



Universidade Estadual de Santa Cruz

Programa de Pós Graduação em Biologia e Biotecnologia de Microrganismos

Mestrado em Biologia e Biotecnologia de Microrganismos

**PRODUÇÃO DE POLISSACARIDASES PELO FUNGO
SIMBIONTE DAS FORMIGAS CORTADEIRAS DE
GRAMÍNEAS *Atta capiguara* e *Acromyrmex balzani***

Adriany Leão Lopes

**ILHÉUS, BAHIA
2010**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Adriany Leão Lopes

**PRODUÇÃO DE POLISSACARIDASES PELO FUNGO
SIMBIONTE DAS FORMIGAS CORTADEIRAS DE
GRAMÍNEAS *Atta capiguara* e *Acromyrmex balzani***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual
de Santa Cruz, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Biologia e
Biotecnologia de Microrganismos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Aline Silva

**ILHÉUS, BAHIA
2010**

Adriany Leão Lopes

**PRODUÇÃO DE POLISSACARIDASES PELO FUNGO
SIMBIONTE DAS FORMIGAS CORTADEIRAS DE
GRAMÍNEAS *Atta capiguara* e *Acromyrmex balzani***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual
de Santa Cruz, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Biologia e
Biotecnologia de Microrganismos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Aline Silva

Ilhéus, Bahia, 2010.

Dra. Aline Silva

UESC- Universidade Estadual de Santa Cruz
(Orientadora)

Dr. José Danival de Souza

UFV- Universidade Federal de Viçosa
(Membro Externo)

Dr. Jacques Charles Hubert Delabie

UESC- Universidade Estadual de Santa Cruz
(Membro Interno)

Dedicatória

À minha filha,
Maria Alice, meu presente de Deus,
dedico.

Agradecimentos

Deus, por me conceder o privilégio de viver.

À minha família amada, por me confortar sempre com a certeza do amor eterno.

Ao meu marido, Lucas Aman, meu grande incentivador.

À minha orientadora professora Aline Silva, pela confiança, fé no ensino e paciência que me foi dedicada com tanta doçura e gentileza, e pelo exemplo de conduta e profissionalismo impecáveis.

À querida amiga Cíntia, pela amizade construída e guardada sempre no coração.

À Gilvia, Katyúcia e Lucas, pelo convívio e carinho diários.

Aos colegas da minha turma pelos risos compartilhados.

Aos professores e funcionários do PPBBM, pelo apoio prestado.

Ao professor Jacques Delabie e a todos os queridos amigos do Laboratório de Mirmecologia da Ceplac, por me apresentarem ao mundo das formigas e da pesquisa.

SUMÁRIO

	Resumo	VIII
	Abstract	X
1	AS FORMIGAS CORTADEIRAS	1
1.1	AS FORMIGAS CORTADEIRAS DE GRAMÍNEAS	6
1.1.1	<i>Atta capiguara</i>	7
2.1.2	<i>Acromyrmex balzani</i>	10
2	INTERAÇÕES METABÓLICAS	12
3	OBJETIVO E JUSTIFICATIVA	15
4	MATÉRIAS E MÉTODOS	16
4.1	Modelo biológico utilizado	16
4.2	Preparo das amostras	16
4.3	Isolamento do fungo simbiote <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	17
4.4	Cultivo do fungo para indução das polissacaridases	17
4.5	Determinação das atividades de polissacaridases	17
4.6	Análises estatísticas	18
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	19
5.1	<i>Atta capiguara</i>	19
5.2	<i>Acromyrmex balzani</i>	23
6	CONCLUSÕES.....	26
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

FIGURAS

FIGURA 1 - Unidades de polissacarídeos determinadas nos jardins de fungo da formiga cortadeira *Atta capiguara*..... 19

FIGURA 2 - Unidades de polissacarídeos determinadas em isolados de *Leucoagaricus gongylophorus* cultivado pela formiga cortadeira *Atta capiguara*..... 20

FIGURA 3 - Unidades de polissacarídeos determinadas em jardins de fungo da formiga cortadeira *Acromyrmex balzani*..... 24

FIGURA 4 - Unidades de polissacarídeos determinadas em isolados de *Leucoagaricus gongylophorus* cultivado pela formiga cortadeira *Acromyrmex balzani*..... 24

TABELAS

TABELA 1 - Polissacarídeos detectados no jardim de fungo e no fungo isolado (*Leucoagaricus gongylophorus*) de ninhos de *Atta capiguara*..... 20

TABELA 2 - Polissacarídeos detectados no jardim de fungo e no fungo isolado (*Leucoagaricus gongylophorus*) de ninhos de *Acromyrmex balzani*..... 25

**PRODUÇÃO DE POLISSACARIDASES PELO FUNGO SIMBIONTE DAS
FORMIGAS CORTADEIRAS DE GRAMÍNEAS *Atta capiguara* e *Acromyrmex
balzani***

Adriany Leão Lopes (mestranda)*
Profa: Aline Silva (orientadora)
Universidade Estadual de Santa Cruz
*e-mail: adrianyleao@hotmail.com

RESUMO

Habitantes apenas da Região Neotropical, as formigas cortadeiras pertencem à tribo Attini e são representadas pelos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*. Essas formigas mantêm, no interior de seus ninhos, uma simbiose obrigatória com um fungo basidiomiceto. Ambos os gêneros possuem espécies consideradas pragas em áreas agrícolas, por forragearem material vegetal para o cultivo de seu fungo simbiote. A relação de simbiose entre o fungo e a formiga parece está baseada na troca de nutrientes e enzimas pelos simbiotes.

Neste estudo avaliou-se a produção de polissacaridases pelo fungo *Leucoagaricus gongylophorus*, simbiote das formigas cortadeiras *Atta capiguara* e *Acromyrmex balzani*, espécies que cortam e coletam gramíneas. Para tanto, este parâmetro foi determinado em amostras do jardim de fungo, além de culturas isoladas deste fungo. O isolamento do fungo foi feito por métodos padrões, sendo este em seguida cultivado em meio contendo amido, de maneira a induzir a produção das polissacaridases. Após o crescimento do fungo por até 30 dias, as enzimas polissacaridásicas pectinase, amilase, xilanase e celulase foram determinadas no meio de cultivo. As atividades foram estimadas através da determinação dos açúcares redutores, produzidos a partir da degradação destes substratos, tal estimativa sendo feita através do método do ácido dinitrosalicílico. Os resultados obtidos permitiram caracterizar o perfil metabólico do fungo cultivado por estas formigas cortadeiras com relação à degradação de polissacarídeos, fornecendo dados para o estudo de aspectos bioquímicos da interação ecológica entre estes simbiotes. Estes dados também fornecem subsídios para futuros

trabalhos que visem o controle de formigas cortadeiras por meio da interferência no metabolismo de polissacarídeos, essencial para esta associação inseto-fungo.

Palavras-chaves: Formiga cortadeira, fungo simbiote, enzimas.

**PRODUÇÃO DE POLISSACARIDASES PELO FUNGO SIMBIONTE DAS
FORMIGAS CORTADEIRAS DE GRAMÍNEAS *Atta capiguara* e *Acromyrmex
balzani***

Abstract

Inhabitants only the Neotropics, leafcutter ants belong to the tribe Attini and are represented by genres *Atta* and *Acromyrmex*. These ants have, within their nests, a symbiosis with a fungus fungus mandatory. Both genres have species considered pests on agricultural areas, by forragearem plant material for growing your fungus symbiont. The symbiotic relationship between fungus and Ant seems is based on Exchange of nutrients and enzymes by symbionts.

In this study, the polysaccharidases production by the fungus *Leucoagaricus gongylophorus*, symbiont of ants *Atta capiguara* and *Acromyrmex balzani*, species that cut and collect grass, was evaluated. Therefore, this parameter was determined in samples of fungus garden, and cultures of this fungus were isolated. The isolation of the fungus was done by standard methods, which was then grown in medium containing starch, in order to induce the production of polysaccharidases. After growth of the fungus for thirty days, polysaccharidases enzymes pectinase, amylase, xylanase and cellulase were determined in the culture medium. The activities were estimated by determining the reducing sugars, produced from the degradation of these substrates. This estimate was done using the acid dinitrosalicílico. The results obtained allowed to characterize the metabolic profile of the fungus cultivated by these ants in relation to the polysaccharides degradation, providing data for the study of biochemical aspects of the ecological interaction between these symbionts. These data also provide insights for future work that aim the control of ants through interference with the polysaccharides metabolism, essential for this insect-fungus association.

Key words: Cutting ant, fungus symbiont, enzymes.

1. AS FORMIGAS CORTADEIRAS

Assim chamados os gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, as formigas cortadeiras apresentam como uma de suas características o fato de cortarem e coletarem exclusivamente folhas frescas (Cherrett et al., 1989), que são oferecidas como substrato para o cultivo do seu fungo simbiote. Taxonomicamente agrupados na tribo Attini, subfamília Myrmicinae, Família Formicidae (Hölldobler e Wilson, 1990), algumas espécies de formigas cortadeiras são consideradas entre as maiores pragas agrícolas das Américas, causando enormes prejuízos em áreas de pastagem e reflorestamento (Della Lúcia, 1993).

