

**Evolução e Metabolismo de Alguns Atíneos
(Hymenoptera: Formicidae) e seus Fungos
Simbiontes (Basidiomycota: Agaricales)**

ANA CARLA OLIVEIRA DA SILVA PINHATI

Rio Claro

Estado de São Paulo – Brasil

Dezembro de 2004

Evolução e Metabolismo de Alguns Atíneos (Hymenoptera: Formicidae) e seus Fungos Simbiontes (Basidiomycota: Agaricales)

ANA CARLA OLIVEIRA DA SILVA PINHATI

Orientador: Prof. Dr. MAURÍCIO BACCI JÚNIOR

**Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade Estadual
Paulista “Julio de Mesquita Filho”,
Campus de Rio Claro, para a obtenção
do título de Doutor em Ciências
Biológicas (Área de Concentração:
Microbiologia Aplicada)**

Rio Claro

Estado de São Paulo – Brasil

Dezembro de 2004

Ao meu marido Elidon pelo amor, paciência, estímulo e também por ter me compreendido pelos momentos de ausência...

Aos meus pais, Osmar e Creusa, pela dedicação incondicional, apoio e carinho...

Aos meus irmãos Érica /Adriano e Osmar Junior pela agradável convivência e conforto nos momentos difíceis. E ao meu sobrinho Eduardo pela alegria...

...OFEREÇO

DEDICO...

Ao meu filho Giovani que é a minha vida...

E a minha irmã Ellen Mara que foi e sempre será uma luz em meu caminho.

AGRADECIMENTOS

A Deus que ilumina nossos caminhos.

Ao Prof. Dr. Maurício Bacci Júnior pelas oportunidades oferecidas, pela orientação e confiança.

Aos meus pais Osmar e Creusa, ao meu irmão Osmar Junior, a minha irmã Érica, a minha cunhada Ita, ao meu sogro Elidon, a minha sogra Edi, a minha cunhada Denise e a minha sobrinha Tathiane, por ficarem com o Giovani me ajudando assim a concluir a tese.

Aos professores do Centro de Estudos de Insetos Sociais pela amizade e apoio em especial ao Prof. Dr. Vanderlei Geraldo Martins, Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca e Prof. Dr. Odair Correa Bueno pelo auxílio e disposição em ajudar na realização deste trabalho.

Aos funcionários do Centro de Estudos de Insetos Sociais em especial à secretária Necis Miranda de Lima pela amizade, eficiência e disposição em ajudar.

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica em especial a Profa. Dra. Eleonora Cano Carmona e ao Prof. Dr. Jonas Contiero pela coordenação do programa de pós-graduação em Microbiologia Aplicada.

A Sofia pela amizade e disposição em ajudar sempre.

A Aline pelo companheirismo e amizade durante estes anos de convivência.

Às amigas Elissena, Itamar, Alexandra, Giovana, Priscila, aos novos amigos Adriana, Danyelle e Joaquim e aos demais colegas do laboratório pela contribuição e momentos de descontração que tornaram a realização deste trabalho muito mais prazerosa.

Aos funcionários da Seção de pós-graduação do Instituto de Biociências e aos funcionários da biblioteca pelo auxílio e contribuição na solução de dúvidas.

A todos os amigos, professores, funcionários e alunos da UNESP, cujos nomes não foram citados, mas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

CAPÍTULO I. Introdução	1
1. INTRODUÇÃO GERAL	2
1.1. Sistemática de formigas da tribo Attini e seus fungos simbiotes	5
1.2. Transmissão vertical versus horizontal de fungos entre as formigas da tribo Attini	8
1.3. Aspectos nutricionais e co-evolução de formigas e fungos.....	9
1.4. Sistemática do gênero <i>Atta</i>	10
2. ESTUDOS DESENVOLVIDOS NESTA TESE	12
3. REFERÊNCIAS	13
CAPÍTULO II. Isolation and maintenance of symbiotic fungi of ants in the tribe Attini (Hymenoptera: Formicidae).....	18
CAPÍTULO III. Low variation in ribosomal DNA and internal transcribed spacers of symbiotic fungi of leaf-cutting ants (Attini: Formicidae)	34
CAPÍTULO IV. Estudos metabólicos de fungos simbiotes de formigas da tribo Attini	57
CAPÍTULO V. Morfologia e evolução de alguns fungos simbiotes de atíneos.....	71
CAPÍTULO VI. Molecular systematics of ants in the genus <i>Atta</i> (Hymenoptera: Formicidae) based on mitochondrial DNA sequences	88
CAPÍTULO VII . Conclusões e considerações finais	102

