as formigas cortadeiras, e assim investigar a produção de enzimas extracelulares como a celulase pelos microrganismos isolados a partir das cortadeiras.

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 FORMIGAS CORTADEIRAS

As formigas tem uma distribuição bem ampla no planeta, com isso, afirma-se que elas evoluíram no aspecto ecológico. Elas possuem certa capacidade de preencher nichos bem diferentes e é dominante em relação á biomassa animal. A evolução histórica das formigas demonstra que elas apresentam uma pequena taxa de extinção em relação aos demais grupos de animais, pois as formigas tem facilidade de se adaptarem a mudanças climáticas. Alguns dos fatores que contribuem para esta habilidade das formigas são o seu comportamento eusocial, marcado pela divisão de trabalho entre as castas reprodutivas e estéreis, e o zelo para com a prole. Esse comportamento de organização social das formigas deu condições favoráveis para que surgisse o forrageamento em grupo, o qual apresenta uma maior eficiência para a obtenção de alimento e para a defesa desses insetos (MILTON, 2004).

As cortadeiras ocasionam muitos danos à agricultura brasileira, pois atacam quase todas as plantas cultivadas. Estão distribuídas por todas as regiões do país e

atuam de forma predadora durante o ano todo (GRÜRZMACHER et al., 2002). As formigas cortadeiras da tribo *Attini*, são consideradas como pragas agravantes a agricultura nacional, elas demonstram ter preferência por apenas algumas espécies vegetais, e estas são desfolhadas de forma constante, em contraste, outras mesmo sendo abundantes e próximas ao seu ninho não sofrem nenhum ataque pelas formigas. Formigas dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, cortam o vegetal de sua preferência e carregam os fragmentos até os formigueiros, no qual estes pedaços de vegetais são utilizados para a cultura do fungo *Leucoagaricus gongylophorus*, do qual se alimentam (BORBA et al. 2006).

As formigas que fazem parte da tribo *Attini* encontram-se no ápice da subfamília denominada *Myrmicinae*, onde os membros se distinguem pelo fato de fazerem simbiose com um fungo que é utilizado como fonte de alimentação. O fungo é cultivado na parte interna dos ninhos chamadas de “jardins de fungo” ou “painéis subterrâneos” (GONZAGA, 2012). O fungo tem produção de gongilídeos que são estruturas especializadas que formam certo inchaço na parte final das hifas, são ricos em carboidratos e lipídeos (QUILAN; CHERRET, 1979; ANTUNES et al., 2000), o qual são transportados pelas operárias até a boca das larvas.

1.2 ASSOCIAÇÃO DE FUNGOS COM AS FORMIGAS

A associação formiga-fungo é muito antiga, datando de 45-60 milhões de anos (MÜLLER et al., 2001), porém até os dias atuais ainda não foi totalmente esclarecida. Alguns autores afirmam que, o fungo serve como principal fonte de alimento das operárias adultas, bem como das larvas (BIGI et al., 2004), porém, as larvas e adultas preferem o conjunto de gongilídeos (estáfido), ao invés da hifa para sua alimentação (BIGI et al., 2004). Esta escolha pode ser entendida, devido ao acúmulo de nutrientes presentes no gongilídeo, o qual disponibiliza para as formigas uma concentração maior de nutrientes de fácil assimilação (ANGELI-PAPA; EYME, 1985).

Por outro lado, Bass & Cherret (1995) concluíram que o fungo participa como alimento para as operárias apenas na ordem de 9%, sendo o restante obtido das seivas das plantas durante o corte. Algumas enzimas proteolíticas produzidas pelo fungo são ingeridas, concentradas pelas formigas e depois excretadas através do líquido fecal para otimizar a utilização do substrato vegetal (BOT et al., 2001).

Utilizando análises enzimáticas, Silva (2000) concluiu que, as formigas servem de “reservatório” de pectinases para o fungo e este, por sua vez, contribui com a fonte

nutricional e as enzimas necessárias para a manutenção das formigas, caracterizando, assim, uma relação mutualística. Tal associação se justifica também pela capacidade metabólica do fungo de converter celulose e outros polímeros vegetais em produtos que poderiam ser metabolizados pelas formigas (D'ETORRE & HEINZE, 2001).

1.3. ENZIMAS

Depois dos antibióticos, as enzimas constituem o mais importante grupo de produtos biológicos de necessidade humana. Inúmeros processos industriais, sobretudo nas áreas da biotecnologia industrial, ambiental e de alimentos, utilizam a tecnologia das enzimas em várias de suas etapas (PANDEY, 1999).