No Brasil, são descritas cinco espécies de *Atta* como pragas de grande impacto econômico (*Atta bisphaerica*, *A. capiguara*, *A. cephalotes*, *A. laevigata* e *A. sexdens*) e nove espécies de *Acromyrmex* (*A. crassispinus*, *A. heyeri*, *A. lundii*, *A. laticeps*, *A. lobicornis*, *A. octospinosus*, *A. rugosus*, *A. striatus*, *A. subterraneus*) (Forti e Boaretto, 1997)

Na tribo a que pertencem as formigas cortadeiras estão agrupados 12 gêneros (*Atta*, *Acromyrmex*, *Trachymyrmex*, *Sericomyrmex*, *Apterostigma*, *Cyphomyrmex*, *Mycetarotes*, *Mycetagroicus*, *Mycetophylax*, *Mycetosoritis*, *Mycocepurus*, *Myrmecocrypta*) (Mueller et al., 2001), todas com o hábito de cultivarem, no interior de seus ninhos, um fungo com o qual mantém uma relação simbiótica.

A tribo Attini possui distribuição geográfica restrita às Américas, sendo encontrada dos Estados Unidos até a Patagônia, na Argentina, não ocorrendo no Chile, em algumas ilhas do Caribe e no Canadá (MARICONI, 1970). As atíneas apresentam características morfológicas e comportamentais que possibilitam sua divisão em um grupo derivado e um grupo básico (Mueller et al., 2001). As atíneas basais, em que o gênero *Mycocepurus* parece ser o mais primitivo (Della Lúcia, 1993), apresentam ninhos pequenos com poucas câmaras ou painéis, indivíduos com pouco ou nenhum dimorfismo e o hábito de forragearem material vegetal recém caído (galhos, folhas e flores) e carcaças e fezes de insetos. As espécies mais derivadas, por sua vez, apresentam ninhos com um maior número de câmaras, muitos indivíduos por ninho, polimorfismo acentuado e o hábito de forragearem

material vegetal fresco, como flores, sementes e folhas (Cherrett et al., 1989). Para esse grupo, o gênero *Atta* parece ser o mais avançado (Della Lucia, 1993).

Quanto ao fungo simbiote cultivado pelas cortadeiras, estudos indicam ser este um basidiomiceto (Weber, 1966). Porém, sua identificação dificultada pela raridade da emissão do basidioma (Borba et al., 2008), estrutura de reprodução importante na classificação a nível de espécie destes fungos. Estes fungos estão agrupados nos gêneros *Leucoagaricus* e *Leucocoprinus* (Agaricales: Basidiomycota: Lepiotaceae: Leucocoprinae), salvo exceções como, por exemplo, o gênero *Apterostigma* que cultiva Tricholomataceae e *Cyphomyrmex* que cultiva fungos leucocoprináceos, fungos que se apresentam como leveduras e não na forma de micélica (Brandão, 2007).

O fungo cultivado pelas formigas cortadeiras é o *Leucoagaricus gongylophorus* Singer, 1986 como mostra os estudos moleculares realizados por Silva-Pinhati et al., 2004. Esses resultados afirmam ser o mesmo fungo cultivado pelas 11 espécies de formigas cortadeiras analisadas.

Dentro dessa relação simbiótica entre as formigas cortadeiras e seu fungo, o fungo é beneficiado com a manutenção de um ambiente ótimo para seu crescimento onde temperatura, umidade (Erthal et al., 2004), pH (que é mantido em torno de 5,0 devido às secreções produzidas pela glândula metapleurial das operárias) (Barbosa, 2004) e enquanto recursos alimentares são sempre mantidos pelas formigas no nível ideal. Além disso, as formigas realizam a disseminação do fungo na natureza, quando revoam carregando pellets do fungo na cavidade infrabucal e os utilizam na formação de novos ninhos (Hölldobler e Wilson, 1990).

Quanto aos benefícios para as formigas, estas são beneficiadas pelo fungo com a degradação dos biopolímeros vegetais (Della Lúcia, 1993) e a produção de enzimas digestivas, principalmente polisacaridases, que tornam possível o acesso das formigas aos nutrientes contidos no material vegetal (Silva et al., 2003). O fungo ainda é capaz de transformar os compostos secundários das plantas, muitos deles tóxicos para as formigas, em substâncias palatáveis, aumentando assim a gama de espécies vegetais a serem coletadas e favorecendo a manutenção das formigas nos habitats neotropicais (Weber, 1979).

A disseminação do fungo simbiote ocorre durante o vôo nupcial, quando fêmeas e machos alados saem em revoada. Durante este processo, que ocorre em diferentes períodos do ano em função das espécies de formigas cortadeiras (Della

Lucia, 1993), a fecundação ocorre durante o vôo nupcial, onde vários machos podem fecundar fêmeas de diferentes colônias (Weber, 1979), favorecendo a combinação gênica e dispersão de cada espécie (Della Lucia, 1993).

As fêmeas reservam os espermatozoides numa estrutura interna presente em seu gáster, chamada espermateca (Caetano et al., 2002) e os utilizam ao longo da vida para fecundar seus óvulos. Após a cópula, machos e fêmeas retornam ao solo. As fêmeas, agora fecundadas e liberadas de suas asas, buscam locais sem vegetação para iniciar a escavação de uma pequena câmara (20 a 30 cm de profundidade). Geralmente cada fêmea forma sua própria colônia que tende a permanecer monogínica (Della Lucia, 1993). Os machos, por sua vez, morrem após o vôo nupcial.

Na nova câmara, a rainha realiza a postura de ovos tróficos que servem de alimento para o fungo trazido por ela do ninho de origem, na cavidade infrabucal. Segundo Della Lúcia (1993), essa fase inicial de fundação do ninho é marcada por intenso trabalho da rainha, que desempenha tarefas como: cuidado com o inóculo inicial de fungo, autolimpeza, desova (ovos tróficos e reprodutivos), alimentação (de si mesma e da colônia) e cuidados com a prole.

A partir de 60 dias do estabelecimento da colônia, as operárias começam a emergir e assumir seu papel na divisão de tarefas. Elas passam a realizar as diferentes atividades, como, cuidado com o fungo e com a prole, limpeza e manutenção geral do ninho e mais tarde, forrageamento (Della Lucia, 1993).

A coleta e o preparo do material vegetal a ser incorporado pelo fungo são realizados após emergirem as primeiras operárias que cortam as folhas frescas em pequenos fragmentos, descontaminam a superfície foliar usando o processo de maceração e deposição do fluido fecal contendo enzimas digestivas (Martin e Martin, 1970). Esta descontaminação ocorre graças à presença, na saliva das operárias, de antibióticos produzidos por bactérias do grupo dos actinomicetos, e que estão associados à cavidade infrabucal das formigas (Currie e Stuart, 2001), além de um antibiótico produzido pela glândula metapleurálica da própria formiga (Caetano, 2007).

Durante a deposição do fluido fecal contendo enzimas digestivas (Martin e Martin, 1970) o processo de pré-degradação é iniciado, fazendo com que os polímeros foliares tornem-se mais facilmente acessíveis ao fungo. Após os cuidados iniciais com o material vegetal, as operárias realizam a inoculação de pequenos fragmentos de hifas (Weber, 1979), que irão se desenvolver formando uma esponja

esbranquiçada chamada jardim de fungo. No interior do ninho, o jardim de fungo fica alojado em câmaras especiais (câmaras de fungo) onde as operárias procuram manter temperatura em cerca de 25^oC e pH em torno de 5,0 (Erthal et al., 2004), além de otimizarem o crescimento do fungo, limpando os esporos contaminantes e retirando os micélios infectados (Borba et al., 2006). As operárias realizam ainda cortes nas regiões exauridas do fungo, com objetivo de estimularem uma maior produção de gongilídeos (Borba et al., 2006). Essas estruturas fúngicas, (gongilídeos) são hifas especiais que surgem nas extremidades de crescimento e que armazenam carboidratos usados diretamente como fonte de nutrientes para as formigas adultas e também pelas larvas (Moeller, 1893).

O fungo, depois de desenvolvido, torna-se fonte direta de nutrientes solúveis para a colônia fornecendo glicose, trealose, proteínas, aminoácidos livres e lipídeos às formigas (Martin et al., 1969).

Além do fornecimento de nutrientes, a simbiose também envolve a produção de enzimas pelo fungo e seu armazenamento no trato intestinal das formigas. Um exemplo é a presença de xilanase e celulase de origem fúngica (Silva, 2000) no fluido fecal das operárias. Já algumas amilases, podem ser produzidas pela própria formiga, pelo fungo ou outros microrganismo presentes no ninho (Erthal et al., 2004).