CAPÍTULO I

Introdução

1. INTRODUÇÃO GERAL

Poucos animais apresentam capacidade de cultivar seu próprio alimento. Algumas linhagens de insetos, entre elas, formigas, cupins e besouros, há aproximadamente 60 milhões de anos, desenvolveram a capacidade de cultivar fungos para alimento. Alguns destes insetos tornaram-se dependentes do cultivo para alimento e desenvolvem uma sociedade de cooperação com tarefas divididas, que os tornam ecologicamente muito importantes (Mueller, Geraldo, 2002). Em alguns destes grupos de insetos, o consumo de fungo é a principal fonte de alimento, em outros, os fungos compreendem só parte da dieta (Mueller et al., 2001).

Esta dependência de fungos como principal fonte de alimento ocorreu duas vezes em formigas (Formicidae) (Mueller et al., 2001); no monofilético grupo formado por formigas da tribo Attini (Myrmicinae: Formicidae: Hymenoptera) (Schultz, Meier, 1995; Brandão, Mahye-Nunes, 2001), que são dependentes obrigatórias dos fungos que cultivam para alimento (Weber, 1972a; Hölldobler, Wilson, 1990); e nas formigas *Megalomyrmex silvestrii* (Myrmicinae, tribo Solenopsidini), que são parasitas sociais de formigas da tribo Attini e que consomem os fungos cultivados por atíneos hospedeiros (Brandão, 1990; Adams et al., 2000b).

A tribo Attini compreende mais de 200 espécies, distribuídas em 13 gêneros (Schultz, Meier, 1995; Brandão, Mahye-Nunes, 2001). Estas formigas são herbívoras dominantes na região Neotropical, entre as latitudes 12° N e 33° S (Weber, 1979; Hölldobler, Wilson, 1990), com grande concentração de espécies na região Amazônica (Mueller et al., 2001). Esta dominância é resultado da integração metabólica entre os simbiossomas (Martin, 1970; Bass, Cherrett, 1995; North et al., 1997; Siqueira et al., 1998) estabelecida durante os milhões de anos de co-evolução.

Os 13 gêneros da tribo Attini compreendem: *Atta*, *Acromyrmex*, *Pseudoatta*, *Trachymyrmex*, *Sericomyrmex*, *Mycetarotes*, *Myrmicocrypta*, *Mycocepurus*, *Apterostigma*, *Cyphomyrmex*, *Mycetosoritis*, *Mycetophylax* (Schultz, Meier, 1995) e o gênero *Mycetagroicus* descrito recentemente por Brandão, Mahye-Nunes (2001) (tabela 1).

Tradicionalmente, a tribo Attini é subdividida em: um grupo monofilético derivado, denominado atíneos superiores, estando incluídas as formigas cortadeiras de folhas do gênero *Atta* e *Acromyrmex* e também as não cortadeiras *Trachymyrmex* e *Sericomyrmex*; e um grupo parafilético, chamado de atíneos primitivos, incluindo as formigas mais basais (Mueller et al., 2001).

As formigas pertencentes aos gêneros considerados basais são caracterizadas por apresentarem colônias de tamanho muito pequeno; uma exceção é somente o gênero *Myrmecocrypta*, que apresenta colônias maiores. Em contraste, os atíneos derivados apresentam grandes colônias, sendo o gênero *Atta* o que apresenta os maiores ninhos dentro da tribo (tabela 1) (Hölldobler, Wilson, 1990).

Os ninhos de atíneos consistem de formigas e jardins de fungos que são encontrados em uma ou mais câmaras, dependendo do gênero. O jardim de fungo é composto por hifas de fungos e normalmente dominado por um único clone de fungo simbiote (Hölldobler, Wilson, 1990; Weber, 1972a).