Enzimas produzidas por microrganismos apresentam vantagens quando comparadas com aquelas originárias de animais ou vegetais, pois possui um custo menor de produção, esta produção é possível em um grande nível industrial e proporcionam um espectro de particularidades físico-químicas bem amplas (OLIVEIRA et al., 2006). Enzimas que apresentem um mesmo perfil de ação no substrato podem demonstrar atividade ótima em pH, temperatura e em diferentes concentrações iônicas, o qual solicita a seleção de enzimas que sejam aptas às condições que serão empregadas. Contudo, tornar conhecido novas fontes microbianas, e que não sejam tóxicas ao homem tem chamado bastante atenção, pois possibilitam que haja diferentes sistemas com enzimas nas quais não são provenientes de plantas ou animais, e podem assegurar aos mais diversos procedimentos em escala industrial o suprimento de enzimas (ALVES et al., 2002).

Atualmente, as enzimas hidrolíticas são as mais utilizadas nos processos industriais, sendo aplicadas na degradação de várias substâncias naturais. De forma geral, elas são usadas em grande escala nas indústrias têxteis (amilase, celulase, pectinase, oxidorreductase), de detergentes (celulase, lipase, protease, oxidorreductase), alimentícia (celulase, lactase, lipase, pectinase, protease, oxidorreductase), de papel (lipase, oxidorreductase, xilanase), e de couro (lipase, protease) (KIRK, 2002).

Devido à sua vasta aplicação nesses setores industriais, assim como no campo farmacêutico, as proteases formam o grupo mais estudado das enzimas que catalisam uma reação de hidrólise. Por outro lado, as amilases e celulases, comumente utilizadas nas indústrias de amido, têxtil e detergente, representam o segundo maior grupo de enzimas. Enquanto que as celulases, lipases pectinases e proteases podem ser utilizadas eficientemente nos processos de limpeza de fibras de algodão (OLIVEIRA et al., 2006)

1.3.1 Celulase

O setor industrial utiliza as celulases para diversos fins, principalmente no descoramento e amaciamento de tecidos; formulações de detergentes domésticos e industriais; ajuda na extração de óleos, pigmentos, essências, alcalóides e amido; produção de sucos; preparação de alimentos infantis, produtos dermatológicos, estimulantes de digestão, rações animais, produtos estimuladores de ensilagem, adjuvante para o malte da cerveja e no tratamento de lixo orgânico (KUBICEK et al., 1993).

A Celulase é um complexo de enzima que tem capacidade de fazer hidrólise de celulose, até moléculas de glicose, e esta até pequenos oligossacarídeos, é oriunda de fungos, bactérias e outros seres vivos. Ela é um homo-polissacarídeo de forma linear tendo em sua composição glicose unidas por ligações glicosídicas β -1,4, sendo o elemento fundamental da parede celular de vegetais. Exibe mais de 10.000 resíduos de β -glicose anidra. Cadeias de celulose geram as fibrilas essenciais, composta por duas regiões diferentes, a cristalina e a amorfa, na qual esta última é bem suscetível a hidrólise. (MORETTI, 2010).

Esse complexo enzimático geralmente está localizado em secreções de microrganismos e só são liberados apenas quando se faz necessário seu crescimento em celulose, assim como as outras enzimas extracelulares de hidrólise, mas podem também ser encontradas no sistema digestivo de certas espécies de gastrópodes. Uma boa parte da produção de celulase em escala industrial é feito por fungos filamentosos (KUBICEK et al., 1993).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA DOS INSETOS

A coleta das formigas cortadeiras (*Atta sexdens*, *sexdens*) foi realizada no Bairro Vale da Benção no município de Coari-Amazonas. Inicialmente, realizou-se o reconhecimento do formigueiro e em seguida iniciou-se o processo de escavação. Posteriormente, foi realizada a coleta das formigas, e estas foram alocadas em recipientes próprios para conservação *in vivo*, encaminhadas para o Instituto de Saúde e

Biotecnologia, Campus da Universidade Federal do Amazonas e conduzidas para o laboratório de microbiologia.

3.2 ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS

Para o isolamento, os insetos foram postos no refrigerador por 2 min para deixá-los “adormecidos”. Em seguida, com o auxílio de um bisturi, as formigas foram divididas em cabeça, tórax e abdômen, além dos insetos completos (com todas as estruturas). Posteriormente transferiu-se os fragmentos obtidos para placas de Petri contendo meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA). As formigas inteiras também foram colocadas em placas, porém era uma em cada placa. As culturas foram armazenadas em estufa tipo B. O.D (*Biological Oxygen Demand*) a 28°C. Após sete dias, realizou-se a repicagem, que é a transferência de fragmentos de ágar contendo hifas para novas placas contendo meio de cultura BDA.

3.3 OBTENÇÃO DE COLÔNIAS MONOSPÓRICAS

Com a finalidade de se obter colônias de fungo puras (separadas), ou seja, colônia de um único conídio realizou-se a purificação dos isolados e posteriormente a diluição seriada seguida de plaqueamento de acordo com o protocolo de Azevedo e Costa (1973).