A troca de enzimas e nutrientes vem sendo muito estudada por diversos pesquisadores, que demonstraram ser essa a base da relação simbiótica entre as formigas cortadeiras e seu fungo cultivado (Silva, 2000).

As formigas cortadeiras mantêm, além da simbiose com seu fungo cultivado, outras importantes interações ecológicas com diferentes microrganismos que habitam o interior do ninho sendo que uma delas parece coexistir há mais de 50 milhões de anos (Currie et al., 2003). Trata-se de um especializado fungo parasita do gênero *Escovopsis* presente na esponja fúngica. Esse parasita é transmitido de maneira horizontal, ou seja, através da circulação das operárias de um ninho para outro e é capaz de reduzir a produção de biomassa do jardim, podendo levar toda colônia à morte (Currie et al., 2003).

Em contrapartida, actinomicetos são encontrados associados à cutícula das operárias, produzindo antibióticos muito eficientes contra o fungo parasita (Currie et al., 2003). Assim como o fungo simbiote, os actinomicetos são transmitidos verticalmente através do inóculo carregado pela fêmea alada na formação dos novos ninhos.

O próprio fungo simbiote é capaz de secretar substâncias inibidoras de microrganismo, como por exemplo, ácido fenilacético que reduz o crescimento bacteriano, ou o ácido D-3 hidrodecanóico que inibe o desenvolvimento de esporos de outros fungos (Barbosa, 2004).

Em seu ambiente natural, as formigas cortadeiras desempenham importante papel ecológico, atuando como dispersoras secundárias de sementes, pois as carregam para áreas próximas a colônia, onde o solo é fértil. Além disso, as formigas promovem a fertilização e aeração do solo, a ciclagem de nutrientes (Barbosa, 2004) e facilitam a penetração das raízes no solo, favorecendo o crescimento de matas secundárias (Forti, 1985).

1.1 AS FORMIGAS CORTADEIRAS DE GRAMÍNEAS

Algumas espécies de formigas cortadeiras são oligófagas, mostrando ter uma preferência restrita pelo tipo de material vegetal a ser coletado. As espécies polífagas por sua vez, cortam e coletam uma grande diversidade de espécies vegetais. Dentre as formigas cortadeiras de folhas presentes no Brasil, seis espécies cortam preferencialmente monocotiledôneas e as demais preferem cortar dicotiledôneas. Pelo menos cinco espécies cortam ambos os tipos foliares (Castellani et al., 2007).

De acordo com sua preferência de corte, as formigas irão apresentar, segundo Boareto (2000), características distintas em relação à morfologia, comportamento, construção dos ninhos e manejo do material vegetal coletado. Ainda de acordo com a autora, todas essas características devem ser levadas em consideração no momento da elaboração e manejo das técnicas de controle, em especial de iscas tóxicas para o controle de espécies pragas.

As iscas tóxicas comerciais vendidas atualmente são produzidas em forma de pellets e sua formulação é feita a partir de um substrato atrativo (polpa cítrica desidratada e peletizada) e um princípio ativo tóxico (Ramos e Forti., 2007). A eficiência dessas iscas em relação às formigas que cortam folhas de dicotiledôneas já foi comprovada em diferentes estudos de campo (Della Lucia, 2003) porém sua eficácia no controle de formigas cortadeiras de monocotiledôneas ainda é muito questionável (Ramos e Forti., 2007). Muitos são os relatos de devolução ou não carregamento dos pellets por estas formigas (Castellani et al., 2007), fato esse que pode ser explicado pela falta de atratividade dessas formigas pela polpa cítrica.

1.1.1 *Atta capiguara*

Também conhecida como “Saúva Parda”, a espécie *Atta capiguara* apresenta preferência, quase exclusiva, por forragear gramíneas, o que faz desta espécie uma importante praga de pastagem (Forti, 1985). Descrita em 1944, essa espécie de formiga cortadeira desempenha importante papel ecológico quando em seu ambiente natural, promovendo a aeração e fertilização do solo, dispersando sementes e facilitando a penetração das raízes. Porém, desde década de 60, devido à ação humana, grandes áreas de monoculturas tem se estabelecido, substituindo a vegetação nativa e favorecendo a fixação da *Atta capiguara* como praga agrícola (Forti, 1985).

Dentre os danos causados por essa formiga, destacam-se: a redução dos pastos, infestação do pasto com ervas daninhas, empobrecimento do solo, competição e agressão aos bovinos e grandes prejuízos em áreas de cana-de-açúcar e outros cultivares. Além dos danos diretos causados com o corte das folhas, as saúvas também impedem o crescimento das gramíneas por efeito mecânico, já que, para escavação das câmaras de fungo, uma grande quantidade de terra é retirada e acumulada na área externa ao ninho (Forti, 1985).

Para manutenção de seu fungo simbiote, as formigas cortadeiras coletam grandes quantidades de material vegetal e *Atta capiguara* pode cortar e transportar, em média, 72,5 kg de gramínea/colônia/ano. Em áreas de pasto com uma média de 13 ninhos por hectare, é impraticável a criação de bovinos, já que as formigas entram em competição com o gado pelas forrageiras (Forti, 1985).

Seus ninhos apresentam algumas características distintas de outras espécies de saúva como o fato de possuir um pequeno número de câmaras de fungo (Forti, 1985), com formato oval e base plana (Moreira et al., 2007), e estas serem localizadas separadas umas das outras e também pela separação da panela de lixo (Forti, 1985). Esta separação espacial das câmaras de lixo sugere que *Atta capiguara* apresenta maior especialização que as demais espécies de formigas cortadeiras já que com isto o nível de contaminação no jardim de fungo por microrganismos da panela de lixo é menor (Castellani et al., 2007).

Os ninhos de saúva parda são construídos em locais de grande insolação, com profundidade média de 5,85 m (Moreira et al., 2007) e fora da projeção

aparente, que lhes confere maior proteção contra os inimigos naturais (Ramos & Forti., 2007). Os túneis no interior de seus ninhos podem medir cerca de 7cm de largura e 1,8 cm de altura (Moreira et al., 2007).

Apesar da preferência por cortar material vegetal fresco, no inverno *A. capiguara* coleta também material vegetal seco, já que a vegetação diminui em quantidade e qualidade nesse período do ano (Forti, 1985). Ao contrário de outras espécies de saúva, *Atta capiguara* apresenta alta atividade de forrageamento em períodos de temperatura e umidade limitantes e suas trilhas de forrageamento são extensas e numerosas (Forti, 1985).

Durante o forrageamento, esta espécie corta e carrega grandes fragmentos foliares e não há diferença entre as formigas que desempenham as tarefas de cortar e coletar (Castellani, 2007).

Em relação à seletividade do material vegetal a ser coletado, algumas espécies de gramíneas parecem apresentar especial atratividade para *Atta capiguara*, entre elas o capim imperial, capim pangola, e capim Jaraguá e ainda, cana-de-açúcar, grama batatais, entre outros (Ramos e Forti., 2007). De modo geral, plantas com menor teor de substâncias secundárias repelentes e substâncias tóxicas para o fungo simbiote (Ramos e Forti., 2007) são mais susceptíveis ao ataque de formigas cortadeiras (Forti, 1985). Além disso, os teores de água e nutrientes também influenciam na escolha, pelas formigas, da espécie vegetal a ser cortada.

O tratamento dado ao material vegetal também é diferenciado em *A. capiguara*. Os fragmentos são perfurados no sentido de suas nervuras, raspados e lambidos e o fungo é inoculado exatamente nesse ponto, onde também há deposição do fluido fecal (Castellani et al., 2007).

Segundo Castellani et al. (2007), o cultivo do fungo simbiote de *A. capiguara* em laboratório mostra-se mais eficiente quando é acrescido extrato de algumas espécies de gramíneas ao meio de cultura (fato esse que promove maior produção de gongilídeos). Ainda de acordo com a autora, as condições ideais para manutenção desse fungo em laboratório são pH entre 6,0 e 7,5 e temperatura entre 23^o a 26^oC.

A saúva parda é uma formiga cortadeira cuja ocorrência só foi registrada no Brasil e no Paraguai. No Brasil é encontrada em áreas abertas do cerrado brasileiro, estando seus registros restritos aos estados de SP, MG, MS, GO (Ramos, 2005). De

acordo com Forti & Ichinose (1993) há relatos atuais da presença dessa formiga também no estado do Paraná.

Em áreas de plantio de cana-de-açúcar, o dano econômico causado por essa espécie de formiga cortadeira é muito relevante (Forti, 1985). Para Amante (1972) a perda na produção de açúcar pode chegar a 383,5 kg de açúcar/há e a clareira aberta pelas formigas dentro de uma área de cultivo pode chegar a 290m².