As formigas fornecem aos fungos substratos predominantemente de origem vegetal (Hölldobler, Wilson, 1990). Os gêneros *Acromyrmex* e *Atta* cortam folhas frescas e têm recebido atenção especial dos pesquisadores devido aos danos causados a plantas silvestres e cultivadas (Mayhé-Nunes, 1995). Os demais atíneos cultivam fungos sobre fezes de animais, carcaças de insetos e, principalmente, material vegetal em decomposição (Wilson, 1971, Hölldobler, Wilson, 1990, Mayhé-Nunes, 1995), coletados e transportados para o interior dos ninhos (tabela 1).

Fungos e formigas se beneficiam com a relação simbiótica; os fungos são utilizados na dieta das formigas que em retribuição, neste mutualismo obrigatório, fornecem aos fungos substratos para crescimento e proteção contra parasitas e competidores (Quilan, Cherrett, 1977; Currie, Stuart, 2001).

O mutualismo entre fungos e formigas vai além destes dois organismos, sendo muito mais complexo do que se supunha inicialmente. Em trabalhos recentes, foram identificados dois simbiontes adicionais de atíneos: um fungo parasita do gênero *Escovopsis* (Currie et al., 1999a; Currie, 2001) e uma bactéria filamentosa (actinomiceto) do gênero *Pseudonocardia* que é cultivada na superfície do corpo das formigas (Currie et al, 1999b) e produz um antibiótico que inibe o crescimento de *Escovopsis* (Currie, 2001). A associação formiga-fungo-parasita-bactéria é uma das mais complexas associações simbióticas já descritas na natureza (Currie et al, 2003).

A origem da tribo Attini é obscura pelo fato de todas as representantes serem cultivadoras obrigatórias de fungos, não existindo qualquer associação facultativa entre atíneos e fungos que possa refletir o estágio primitivo desta associação. Mesmo os parentes mais próximos dos atíneos não apresentam associação facultativa com fungos, podendo

sugerir uma rápida transição evolucionária do ancestral caçador para a formiga cultivadora de fungos (Mueller, 2002; Mueller et al., 2001; Diniz et al, 1998).

É difícil determinar a natureza desta associação e o passo evolucionário tomado durante a formação da associação original, devido ao enorme tempo e diversificação desde a origem do cultivo de fungos por formigas (Mueller, 2002). Existem dois principais modelos para a origem da fungicultura: o tradicional, sendo que, primeiramente, por acidente um fungo cresce em ninhos de formigas tornando-se parte da sua dieta (consumo), em seguida as formigas desenvolvem a capacidade de cultivar os fungos adicionando substratos (cultivo) e, em um último estágio, os fungos são transmitidos do ninho de origem para os descendentes (transmissão) (Weber, 1972a); e o modelo alternativo, no qual inicialmente as formigas dispersam fungos especializados (transmissão), em seguida as formigas incorporam estes fungos em sua dieta (consumo) e desenvolvem a capacidade de cultivá-los adicionando substratos (Mueller et al., 2001).

Sete hipóteses são propostas e cada uma mostra um diferente substrato (ou forma) que o ancestral de atíneos pode ter utilizado durante a transição de formigas caçadoras para cultivadoras: 1) sementes, 2) paredes dos ninhos, 3) madeira podre, 4) micorriza, 5) corpo de artrópodes, 6) fezes de formigas e 7) pellet infrabucal (Mueller et al., 2001).

No modelo tradicional, observa-se que quem dirigiu o mecanismo originário do mutualismo foi a formiga, começando a cultivar o fungo em um dos seis substratos descritos acima (dependendo da hipótese) e, portanto este foi domesticado passivamente, tornando-se parte da dieta das formigas.

O modelo alternativo sugere que a associação entre fungos e formigas pode ter sido controlada por fungos que utilizaram as formigas para dispersar esporos ou micélios, através do pellet infrabucal, e só depois serviu como componente da dieta das formigas (Mueller et al., 2001).

Todavia, ainda não está claro se a fungicultura em atíneos surgiu de um ancestral micofágico ou de um sistema de fungos utilizando formigas como vetor (Mueller et al., 2001; Mueller, Geraldo, 2002). No entanto, a fungicultura se originou uma só vez em cada grupo como descrito por Chapela, et al. (1994) e Mueller et al. (1998).