Preparou-se a solução de Tween 80 (20 mL de Tween 80 + 50 mL de água destilada autoclavada), na qual serve para separar os conídios, e pipetou-se 1 mL desta solução em microtubos (Eppendorf de 1,5 mL) e com auxílio de alça com agulha de platina foi feita uma raspagem de leve nos isolados e postos nos microtubos, foi homogeneizado em agitador vortex (Phoenix). Para determinar a concentração de células da suspensão preparada, utilizou-se a Câmara de Neubauer, na qual de forma microscópica torna possível a contagem de células por unidade de volume de uma suspensão.

Foi feito cálculos estimativos do número de conídios e posteriormente realizaram-se as diluições seriadas em solução salina. Após as diluições, uma alíquota de 10 µL das suspensões 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} foram inoculados no centro da placa de Petri com meio de cultura BDA e espalhados com ajuda da alça de Drigalski. As suspensões foram plaqueadas em duplicata e armazenadas a 28 °C em estufa B.O.D. Depois de três dias, selecionou-se uma colônia oriunda de um único conídio (cultura pura) e transferiu-

se para placas com o mesmo meio de cultura, armazenadas no mesmo tipo de estufa a 28 °C até seu crescimento e esporulação da colônia para posterior conservação.

3.4 CONSERVAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Os fungos foram armazenados em duplicatas, utilizando duas metodologias diferentes: método de Castellani (1939) e do método do glicerol a 15%, descritas a seguir.

3.4.1 Método de Castellani (1939)

Neste método, 10 a 15 fragmentos de BDA (± 5 mm de diâmetro) contendo micélio são submersos em frascos de vidro (ex. frascos de penicilina), contendo 20 mL de água destilada autoclavada. Os frascos são vedados e mantidos à temperatura ambiente.

3.4.2 Método do Glicerol a 15%

Nesta metodologia, solução de esporos é armazenada e conservada em freezer. A solução foi preparada utilizando 20 mL de glicerina diluída em 80 mL de água destilada. A solução foi posta em um recipiente de vidro, vedada e encaminhada para autoclave por 15 min. Após o resfriamento da solução, pipetou-se 500 μ l da mesma em microtubos e 1200 μ l de água destilada. Em seguida, foi feito em triplicata a conservação dos fungos isolados, retirando 30 pequenos pedaços de BDA com micélio, sendo 10 fragmentos em cada microtubo. Os microtubos foram vedados e acondicionados em geladeira.

3.5 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Para a identificação dos isolados, realizaram-se observações macroscópicas da colônia (crescimento, coloração, textura e pigmento difuso) e observações microscópicas das estruturas vegetativas (hifas) por meio de microcultivos. Para este método, retiram-se três pequenas porções de micélio, as quais são posicionadas com a mesma distância entre si, sobre meio BDA em placa de Petri. A seguir, uma lamínula autoclavada é depositada e pressionada sobre cada um dos pequenos inóculos.

As placas foram vedadas com filmito e submetidas à incubação em estufa B.O.D. a 28 °C, até o início do crescimento e da esporulação do fungo sobre a lamínula.

Após o crescimento, as lamínulas foram retiradas cuidadosamente do meio de cultura (com o auxílio de uma pinça autoclavada) e posicionadas sobre uma lâmina de microscopia contendo uma gota de corante lactofenol azul algodão (Sigma). A visualização de microestruturas (vegetativas e reprodutivas) foi realizada utilizando-se a objetiva de 40X (aumento total de 400X).

3.6 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS

Os isolados foram cultivados em tubos tipo Falcon, contendo 20 mL de meio Batata-Dextrose (BD) autoclavado (2% dextrose (p/v); q.s.p. 1000 mL de caldo de cozimento de batata inglesa) durante 3 dias, mantida em estufa B.O.D. a 28 °C. Após esse período, o micélio foi separado do meio de cultura por filtração a vácuo e lavado por três vezes com água destilada autoclavada. O micélio foi armazenado a -20 °C até o momento da extração de ácidos nucleicos.

A massa micelial foi triturada em cadinho de porcelana com 1mL de tampão de extração (8mL de Tris HCl 1M; 2mL de EDTA 0,5M ; 4mL SDS 10%; 2mL NaCl 5M; 24mL de água destilada autoclavada); a massa pastosa proveniente da trituração foi transferida para microtubos de 2mL, incubou-se em banho seco a 60 °C por 1h:15min, e após foram submetidos à centrifugação a 10.000 rpm durante 10 minutos. Coletou-se o sobrenadante, transferindo-o para microtubos vazios, adicionando-se em seguida, 500µL de fenol equilibrado. Agitou-se suavemente o tubo, o qual foi submetido a nova centrifugação, nas mesmas condições já descritas. Coletou-se o sobrenadante, transferindo-o para microtubos vazios, adicionando-se em seguida, 700µL de clorofane (fenol:clorofórmio, 1:1). Agitou-se suavemente o tubo, o qual foi submetido a nova centrifugação. Coletou-se novamente o sobrenadante, transferindo-o para novos microtubos, adicionando-se em seguida, 700µL de clorofil (clorofórmio: álcool isoamílico, 24:1). Agitou-se suavemente, centrifugou-se, coletou-se o sobrenadante, transferindo-o novamente para um novo microtubo, ao qual adicionou-se 50µL de NaCl 3M e 700µL de álcool etílico absoluto a -20°C. Inverteu-se o tubo várias vezes, até a observação da precipitação dos ácidos nucleicos. Centrifugou-se o tubo mais uma vez, descartando-se, em seguida, o sobrenadante. Ao pellet, adicionou-se 500µL de álcool etílico a 70%, descartando-o em seguida. Adicionou-se álcool etílico absoluto (-20°C), descartando-o em seguida. Os tubos foram invertidos sobre papel absorvente, durante aproximadamente 1h. Ao pellet, foram adicionados 200µL de tampão TE (10mM Tris HCl; 1mM EDTA). Os tubos foram agitados para solubilização dos ácidos nucleicos e