Com o aumento nas áreas de pastagem no Brasil, estima-se que o crescimento das áreas geográficas de abrangência de *Atta capiguara* será ainda maior (Ramos e Forti., 2007), aumentando a necessidade de novos estudos na busca de uma maior eficácia dos métodos de controle, em especial as iscas tóxicas. Estudos mostram que iscas confeccionadas com 10% a 30% da polpa cítrica substituída por matéria seca ou 50% de extrato de cana-de-açúcar em sua composição apresentam maior aceitação por parte das operárias de formigas cortadeiras de gramínea (Ramos e Forti., 2007).

Na busca por iscas tóxicas granuladas cuja matriz seja mais atrativa, Boareto *et al.* (2003) realizaram testes com diferentes açúcares e edulcorantes artificiais. Nesse trabalho os autores analisaram a atratividade das substâncias: sacarose, frutose, amido solúvel, rafinose, maltose, lactose, sorbose, celobiose, arabinose, xilose, glicose, galactose, raminose, arabinose, melizitose, sacarina e ciclamato (5,0% p/v). Posteriormente, estudaram-se soluções de maltose, xilose, sacarose, frutose e glicose a 5,0%, 7,5%, 10,0% e 20,0% p/v. Os resultados foram negativos para todas as substâncias e concentrações testadas, mostrando ser ineficiente seu uso como atrativo nas iscas comerciais usadas no controle de *Atta capiguara*.

1.1.2 *Acromyrmex balzani*

No Brasil, o gênero *Acromyrmex* é representado por 20 espécies e 9 subespécies (Zanetti et al., 2003) que estão presentes em todos os estados do país e são comumente encontradas em campos naturais, cerrado e áreas de pasto (Gonçalves, 1961). Alguns destes táxons são considerados pragas agrícolas em áreas de monoculturas, pastagem e de reflorestamento (Zanetti et al., 2003).

Também chamadas quenquéns, estas formigas apresentam polimorfismo acentuado entre os indivíduos do mesmo ninho e as operárias maiores são usadas na taxonomia (Gonçalves, 1961).

Em relação à arquitetura, os ninhos do gênero *Acromyrmex* apresentam estruturas mais simples, quando comparados aos ninhos de *Atta*. Nas espécies cortadeiras de gramíneas, observa-se ninhos pouco profundos, com área externa formada de terra solta e palha ou fragmentos vegetais, as câmaras internas estão em menor número, com formato oval, base plana e a câmara de lixo em forma cônica, os túneis que ligam as painéis são bem numerosos e estreitos e estão dispostos de maneira radial (Moreira et al., 2007).

Acromyrmex balzani é uma espécie de formiga cortadeira cujos ninhos são encontrados em campos naturais e em áreas de pasto, onde cortam preferencialmente gramíneas (Gonçalves, 1961).

Seus ninhos possuem câmaras com cerca de 2m de profundidade, na forma elipsóide (Moreira et al., 2007), localizadas na projeção de terra solta. Externamente, apresentam um cone (olheiro) formado de gramínea seca, uma porção de terra solta (resultado da escavação no interior do ninho) e partes do lixo (Pimenta et al., 2007).

Quando comparada com o outro gênero de formigas cortadeiras, *Acromyrmex balzani* apresenta ninhos com pequenas dimensões e população bastante reduzida (Poderoso et al., 2007), porém com desenvolvida divisão de tarefas entre os membros da colônia. Isso inclui algumas tarefas observadas exclusivamente na espécie, como medir e cortar folhas e realizarem corte em dupla (Castellani et al., 2007).

Essas formigas são consideradas pragas agrícolas apenas quando o número de ninhos por hectare é elevado, caso contrário, desempenham apenas seu

importante papel ecológico, como por exemplo aerando, fertilizando o solo e reciclando matéria orgânica (Poderoso et al., 2007).

As espécies de formiga cortadeira apresentam padrões de forrageamento diferenciados, seguindo padrões de horários (geralmente do entardecer à noite quando as temperaturas são mais amenas). Para *Acromyrmex balzani*, Poderoso et al. (2007) verificaram pico para essa atividade entre 14:00 e 15:00 hs decaindo até às 18:00 hs em trilhas não muito largas marcadas por feromônios, sem a presença de trilhas físicas (Pimenta et al., 2007).

A preferência de *A. balzani* pelo corte de algumas espécies vegetais foi verificada por Pimenta e colaboradores (2007), onde foi possível observar maior frequência de corte em capim brachiaria (*Brachiaria decumbens*), capim-marandu (*Brachiaria brizantha*), capim pé-de-galinha (*Eleosine indica*), grama batatais (*Paspalum notatum*) e capim amargoso (*Digitaria insularis*) nos estudos realizados no estado do Goiás.

Em laboratório, estudos mostram que a adição de extratos de algumas espécies de gramíneas como os capins Tifton e Pangola aceleram o crescimento do fungo simbiote de *Acromyrmex balzani* (Castellani et al., 2007).

Durante o corte do material foliar, Castellani et al. (2007) verificou haver em *Acromyrmex balzani*, a ingestão da seiva extravasada, fato que também ocorre nas formigas cortadeiras de dicotiledôneas.

Assim como ocorre em *Atta capiguara*, o índice de devolução ou não carregamento das iscas formicidas é alto, o que torna esse método de controle ainda pouco eficaz contra essas espécies de formigas cortadeiras (Castellani et al., 2007).

Por essa razão, são necessários novos estudos que busquem melhor conhecer a bioecologia dessa espécie de formiga cortadeira uma vez que elas estão presentes em ambientes naturais e perturbados pelo homem, atuando também com importante papel na ciclagem de nutrientes, no fluxo de energia e dispersão de sementes.

2. INTERAÇÕES METABÓLICAS

A simbiose envolvendo a formiga cortadeira e seu fungo simbiote é uma relação obrigatória, onde nenhum dos organismos envolvidos vive separadamente (Della Lucia, 1993).

Nessa relação, o fungo realiza a degradação do material vegetal fresco coletado e trazido ao ninho pelas operárias, uma vez que porções sólidas da folha não ultrapassam a cavidade infrabucal das formigas (Silva et al., 2003). Com essa degradação, o fungo converte os polissacarídeos vegetais em nutrientes acessíveis às formigas (Silva et al., 2006).

Esses polissacarídeos, em especial a pectina, amido, xilana e celulose, são degradados pelo fungo (Siqueira et al., 1998) e convertidos em açúcares mais simples que ficam armazenados nos gongilídeos (Silva, 2004). Essas estruturas fúngicas servem diretamente como fonte de carboidratos usados pelas operárias para alimentar as larvas e a si mesmas (Mariconi, 1970).

O fungo simbiote serve diretamente como recurso nutricional para a colônia (Erthal et al., 2008) apesar de outras fontes de carboidratos também serem usadas pelas operárias, como o líquido proctodeal. Essa fonte alternativa de alimento é liberada pelas larvas durante os cuidados dados a elas pelas operárias e é composto por glicose, aminoácido e ácido fosfórico (Schneider, 2003).

O fungo simbiote possui então a capacidade de produzir as enzimas digestivas necessárias para permitir seu acesso aos polissacarídeos contidos no substrato foliar. Essas enzimas também são fornecidas pelo fungo às operárias que as armazenam em seu trato intestinal (Erthal et al., 2004) e as utilizam nas atividades de pré-degradação dos fragmentos foliares recém coletados.

Desde a década de 1960, pesquisadores buscavam entender quais os pontos-chaves que fundamentavam a relação simbiótica entre as formigas cortadeiras e seu fungo cultivado, no que diz respeito ao enredo enzimático. Estudos realizados por Martin e Weber (1969), usando como modelo o fungo de *A. colombica tonsipes* cultivado em laboratório, encontraram celulase e estes concluíram ser essa a enzima base da interação formiga–fungo simbiote.

Em 1995, Bacci et al., ao analisarem as enzimas produzidas pelo fungo cultivado por *A. sexdens*, reafirmaram a teoria de Martin e Weber (1969),

demonstrando ser celulase a enzima mais importante que ocorre na interação entre os simbiontes envolvidos.

Porém, Siqueira et al. (1998) mostraram que o fungo simbionte apresenta alta capacidade de degradar pectina e que, ao contrário do descrito por trabalhos anteriores, a celulase é uma enzima pobremente produzida pelo fungo. Neste trabalho, os autores apresentam ainda resultados indicando que, apesar de ser um polissacarídeo abundante na composição vegetal, a celulose é menos degradada que outros nutrientes como pectina, amido e xilana .

Abril e Bucher (2002), afirmam ter encontrado resultados negativos quanto à produção de celulase pelo fungo simbionte de *Acromyrmex lundii*, *Acromyrmex lobicornis*, *Acromyrmex heyeri* e *Atta vollenweideri*, refutando as pesquisas anteriores.

Nas análises enzimáticas realizadas com o fungo simbionte de *Atta sexdens*, Silva et al. (2003) sugerem que esta interação metabólica tem como importante enfoque a degradação extracelular do amido e da xilana, polissacarídeos que podem ser convertidos pelo fungo em glicose e xilose, açúcares facilmente assimiláveis pelas operárias.