em seguida, transferidos para a geladeira (4°C), onde foram mantidos até a quantificação do DNA.

O DNA foi quantificado em gel de agarose-TAE (1%) corado com brometo de etídeo juntamente com o marcador de 50pb (LGC), o qual apresenta bandas expressando quantidades específicas de DNA. O gel foi submetido a uma corrente 12 de 100V e após a corrida, as bandas foram visualizadas em transiluminador UV, sendo o gel fotodocumentado.

Após a quantificação, as amostras foram diluídas para 50ng/μL e 100ng/μL utilizadas nas reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para a amplificação dos fragmentos de ITS do rDNA.

3.7 AMPLIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS REGIÕES ITS DO RDNA

A amplificação do ITS1-5.8S-ITS2 rDNA foi realizada por meio da técnica de PCR (FUNGARO, 1998), onde foram utilizados os *primers* ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3').

As reações apresentaram um volume final de 50μL (40ng de DNA molde; 0,4M de cada *primer*; 0,2mM de cada dNTP; 7,4mM de MgCl₂; 2U da enzima Taq DNA polimerase e 1X tampão da enzima). O volume foi completado com água ultrapura autoclavada e em todas as reações, foi utilizado um controle negativo com água, em substituição ao DNA molde.

Os microtubos (volume total de 0,2mL) foram submetidos ao termociclador (Applied Biosystems), em uma sequência composta pelas seguintes etapas: desnaturação inicial (94°C por 5 minutos), seguida de 25 ciclos compostos por uma etapa de desnaturação (94°C durante 30 segundos), uma etapa de anelamento (55°C durante 30 segundos) e uma etapa de extensão (72°C durante 30 segundos), seguida de uma etapa final de 72°C durante 7 minutos e por fim.

Após a reação de PCR, 5μL da reação foram aplicados em gel de agarose-TAE (1,2%) corado com brometo de etídeo, tendo como marcador, o *ladder* 1Kb (LGC). Após a corrida, as bandas foram visualizadas em transiluminador de luz UV e o gel foi fotodocumentado. Os fragmentos de ITS obtidos na amplificação foram purificados utilizando-se o kit GFX PCR *Purification* (Qiagen).

3.8 PRODUÇÃO DE ENZIMAS: MEIO PARA O CRESCIMENTO FÚNGICO E INDUÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para o crescimento fúngica e indução da atividade enzimática, será utilizada a meio de cultura contendo Carboximetilcelulose (CMC). O meio de cultura mínimo sólido CMC foi preparado com a seguinte composição: KCO_2 – 3,75 g; NaNO_2 - 4,5 g; CMC-7,5g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,375 g; -Ágar – 11,25 g; ZnSO_4 - 0,0075g; Água destilada - 750 mL; KH_2PO_4 – 1,125g; FeSO_4 .

Para o preparo do meio, os reagentes foram diluídos em água destilada e para indução da enzima de interesse do estudo, foi adicionado o substrato carboximetilcelulose – CMC. O pH para detecção de celulase foi de 5,0. Após a solução foi levada para autoclave por 15min a 120°C. Percorrido o tempo determinado verteu o meio em placas de Petri e estas foram acondicionadas na geladeira.

3.9 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Os cultivos foram realizados de acordo com a técnica descrita por Hankin and Anagnostakis (1975), na qual se retira três discos de BDA com micélio, de cerca de 10mm, e transfere para uma placa com meio de cultura contendo CMC de forma que cada disco fique equidistante. O diâmetro do halo de degradação enzimático e do crescimento micelial são medidos e comparados.

3.10 DETERMINAÇÃO ENZIMÁTICA QUALITATIVA

Decorrido o período de incubação, a superfície do ágar foi borrifada com solução reveladora, para a determinação da atividade enzimática. A solução reveladora utilizada foi a solução de vermelho Congo a 0,1 % (celulases). Após 15 minutos, a solução reveladora foi descartada, e uma solução de NaCl foi adicionada sobre a superfície do ágar, para descoloração e assim visualização de formação de halos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

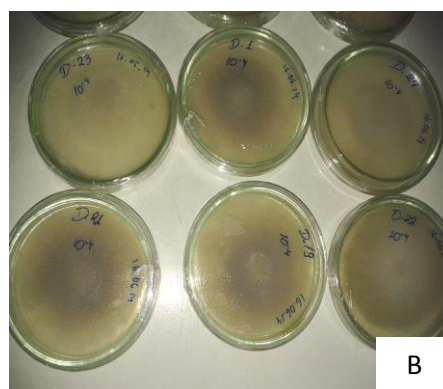
4.1 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE FUNGOS

Obteve-se como resultado 12 isolados de fungos associados a formigas cortadeiras *Atta sexdens sexdens*. Estes fungos foram considerados morfologicamente iguais, mesmo sendo oriundos de partes diferentes das formigas como cabeça, tórax e abdômen, além do inseto com todas as suas estruturas (Figura1). Este tratamento apresentou eficiência para o isolamento dos fungos. As condições empregadas para o isolamento tais como: meio de cultura, temperatura, pH, entre outros, foram favoráveis igualmente para todos os microrganismos.

Figura 1 - Processo de fragmentação dos insetos em cabeça, tórax e abdômen (A) e Placas de isolamento de fungos (B).



Fonte: Nepomuceno, D. R



Fonte: Nepomuceno, D. R

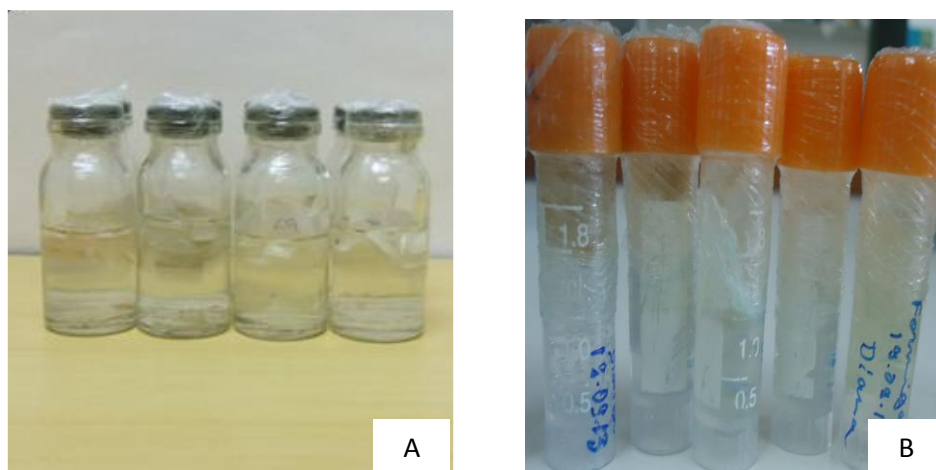
Outro evento observado foi à obtenção de colônias puras oriundas de um único conídio (colônia monospórica), obtendo assim, colônias morfologicamente semelhantes. Com tudo, considera-se que, embora a eficiência de isolamento dos fungos tiver sido elevada, o mesmo não se aplica à diversidade, que foi considerada baixa ao analisar as culturas de forma macroscópica (crescimento, coloração, textura e pigmento difuso).

4.2 ARMAZENAMENTO DOS FUNGOS ISOLADOS

Os 12 isolados obtidos foram armazenados conforme descrito no item 3.4.1. Na Figura 2, é possível observar o armazenamento dos fungos pelo método de Castellani

(CASTELLANI, 1939) e do método do glicerol a 15% descritos nos itens 3.4.2 e 3.4.3 respectivamente.

Figura 2 - Isolados de fungos associados à *Atta sexdens sexdens*, armazenados conforme o método Castellani (A) e do glicerol a 15% (B).