Silva et al. (2006) mostraram haver um complexo multi-enzimático onde as enzimas pectinase, amilase, xilanase e celulase estão fortemente envolvidas no processo de degradação e assimilação dos biopolímeros vegetais que envolvem a simbiose. Ainda que em menores valores quando comparado às demais enzimas, a celulase mostrou-se presente, contradizendo o trabalho de Abril e Bucher (2002) que afirma a inabilidade do fungo em degradar celulose.

Dentro desse contexto enzimático, algumas enzimas parecem desempenhar importantes tarefas, como a pectinase, por exemplo. Com origem no próprio fungo (Silva, 2004), esta enzima também está presente no fluido fecal das operárias que realizam uma pré-degradação, do material vegetal após o depósito do fluido fecal sob o substrato (Silva, 2004).

Na composição da parede celular vegetal, a pectina age agregando as células da folha (Siqueira et al.,1998) e, após a ação da pectinase, o acesso do fungo aos demais polissacarídeos (xilana, pectina e amido) contidos nesse substrato fica facilitado, acelerando seu crescimento e promovendo uma vantagem sobre os microrganismos competidores que vivem no interior do ninho (Silva, 2004).

Outra enzima relevante dentro da simbiose é a amilase, cujo alguns grupos envolvidos na relação formiga-fungo parecem ser de origem fúngica, enquanto outros parecem ser produzidos pela própria formiga (Erthal et al., 2004). Quando o amido é convertido pelo fungo em glicose, torna-se um nutriente muito valioso, armazenado nos gongíldeos e utilizado como fonte de alimento pelas operárias e larvas (Silva et al., 2003).

A xilanase é a enzima responsável pela conversão de xilana em xilose. Esse açúcar simples pode, assim como a glicose, atuar como importante indutor de crescimento para o fungo simbiote (Silva, 2004).

A celulose é um polissacarídeo abundante na composição da parede celular e forma, junto com pectina e xilana, um entrelace fortemente unido. A celulase se mostra uma enzima importante por permitir a quebra da celulose.

Todos esses conhecimentos sobre a base enzimática da interação formiga-fungo se fazem muito importantes a fim de permitir avanços na tecnologia que envolve os mecanismos de controle das espécies pragas e também na preservação das espécies não pragas em seu ambiente natural.

3. OBJETIVO E JUSTIFICATIVA

O presente estudo teve como principal objetivo avaliar a produção das diferentes moléculas de polissacaridases (pectinases, amilases, xilanases e celulases) pelo fungo simbiote das formigas cortadeiras *Atta capiguara* e *Acromyrmex balzani*, ambas espécies caracterizadas por cortar e coletar folhas de gramíneas para manutenção do fungo simbiote (Forti, 1985).

Dada a preferência destas formigas por gramíneas, estas constituem-se importantes pragas de pastagens e cana de açúcar no Brasil, e os danos ocasionados atingem principalmente a produtividade fotossintética e a produção de biomassa vegetal (Amante, 1972).

Estas espécies, como todas espécies de Attini, têm o cultivo do fungo como obrigatório, este representando sua principal fonte de alimento, tanto para larvas como para insetos adultos (Martin et al., 1969, Silva et al, 2003). Para o desenvolvimento deste fungo no formigueiro é necessário o corte e a coleta de material vegetal, que é preparado cuidadosamente pelas operárias, preparação essa que consiste, principalmente, no depósito de fluido fecal, contendo polissacaridases fúngicas que auxiliam na pré-degradação dos polissacarídeos foliares e facilita o crescimento do próprio fungo simbiote, após este ser inoculado (Ronhede et al., 2004). As polissacaridases são enzimas importantes na degradação do substrato vegetal e obtenção de nutrientes assimiláveis no ninho e, por essa razão, são alvos nos estudos que visam a busca do conhecimento a respeito da dependência metabólica entre formigas cortadeiras e seus fungos simbioses.

Além disto, este estudo se justifica pelo fato de *Atta capiguara* e *Acromyrmex balzani* serem espécies de Attini pouco estudadas no que se refere aos aspectos metabólicos/nutricionais da interação, e pesquisas nesta linha podem subsidiar trabalhos futuros no que diz respeito a elaboração de iscas tóxicas mais atrativas e efetivas para o controle de cortadeiras de gramíneas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Modelo biológico utilizado

Foram utilizados quatro ninhos de *Atta capiguara* coletados no município de Botucatu-SP (22.8952°S 48.447°W) pela equipe do Prof. Dr. Carlos Forti e sete ninhos de *Acromyrmex balzani* coletados em Vitória da Conquista-BA (14.966°S 40.979°W) pela Prof. Dra. Aline Silva. Para a determinação das enzimas foi utilizado tanto o fungo simbiote retirado diretamente do ninho (na forma de jardim de fungo) como isolado em laboratório.

Foram retiradas duas amostras de cada um dos quatro ninhos de *A. capiguara* para as análises da esponja fúngica (n=8) e para as análises do fungo isolado, foram utilizadas cinco réplicas (n=20).

Para as análises de *A. balzani*, foram retiradas duas amostras para as análises com a esponja de cada um dos sete ninhos coletados (n=14). Já nas análises com o fungo isolado, apenas 3 ninhos foram utilizados com cinco réplicas cada (n= 15) .

4.2 Preparo das amostras dos jardins de fungos

De cada ninho, duas amostras de 1,0 g foram retiradas, sendo cada amostra homogeneizada por maceração em 9,0 mL de tampão citrato-fosfato 75 mM pH 5,0, e em seguida homogeneizada em *Potter* resfriado em banho de gelo. Após ser homogeneizado, o material foi filtrado em papel de filtro e em membrana 0,45 µm, seguindo então para a determinação das polissacaridases (pectinase, amilase, xilanase e celulase). Todo o processo foi realizado em banho de gelo, evitando assim a desnaturação das enzimas. Em seguida as amostras foram armazenadas a -20°C até a determinação das polissacaridases.

4.3 Isolamento e manutenção do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*

Foram isolados os fungos de todos os ninhos coletados. Para o isolamento foi utilizado meio batata-dextrose-ágar (BDA) acrescido do antibiótico tetraciclina, na concentração de 0,01% (p/v). A manutenção dos isolados foi feita também em BDA ou em meio A modificado.

4.4 Cultivo do fungo para indução das polissacaridasas

Para a indução das polissacaridasas, as linhagens isoladas de *Leucoagaricus gongylophorus* foram cultivadas em meio líquido, preparado com tampão citrato-fosfato 75 mM pH 5,0, acrescido de 0,67 (p/v) de meio mínimo Yeast Nitrogen Base e 0,5 (p/v) de amido [(substrato indutor das polissacaridasas pectinase, amilase, xilanase e celulase, segundo SILVA et al. (2006)]. Após 30 dias de crescimento em estufa a 25°C, o micélio foi filtrado em papel de filtro, seguindo para determinação de peso seco. O meio contendo as enzimas expressas foi filtrado em membrana 0,45 µm, em banho de gelo, e armazenado em freezer a -20°C. Foram feitas 5 réplicas de cultivo para cada isolado fúngico e com estas amostras foram realizadas as determinações das enzimas polissacaridásicas.

4.5 Determinação das atividades de polissacaridasas

Foram determinadas as atividades das polissacaridasas pectinase, amilase, xilanase e celulase. Um mL de cada amostra (extrato de jardim de fungo ou meio de cultura com enzimas induzidas) foi misturado a 1,0 mL dos substratos pectina, amido, xilana ou celulose, todos preparados a 2% (p/v) em tampão citrato-fosfato 75 mM pH 5,0. A mistura reacional foi mantida a 37°C por 20, 40, 60 e 90 minutos (para pectinase e amilase) e por 30, 60, 120, 180 minutos para atividades de xilanase e

celulase. A cada tempo de incubação, alíquotas de 200 μL de solução substrato/amostra foram coletadas e adicionadas a 400 μL do reagente ácido dinitrosalicílico (ADNS) e 400 μL de água destilada, seguindo para banho-maria fervente durante 5 minutos, resfriamento imediato em banho de gelo e leitura em espectrofotômetro a 540 nm.

Os valores de densidade óptica determinados foram plotados em função do tempo de incubação e a inclinação da reta foi utilizada para os cálculos das atividades enzimáticas, com o auxílio de curvas-padrões (método ADNS) dos produtos redutores resultantes em cada reação: glicose (para atividades de amilase e celulase), xilose (para atividade de xilanase) e ácido galacturônico (para atividade de pectinase).

Foi considerada como unidade de atividade enzimática (U) a quantidade de produtos redutores (em μg) produzidos por minuto de reação por mg (peso seco) de fungo (jardim de fungo ou fungo isolado) [$\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg}$].

4.6 Análises estatísticas

Os valores obtidos após os devidos cálculos foram submetidos a análises de média, desvio-padrão e variância. O teste de *Tukey* foi utilizado para agrupar os isolados fúngicos de acordo com a produção de enzimas polissacaridásicas. Este teste foi realizado no programa estatístico *Prism 4.0*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 *Atta capiguara*

As análises das polissacaridases realizadas com as amostras retiradas diretamente do jardim de fungo de *Atta capiguara* mostraram uma maior quantidade de pectinase, xilanase, amilase e celulase. Os valores encontrados foram 14,4 (\pm 1,2) unidades de pectinase, 3,4 (\pm 0,2) unidades de amilase, 10,9 (\pm 0,9) unidades de xilanase e 2,4 (\pm 0,2) unidades de celulase (figura 1).

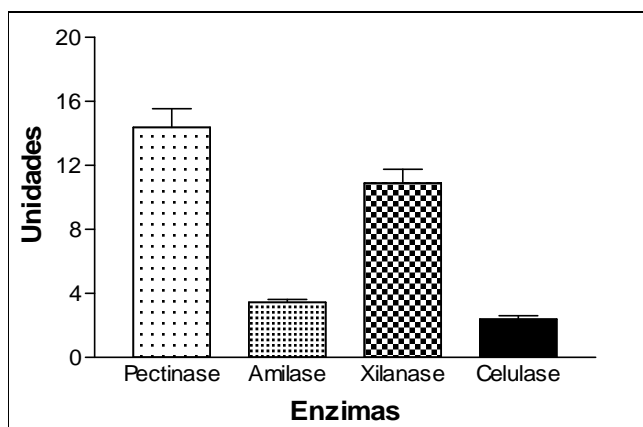


Figura 1. Unidades de polissacaridases (pectinase, amilase, xilanase e celulase) determinadas nos jardins de fungo da formiga cortadeira *Atta capiguara*. Cada atividade enzimática está representada como média \pm desvio padrão.

Já os valores das polissacaridases obtidos a partir das análises realizadas com o fungo isolado e cultivado em meio de amido por 30 dias, mostraram a presença de pectinase também em maior quantidade 27,0 (\pm 1,9) unidades, seguido por celulase 13,8 (\pm 1,6) unidades, amilase 11,1 (\pm 1,2) unidades e xilanase 7,5 (\pm 0,6) unidades (figura 2).

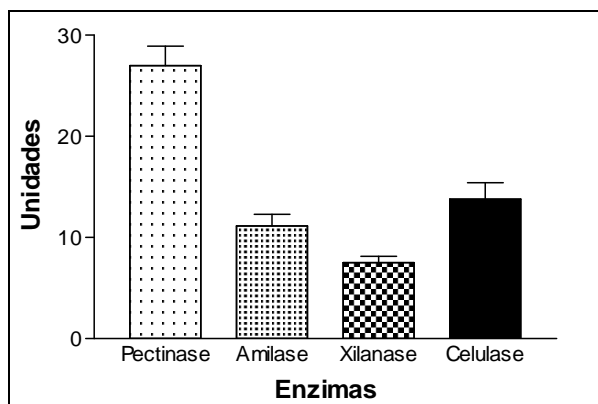


Figura 2. Unidades de polissacaridases (pectinase, amilase, xilanase e celulase) determinadas em isolados de *Leucoagaricus gongylophorus* cultivado pela formiga cortadeira *Atta capiguara*. Cada atividade enzimática está representada como média \pm desvio padrão.

As análises estatísticas possibilitaram separar as atividades das polissacaridases, tanto do jardim de fungo como do fungo isolado, em diferentes grupos, como demonstrado na tabela 1. No jardim de fungo a pectinase foi a enzima mais produzida, seguida da xilanase; amilase e celulase foram agrupadas juntas segundo o teste de *Tukey*. Para o fungo isolado pectinase também foi a enzima mais produzida (grupo A), seguida da celulase (grupo B) e xilanase (grupo C); amilase foi agrupada tanto no grupo de celulase como no de xilanase, segundo o teste de *Tukey*.

Tabela 1. Polissacaridases (média e desvio-padrão) detectadas no jardim de fungo e no fungo isolado (*Leucoagaricus gongylophorus*) de ninhos de *Atta capiguara*. Os valores (média e desvio-padrão) estão expressos em Unidades ($\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$).

	Unidades ($\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)			
	Pectinase	Amilase	Xilanase	Celulase
Jardim de fungo	14 \pm 1,2 (A)	3,4 \pm 0,2 (C)	10,9 \pm 0,9 (B)	2,4 \pm 0,2 (C)
<i>L. gongylophorus</i> isolado	27,0 \pm 1,9 (A)	11,1 \pm 1,2 (B)(C)	7,5 \pm 0,6 (C)	13,8 \pm 1,6 (B)

Estudos realizados por Silva et al. (2006) utilizando como modelo *Atta sexdens*, mostraram a pectinase como a enzima mais produzida pelo fungo

simbionte da espécie estudada, fato que se assemelha aos resultados aqui encontrados com *Atta capiguara*. Porém, quando comparadas as proporções, os valores de pectinase em *Atta sexdens* se mostram muito maiores. Em Siqueira et al. (1998) e Silva et al. (2006), observou-se que a produção de pectinase em *A. sexdens* chegou a ser, em média, 6 vezes maior que a amilase e 22 vezes maior que a xilanase. Em relação à celulase, a produção de pectinase chegou a ser até 200 vezes maior que celulase.

Esta proporção de produção enzimática é um perfil estabelecido nas discussões de trabalhos que tratam a respeito destes aspectos metabólicos. Todas as pesquisas realizadas até o momento mostram que há um complexo multi-enzimático envolvendo a simbiose, no qual algumas enzimas parecem estar prioritariamente relacionadas:

1) a pectinase parece ser uma importante enzima simbionte (Siqueira et al., 1998), que é originária do fungo, ingerida pelas formigas, concentradas em seu intestino e excretada no fluido fecal durante o preparo do substrato para o cultivo do fungo (Ronhede et al., 2004). Com isto, o fungo encontra o substrato pré-degradado e tem acesso direto a outros polissacarídeos que melhor induzem seu crescimento, amido ou xilana (Siqueira et al., 1998). Isto se mostra importante, uma vez que o fungo se torna competitivo na colonização do substrato perante outros microrganismos;

2) a amilase se apresenta como uma enzima secundária, porém importante, pois é a principal enzima atuando na produção de glicose no ninho. E a glicose se mostra como nutriente chave na simbiose, pois é eficiente na manutenção da sobrevivência das operárias (Silva et al., 2003) e na formação de biomassa e gongilídeos pelo fungo simbionte (Siqueira et al., 1998; Silva, 2000);

3) xilanase é importante por ser a enzima que degrada a xilana, produzindo xilose. E este açúcar proporciona crescimento do fungo semelhante à glicose (Siqueira et al., 1998);

4) Quanto à celulase, parece esta não ter papel relevante na degradação do substrato foliar levado para o ninho, porém vale ressaltar que a celulose se mostra como um importante polissacarídeo. Alguns dados demonstram ser este um bom indutor da produção de polissacaridasas por *L. gongylophorus* (Silva et al., 2006).

Portanto, os resultados mais recentes mostram que não há uma enzima polissacaridásica ou um polissacarídeo único que fundamente a dependência bioquímica entre as Attini e seu fungo simbiote. Há, na verdade, um conjunto de fatores metabólicos que se complementam e que contribuem para o equilíbrio destes organismos nos ecossistemas em que eles habitam.

Dentro deste contexto, a elevada produção de pectinase, observada também para *A. capiguara*, ratifica as recentes discussões a respeito do perfil metabólico destes fungos simbiotes, e isto pode ser justificado devido a pectina ser um importante polissacarídeo presente na superfície celular e que atua unindo as células da parede celular vegetal (Ferri, 1986). Daí a necessidade de uma alta produção de pectinase pelo fungo, favorecendo seu acesso aos demais polissacarídeos contidos na folha.

Em relação aos valores encontrados para as análises realizadas com xilanase e celulase, seja na esponja fúngica ou no fungo isolado, a alta produção dessa enzima pode ser explicada pelo fato da espécie *Atta capiguara* ser uma cortadeira com preferência pelo corte de gramíneas. Este tipo de vegetal apresenta maiores teores de xilana e celulose na parede celular de suas folhas do que as dicotiledôneas, justificando tal resultado.

Ao contrário do que relata a literatura a respeito da baixa produção de celulase pelo fungo de formigas cortadeiras (Siqueira et al., 2008, Silva et al., 2003, Abril e Bucher, 2002), os resultados apresentados aqui, tanto no jardim de fungo quanto no fungo isolado, demonstram altos valores da produção dessa enzima pelo fungo simbiote de *Atta capiguara*, quando comparados com estudos anteriores envolvendo outras espécies de formigas cortadeiras.

Esses diferentes padrões enzimáticos apontam para a idéia de que a produção das enzimas pelo fungo simbiote de formiga cortadeira pode estar vinculada ao tipo vegetal oferecido ao fungo como substrato. Isso porque *Atta capiguara* é uma formiga especializada no corte e coleta de folhas de monocotiledôneas. Esse grupo vegetal possui teor de celulose muito maior que as folhas de dicotiledôneas.