Fonte: Nepomuceno, D. R

Fonte: Nepomuceno, D. R

4.3 CARACTERIZAÇÃO MACRO E MICROSCÓPICA DOS FUNGOS ISOLADOS

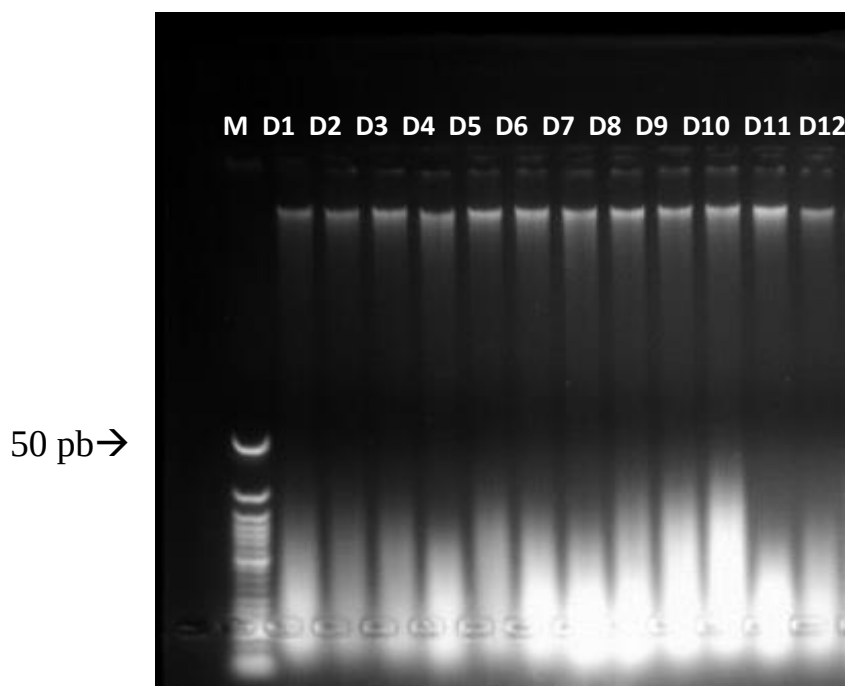
Os fungos foram analisados por meio das características macroscópicas e microscópicas, no qual o aspecto macromorfológico das colônias dos isolados foi examinado a olho nu, com atenção especial ao crescimento micelial, à textura e à coloração da colônia. Todos os isolados apresentaram crescimento micelial rápido, coloração branca, textura veludada e pegajosa. O aspecto micromorfológico das estruturas vegetativas e reprodutivas foi examinado sob microscopia de luz, em aumento total de 400X, e foi observada presença hifas, de conidióforo sem os conídios, e conídios de forma dispersa.

4.4 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS E AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS DO rDNA

A extração dos ácidos nucleicos dos 12 fungos isolados de cortadeiras permitiu a obtenção de quantidades variáveis de DNA total das amostras com bandas visíveis em gel de agarose-TAE 1% (Figura 3). Todas as amostras apresentaram bandas visíveis, a quantidade de DNA variou entre 50 a 100 ng/μL.

Todos os isolados apresentaram DNA quantificável nas condições empregadas, tendo sido utilizados nas reações de amplificação, diretamente, sem procedimentos de diluição para ajuste de concentração, a qual foi utilizada para que todas as amostras atinjam a concentração de 20ng/μL de DNA total.

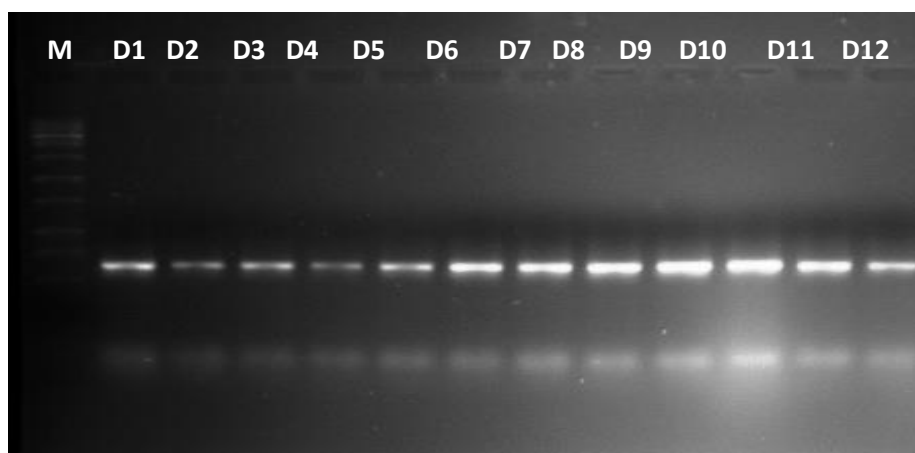
Figura 3 - Gel de agarose - TAE 1%, utilizado para quantificar o DNA das amostras.



Fonte: Nepomuceno, D. R

Após a quantificação, as amostras foram submetidas à PCR, como já foi descrito em outro item. Após as reações, as amostras amplificadas foram aplicadas em gel de agarose-TAE 1,2% (Figura 4) corado com brometo de etídeo. Todos os isolados foram amplificados, ou seja, as amostras na qual as bandas de DNA foram observáveis no gel de quantificação também foram amplificadas. Todas as amostras amplificadas foram purificadas para posterior envio ao laboratório do Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM) para o sequenciamento.

Figura 4 - Amplificação das regiões ITS do rDNA dos isolados fúngicos associados a formiga cortadeira. Legenda: (M) Marcador 1Kb.