Esses resultados mostram não haver um padrão único de produção enzimática para *Leucoagaricus gongylophorus*, e ainda, que há um complexo multi-enzimático responsável pela manutenção da simbiose formiga-fungo.

Em relação à diferença nos resultados obtidos das análises realizadas com o jardim de fungo e o fungo isolado, a explicação pode estar no fato de que a produção enzimática seja estimulada e também alterada pela constante adição de substrato vegetal ao ninho.

5.2 *Acromyrmex balzani*

Os resultados das análises realizadas com o fungo cultivado pela formiga cortadeira *Acromyrmex balzani* estão representados nas figuras 3 e 4 e na tabela 2.

Para o jardim de fungo os resultados mostram uma produção bastante distinta do que já foi observado para outras espécies de formigas cortadeiras, onde a xilanase foi a enzima mais detectada, seguida da pectinase, amilase e celulase. Estes resultados parecem muito diferentes dos observados em *Atta sexdens*, formiga usada como modelo devido aos muitos trabalhos metabólicos já realizados.

Uma das razões que justifica os resultados encontrados com *A. balzani* é o comportamento de forrageamento desta espécie de formiga, que possui o hábito de forragear gramíneas, vegetais com maior teor de celulose e xilana que dicotiledôneas.

Porém, para as análises realizadas com o fungo isolado em laboratório, a produção de pectinase foi mais alta, seguida da produção de amilase, xilanase e celulase, seguindo os resultados observados para o modelo *Atta sexdens*.

Esses resultados podem ser explicados pelo fato de que, quando o fungo é mantido em laboratório e é cultivado em apenas uma fonte de carbono, a produção das enzimas mantenha os padrões observados nos fungos isolados cultivados por outras espécies de cortadeiras. Essa variação na quantidade das polissacaridasas no jardim de fungo segue um padrão de produção a partir do substrato vegetal adicionado ao ninho.

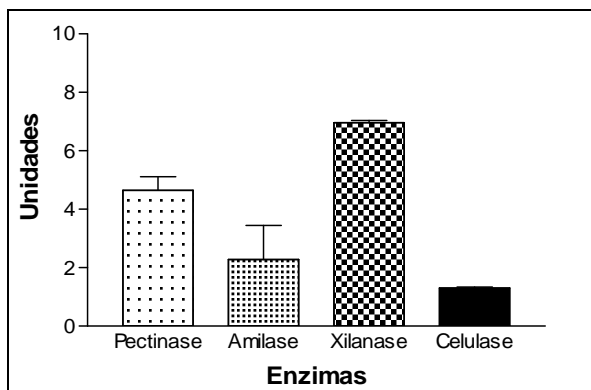


Figura 3. Unidades de polissacaridases (pectinase, amilase, xilanase e celulase) determinadas em jardins de fungo da formiga cortadeira *Acromyrmex balzani*. Cada atividade enzimática está representada como média \pm desvio padrão.

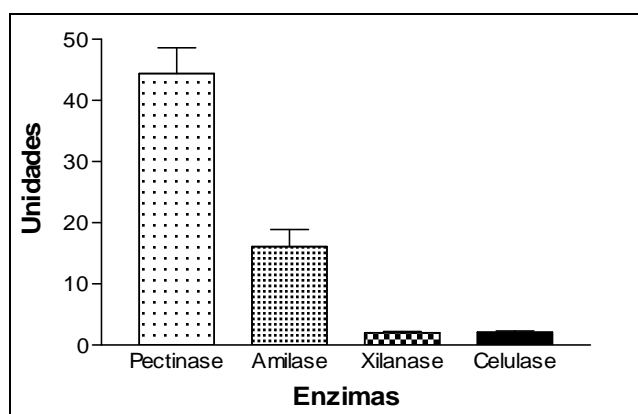


Figura 4. Unidades de polissacaridases (pectinase, amilase, xilanase e celulase) determinadas em isolados de *Leucoagaricus gongylophorus* cultivado pela formiga cortadeira *Acromyrmex balzani*. Cada atividade enzimática está representada como média \pm desvio padrão.

Quando comparadas as médias obtidas em todos os resultados para *Acromyrmex balzani*, as atividades enzimáticas foram agrupadas da seguinte forma: para o jardim de fungo pectinase e xilanase foram as enzimas mais detectadas (grupo A), seguidas de amilase e celulase (grupo B); para o fungo isolado pectinase foi a polissacaridase mais produzida (grupo A), seguida de amilase (grupo B) e celulase e xilanase (grupo C) (tabela 2).

Tabela 2. Polissacaridasas (média e desvio-padrão) detectadas no jardim de fungo e no fungo isolado (*Leucoagaricus gongylophorus*) de ninhos de *Acromyrmex balzani*. Valores seguidos de letras distintas são significativamente diferentes (teste de Tukey, 95% de confiança).

	Unidades ($\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)			
	Pectinase	Amilase	Xilanase	Celulase
Jardim de fungo	4,7 \pm 0,5 (A)	2,3 \pm 1,7 (B)	7,0 \pm 0,07 (A)	1,3 \pm 0,04 (B)
<i>L. gongylophorus</i> isolado	44,4 \pm 4,2 (A)	16,1 \pm 2,7 (B)	2,04 \pm 0,2 (C)	2,1 \pm 0,2 (C)

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho nos permitem concluir que, assim como afirmam estudos anteriores, é evidente a presença da celulase dentro do conjunto enzimático utilizado pelo *Leucoagaricus gongylophorus*, o fungo simbiote das formigas cortadeiras.

Além disso, as análises realizadas com as espécies estudadas *Atta capiguara* e *Acromyrmex balzani*, propõem que a produção de enzimas por fungos cultivados por cortadeiras pode estar vinculada ao substrato cortado que serviria como indutor da produção enzimática.

Os resultados mostram ainda que não há uma enzima polissacaridásica ou um polissacarídeo único que fundamente a dependência bioquímica entre as Attini e seu fungo simbiote. Há na verdade um conjunto de fatores que contribuem para esse equilíbrio e um deles o manejo do fungo pelas formigas no que diz respeito ao tipo de forrageamento fornecido ao simbiote.

Todas as enzimas estudadas são importantes dentro da simbiose, desempenhando seu papel no processo de degradação do material vegetal. Os estudos envolvendo os fatores bioquímicos da simbiose podem ser importantes na elaboração de iscas tóxicas mais efetivas no combate a espécies pragas e também na preservação das espécies não-pragas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRIL, A. B.; BUCHER, E. H. **Evidence that the fungus cultured by leaf-cutting ants does not metabolize cellulose.** *Ecology Letters*, 5: 325-328, 2002.

AMANTE, E. **Influência de alguns fatores microclimáticos sobre a formiga saúva *Atta laevigata* (F. Smith, 1858), *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908, *Atta bisphaerica* Forel, 1908, e *Atta capiguara* Gonçalves, 1944 (Hymenoptera, Formicidae), em formigueiros localizados no estado de São Paulo.** São Paulo: USP/ESALQ, 1972. 175p. (Tese - Doutorado)

BACCI Jr., M; ANVERSA, M. M.; PAGNOCCA, F. C. **Cellulose degradation by *Leucocoprinus gongylophorus*, the fungus cultured by the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*.** *Braz. J. Med.Biol. Res.*, 28: 79-82, 1995.

BARBOSA, V.S. **Efeito da Fragmentação Florestal na Taxa de Parasitismo de Fungos Associados ao Jardim de Formiga Cortadeira *Atta laevigata*.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Pernambuco. 2004.

BELT, T. **The naturalist in Nicaragua.** London: Jonh Murray. 2ed, United States of America: The University of Chicago Press, 1874.

BOARETTO, M.A.C. **Seleção de substratos com potencial para uso em iscas granuladas para as saúvas *Atta capiguara* Gonçalves, 1944 e *Atta bisphaerica* Forel, 1908 (Hymenoptera, Formicidae) e isolamento do fungo simbiote.** 2000. 161p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrônômicas/UNESP, Botucatu, 2000.

BOARETTO, M.A.C.; FORTI, L.C.; LOPES, F.S.; NAGAMOTO, N.S.; ANDRADE, A.P.P.; MOREIRA, A.A.; VIANA, A.E.S.; RAMOS, V.M. **Response of The Grass-Cutting Ant *Atta capiguara* Gonçalves, 1994 (HYMENOPTERA: n.3, p.505-509, Jul./Sept. 2003**

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.** *Ciência Rural*, Santa Maria, v.36, n.3, p.725-730, mai-jun, 2006

BORBA, R.S.; LOECK, A.E.; BRANCO, J.S.C.; BONOW, J.; OLIVEIRA, A.C. **Pareamento de fungos cultivados por diferentes espécies de formigas cortadeiras no Rio Grande do Sul.** *Ciência Rural*, Santa Maria, v.38, n.5, p.1214-1219, 2008.