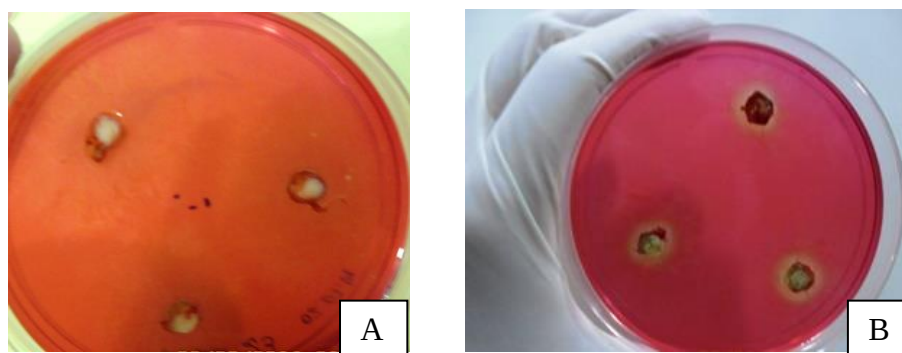


Fonte: Nepomuceno, D. R

4.5 DETERMINAÇÃO ENZIMÁTICA

Os resultados das reações enzimáticas positivas são identificados pela formação de um halo translúcido, ao redor de cada disco, para celulasas. Dos 12 isolados analisados para a produção da enzima celulase, apenas o isolado D9 apresentou formação do halo (Figura 5). Porém, de acordo com os cálculos realizados para determinar a média do diâmetro micelial e do halo formado, observou-se que o fungo D9 degradou celulose só para seu crescimento, pois a média do halo que foi de 14 mm foi inferior a média da colônia 39,83 mm.

Figura 5 - Formação de halo. Placa sem a formação de halo (A) e com a formação de halo (B).



Fonte: Nepomuceno, D. R

Fonte: Nepomuceno, D. R

CONCLUSÃO

As formigas cortadeiras geralmente são conhecidas por cultivarem uma associação mutualística com fungos, no qual são utilizados como fonte de alimentação. E por meio deste trabalho, foi possível realizar o isolamento dos fungos associados às formigas cortadeiras. Contudo, não foi possível se obter a identificação destes isolados por meio da microscopia. Pois, com a técnica utilizada não se obteve a visualização da estrutura reprodutiva dos fungos em análise, houve apenas a visualização da presença de conídios e hifa. Com outras técnicas ou com a modificação da utilizada (ex.: usar apenas ágar + água para estressar o fungo) para expressá-los podendo obter a estrutura reprodutiva.

Utilizando os fragmentos do DNA fúngico amplificados, será possível dar procedimento ao sequenciamento, que permitirá a tentativa de identificação dos isolados, em nível de gênero. O teste enzimático não foi satisfatório, pois os fungos degradaram celulose apenas para seu crescimento e não para produção da enzima celulase. Apenas um isolado produziu celulase, mas a média do halo formado foi inferior à média do micélio. Porém, testes para a produção de outras enzimas de interesse industrial como a pectinase e protease poderão ser analisados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, M. H.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; PORTO, A. L. F.; MILANEZ, A. I. **Screening of *Mucor* spp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease.** Braz. J. Microbiol., v. 33, n. 4, p. 225-230, 2002.

ANGELI-PAPA, J.; EYME, J. **Le champignon cultivés par les fourmis attine.** *Ann. Sci. Nat. Bot. Paris*, 7: 103-129, 1985.

ANTUNES, E. C.; GUEDES, R. N. C.; DELLA LUCIA, T. M. C.; SERRÃO, J. E. **Sub-lethal effects of abamectin suppressing colonies of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus*.** *Pest Management Science*, 56: 1059-1064.2000.

ANTUNES, E. C.; Guedes, R. N. C.; DELLA LUCIA, T. M. C.; SERRÃO, J. E. **Abamectin-driven alterations on queen ovarios of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae).** *Sociobiology*, 45: 163-172. 2005.

AZEVEDO, J. L.; COSTA, S. O. P. **Exercícios práticos de Genética.** São Paulo. Editora nacional. 1973.

BASS, M.; CHERRETT, J. M. **Fungal hyphae as a source of nutrients for the leaf-cutting ant *Atta sexdens*.** *Physiol. Entomol.*, 20:1-6. 1995.

BIGI, M. F. M. A.; TORKOMIAN, V. L. V.; GROOTE, S. T. C. S.; HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; FERNANDES, B. P.; VIEIRA, C.; SILVA, M. F. G. F. **Activity of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) and ricine against the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus*.** *Pest Management Science*, 60: 933-938. 2004.

BONONI, V.L.R.; TRUFEM, S.F.B.; GRANDI, R.A.P. **Fungos macroscópicos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, depositados no Herbário do Instituto de Botânica.** *Rickia* 9: 37-53. 1981.

BORBA, R.S; LOECK, A.E; BANDEIRA, J.M; MORAES, C.L; CENTENARO, E.D. **Crescimento do fungo simbiote de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* em meios de cultura com diferentes extratos.** Santa Maria: *Ciência Rural*, v.36, n.3, p.725-730, 2006.

BOT, A. N. M.; CURRIE, C. R.; HART, A. G.; BOOMSMA, J. J. **Waste management in leaf-cutting ants.** *Ethology Ecology and Evolution*, 3: 225-237. 2001.

CASTELLANI, A. **The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water.** *J. Tropical Medicine. Hyg.* 42: 225-226. 1939.

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*, 266: 1691-1694. 1994.

CRUZ, B. P. B.; BATISTA FILHO, A. **Manifestação da forma perfeita de *Leucoprinus gongylophorus* (Moller) Heim em saueiro artificial de *Atta sexdens rubropilosa* Forel.** *Arq. Inst. Biol.* 60(1): 66-69. 1993.

D'ETORRE, P.; HEINZE, J. **Sociobiology of slave-making ants.** *Acta Ethologica*, 3:67-82. 2001.

DINGLE, J.; Teid, W. W.; SOLOMONS, G. L. **The enzymic degradation of pectin and other polysaccharides.** *J. Suci. Food Agric.*, 4: 149-155 p. 1953.

ERTHAL JUNIOR, M. **Enzimas digestivas presentes no intestino da formiga cortadeira *Acromyrmex subterraneus* Forel, 1893 (Hymenoptera: Formicidae) e no seu fungo mutualístico.** Universidade Estadual do Norte Fluminense: Darci Ribeiro, 2014.

FUNGARO, M. H. P.; VIEIRA, M. L. C. **Aplicações da PCR em Ecologia Molecular.** In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Coord.). *Ecologia Microbiana*. Jaguariúna: Embrapa, cap. 8, p. 205-228. 1998.

GONZAGA, A. D. **Antagonismo de bactérias endofíticas de plantas da Amazônia contra o jardim de fungos associados às formigas cortadeiras *Atta sexdens* Hymenoptera (Formidae: Attini).** Universidade Federal do Amazonas, 2012.

Green, A. M; Mueller, U. G.; Adams, R. M. M. **Extensive exchange of fungal cultivars between sympatric species of fungus-growing ants.** *Molecular Ecology*. Oxford, v.11, n. 2. 191-195 p. 2002.

GRURZMACHER, D.D.; LOECK, A.E; Medeiros, A.H. **Ocorrência de formigas cortadeiras na região da depressão central do estado do rio grande do sul.** Santa Maria: Ciência Rural, v. 32, n. 2, p.185-190, 2002.

HANKIN, L. ; ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid medi for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, Ilawrence, v.67, p.597-607, 1975.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. **Industrial enzyme applications.** Curr. Opin. Biotechnol., v. 13 n. 4, p. 345-351, 2002.

KUBICEK, C. P.; MESSNER, R.; GRUBER, F.; MACH, R. L.; KUBICEK-PRANZ, E. M. **The Trichoderma reesei cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus.** Enzyme and Microbial Technology, v. 15, p. 90-99, 1993.

MORETTI, M. M. S. **Isolamento de fungos termofílicos produtores de celulasas, xilanases e ferulil esterase para bioconservação de bagaço de cana de açúcar em açúcares fermentescíveis.** Rio Claro: 2010.

MUELLER, U. G.; REHNER, A.; SCHULTZ, T. R. **The evolution of agriculture ants.** Science, 281: 2034-2038. 1998..

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., 76: 169-197. 2001.

MUCHOVEJ, J. J.; DELLA LUCIA, T. M.; MUCHOVEJ, R. M. C. **Leucoagaricus weberi sp. nov. from a live nest of leaf-cutting ants.** Mycol. Res., 95 (11): 1308-1311. 1991.

NIELSEN, R. I.; OXENBØLL, K. **Enzymes from fungi: their technology and uses.** Mycologist. v. 12, n.3, p. 69-71, 1998.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS JÚNIOR, A. F. **Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia central, Amazonas, Brasil.** Campinas: Ciênc. Tecnol. Aliment., out.-dez. 2006.

PAGNOCCA, F. C. et al. **RAPD analysis of the sexual state and sterile mycelium of the fungus cultivated by the leaf-cutting ant *Acromyrmex hispidus fallax*.** Mycological research. Cambridge. V. 105. n. 2. 173-176 p. 2001.

PANDEY, A; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. *Curr. Sci.*, v. 77, n. 1, p. 149-162, 1999.

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, p. 151-160, 1979.

SILVA, A. **Participação do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* na produção de enzimas intestinais da formiga *Atta sexdens*.** Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada), Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista. 2000.

SINGER, R. **The Agaricales in modern taxonomy.** In: Fisher, P. J.; Stradling, D. J.; Pegler, D. N. (1994) **Leaf cutting ants, their fungus gardens and the formation of basidiomata o *Leucoagaricus gongylophorus*.** *Mycologist*, 8 (3): 541-546. 1986.

SOUZA, D.J.; DELLA LUCIA, T. M. C.; ERRARD, C.; Richard, F-J.; LIMA, E. R. **Behavioural and chemical studies of discrimination processes in the leaf-cutting ant *Acromyrmex laticeps nigrosetosus* (Forel, 1908).** *Braz. j. boil.*, 66(3): 863-871. 2006.