BRANDÃO, C.R.F. **Avanços da mirmecologia no Brasil.** *Biológico*, São Paulo, v.69, suplemento 2, p.1-3, 2007.

CAETANO, F.H.; JAFFÉ., K.; ZARA, F.J – **Formigas: biologia e anatomia**. Rio Claro: Editora Topázio, p 131. 2002.

CAETANO, F.H.; **O estado da arte da morfologia interna de formigas**. *Biológico*, São Paulo, v69, suplemento 2, p 189-193. 2007.

CASTELLANI, M.A.; FORTI,L.C.; MOREIRA, A.A.; CRUSCIOL, A.P.P.A. **Biologia de formigas cortadeiras de gramíneas: Uma visão prática**. *Biológico*, São Paulo, V.69, suplemento 2, p.73-76, 2007.

CHERRETT, J. M.; POWELL, R. J.; STRADLLING, D. J. **The mutualism between leaf-cutting ants and their fungus**. In: Wilding, N.; Collins, N. M.; Hammond, P. M.; Webber, J. F. (1989) *Insect-Fungus Interactions*. New York: Academic Press, p. 93-120, 1989.

CURRIE C.R.; STUART A.E.; **Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants**. *Proceeding of the Royal Society of London* 268, 1033-1039, 2001.

CURRIE, C.R.; WONG, B.; STUART, A.E.; SCHULTZ, T.R.; REHNER, S.A.; MUELLER, U.G.; SUNG, G.-H.; SPATAFORA, J.W.; STRAUS, N. A. **Ancient tripartite coevolution in the attine antmicrobe symbiosis**. *Science*, v.299, p.386-388, 2003.

DELLA LÚCIA, T.M.C. **As formigas cortadeiras**. Ed. Folha Nova de Viçosa, 1993.

ERTHAL Jr., M.; SILVA, C.P.; SAMUELS, R.I. **Digestive enzymes of the leaf-cutting ants, *Acromyrmex subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae: Attini): distribution in the gut of adult workers and partial characterization**. *J. Insect Physiol.*, 50(10): 881-891, 2004.

ERTHAL Jr., M.; SILVA, C.P.; COOPER,R.M.; SAMUELS,R.I. **Hydrolytic enzymes of leaf-cutting ant fungi**. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 152 54–59. 2008.

FERRI,M.G.; **Fisiologia vegetal**. 2.ed. São Paulo: EPU. 1986.

FORTI, L. C.; **Ecologia da saúva *Atta capiguara* Gonçalves, 1944 (Hymenoptera, Formicidae) em pastagem**. 1985. 234 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1985.

FORTI, L.C. & ICHINOSE, K. **Expansão de *Atta capiguara* Gonçalves,1944 (Hymenoptera, Formicidae) para o norte do estado do Paraná e os problemas ocasionados**. In: *International Symposium on Pest Ants*, 11., 1993, Belo Horizonte, MG. Resumos. Belo Horizonte, 1993.

FORTI, L. C.; BOARETO, M. A. C.; **Formigas cortadeiras: biologia, ecologia, danos e controle**. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo. 61p, 1997.

- GARLING, L. **Origin of ant–fungus mutualism: a new hypothesis**. *Biotropica* 11, 284–291. 1979.
- GONÇALVES, C.R.; **O gênero Acromyrmex no Brasil**. *Studia Ent.*, vol 4, fasc.1-4 , outubro de 1961.
- HOLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The ants**. Cambridge: Harvard University Press, p. 596-608, 1990.
- Lima, C.A.; Della Lucia, T.M.C.; Guedes, R.N.C.; Veiga, C.E. **Desenvolvimento de iscas granuladas com atraentes alternativos para *Atta bisphaerica* Forel, (Hymenoptera: Formicidae) e sua aceitação pelas operárias**. *Neotropical Entomology* 32(3):497-501, 2003.
- MARICONI, F.A.M. **As saúvas**. São Paulo: Ceres. 167p, 1970.
- MARTIN, M. M.; WEBER, N. A. **The cellulose-utilizing capability of the fungus cultured by the attini ant *Atta colombica tonsipes***. *Ann. Entomol. Soc. Amer.*, 62: 1386-1387, 1969.
- MARTIN, M. M.; MARTIN J. S. **The biochemical basis for the symbiosis between the ant, *Atta colombica tonsipes*, and its food fungus**. *J. Insect Physiol.*, 16: 109-119, 1970.
- MOREIRA, A.A. FORTI, L.C., CASTELLANI, M.A., ANDRADE, A.P.P.. **Arquitetura dos ninhos das formigas cortadeiras de gramíneas**. *Biológico*, São Paulo, v.69, suplemento 2, p.83-85, 2007.
- 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.
- PIMENTA, L.B.; ARAÚJO, M.S.; SILVA, J.M.S.; NAVES, V.G.O. **Dinâmica de forrageamento e caracterização de colônias de *Acromyrmex balzani* (Emery, 1890) (Hymenoptera: Formicidae) em ambiente de cerrado goiano** *Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal*, ano V, número 09, fevereiro de 2007.
- PODEROSO, J.C.M.; GONÇALVES, F.B.; CORREIA OLIVEIRA, M.E.; DANTAS, P.C.; OLIVEIRA, P.D.M.; GONÇALVES, G.B.; RIBEIRO, G.T. **Atividade de forrageamento de *A. balzani* (Emery, 1980) (Hymenoptera: Formicidae) no Campus da Universidade Federal de Sergipe, Brasil**. *Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil*, Caxambu, M.G. 2007.
- RAMOS, V.M.; FORTI, L.C. **Soluções para o controle de *Atta capiguara* Gonçalves, 1954 (Hym, Formicidae) com iscas tóxicas**. *Biológico*, São Paulo, v.69, suplemento 2, p.77-80, 2007.

RAMOS, V. M. **Desenvolvimento de iscas atrativas para a formiga cortadeira de grâmíneas *Atta capiguara* Gonçalves, 1944 (Hymenoptera, formicidae)**. 74 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2005.

RONHEDE, S.; BOOSMA, J. J.; ROSENDAHL, S. **Fungal enzymes transferred by leaf-cutting ants in their fungus gardens**. *Mycol. Res.*, 108 (1): 101-106. 2004.

SÁNCHEZ - PEÑA, S.R. **New view on origin of attine ant–fungus mutualism: exploitation of a preexisting insect–fungus symbiosis (Hymenoptera: Formicidae)**. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 98, 151–164. 2005.

SCHNEIDER, M.O. **Comportamento de cuidado da prole da saúva-limão *A. sexdens rubropilosa* Forel (1908) (Hymenoptera, Formicidae)**. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas (Zoologia), Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista. 2003.

SIQUEIRA, C. G.; BACCI Jr., M.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A. **Metabolism of plant polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of leaf-cutting ant *Atta sexdens* L.** *Appl Environ Microbiol*, 64 (12): 4820-4822, 1998.

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.

SILVA, A.; BACCI Jr., M.; SIQUEIRA, C. G.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A. **Survival of *Atta sexdens* on different food sources**. *J. Insect Physiol.*, 49:307-313, 2003.

SILVA, A. **Alfa-amilase e Maltase nos simbiontes *Leucoagaricus gongylophorus* Singer (Möller) Leucocoprineae: Agaricaceae e *Atta sexdens* Linnaeus (Attini: Formicidae)**. 77p. Tese de Doutorado – Instituto de Biociências, Rio Claro. 2004.

SILVA, A.; BACCI JR, M.; PAGNOCCA, F.C.; BUENO, O.C.; HEBLING, M.J.A. **Production of Polysaccharidases in Different Carbon Sources by *Leucoagaricus gongylophorus* Möller (Singer), the Symbiotic Fungus of the Leaf-Cutting Ant *Atta sexdens* Linnaeus**. *Current Microbiology*, v.53, p.68–71. 2006.

SILVA-PINHATI, A. C.; BACCI Jr., M.; HINKLER, M. L.; SOGIN, M. L.; PAGNOCCA, F. C.; MARTINS, V. G.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A. **Low variation in ribosomal DNA and internal transcribed spacers of the symbiotic fungi of leaf-cutting ants (Attini: Formicidae)**. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 37 (in press), 2004.

WEBER, N. A. **Fungus-growing ants**. *Science*, 153: 587-604, 1966.

WEBER, N.A. **Fungus culturing by ants.** In: Batra, L. R. (Ed.). **Insect -fungus symbiosis, mutualism and commensalism.** New York: John Willey & Sons, 1979.

ZANETTI,R.;ZANUNCIO,J.C.;MAYHÉNUNES,A.J.;MEDEIROS,A.G.B.;SILVA,A.S.
Combate sistemático de formigas-cortadeiras com Iscas Granuladas, em Eucaliptais com cultivo mínimo R. Árvore, Viçosa-MG, v.27, n.3, p.387-392, 2003.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)