Tabela 1. Características de diferentes gêneros de formigas da tribo Attini. Estão descritos também o tamanho dos ninhos e substratos coletados pelas formigas (Hölldobler, Wilson, 1990; Bolton, 1995; Brandão, Mahye-Nunes 2001).

Gêneros (número de espécies)	Tamanho dos ninhos	Substratos levados para o ninho
<i>Myrmicocrypta</i> (24)	Médio	Matéria vegetal em decomposição
<i>Mycocepurus</i> (4)	Pequeno	Carcaças e fezes de insetos
<i>Apterostigma</i> (28)	Pequeno	Carcaças e fezes de insetos
<i>Mycetarotes</i> (2)	Pequeno	Carcaças de insetos e matéria vegetal em decomposição
<i>Mycetosoritis</i> (5)	Pequeno	Matéria vegetal em decomposição
<i>Cyphomyrmex</i> (36)	Pequeno	Matéria vegetal em decomposição
<i>Mycetophylax</i> (6)	Pequeno	Matéria vegetal em decomposição
<i>Mycetagroicus</i> (3)	-	-
<i>Sericomyrmex</i> (19)	Médio	Frutas
<i>Trachymyrmex</i> (41)	Médio	Carcaças de insetos, partes de flores e matéria vegetal em decomposição
<i>Pseudoatta</i> (1)	-	-
<i>Acromyrmex</i> (26)	Grande	Material vegetal fresco
<i>Atta</i> (14)	Muito grande	Material vegetal fresco

1.1. Sistemática de formigas da tribo Attini e seus fungos simbiotes

A classificação das formigas da tribo Attini tem sido foco de muitas discussões. Existe um consenso de que as formigas cortadeiras *Acromyrmex* e *Atta* sejam os gêneros mais derivados da tribo (Weber, 1972a, Hölldobler, Wilson, 1990). Com relação aos demais gêneros, existem muitas hipóteses.

Kusnesov (1963), separa os diferentes gêneros em dois grupos informais: o “Palaeoattini”, que representa a primeira derivação da tribo e estando nele incluídos os gêneros *Apterostigma*, *Myrmicocrypta* e *Mycocepurus*; e o “Neoattini”, que inclui as cortadeiras *Atta* e *Acromyrmex*, que são consideradas as mais derivadas.

Baseado na biologia geral e no forrageamento, Leal (1998) separa os gêneros de Attini em três grupos. Um grupo basal que inclui os gêneros: *Apterostigma*, *Cyphomyrmex*, *Mycetarotes*, *Mycetophylax*, *Mycocepurus* e *Mirmycocrypta*; um grupo intermediário que inclui os gêneros *Mycetosorites*, *Sericomyrmex*, e *Trachymyrmex*; e um mais derivado que inclui as cortadeiras *Acromyrmex* e *Atta*, além da parasita *Pseudoatta*.

Hölldobler, Wilson (1990) subdividem a tribo Attini em dois maiores grupos: os atíneos derivados, que compreendem cinco gêneros, (quatro se o gênero *Peseudoatta* não for separado de *Acromyrmex*): *Atta*, *Acromyrmex*, *Pesudoatta*, *Trachymyrmex* e *Sericomyrmex*; e os atíneos primitivos, que compreendem os demais gêneros: *Mycetarotes*, *Myrmicocripta*, *Mycocephurus*, *Apterostigma*, *Cyphomyrmex*, *Mycetosoritis* e *Mycetophylax*. Schultz, Meier (1995) e Wetterer et al. (1998) também consideram os gêneros *Atta*, *Acromyrmex*, *Trachymyrmex* e *Sericomyrmex* como derivados e os demais gêneros como primitivos, sendo *Myrmicocripta*, considerado por estes autores, como o gênero mais basal dentro da tribo.

Devido ao gênero *Trachymyrmex* apresentar algumas espécies mais relacionadas ao gênero *Acromyrmex* e outras espécies, mais relacionadas ao gênero *Sericomyrmex*, é muitas vezes considerado como sendo parafilético (Schultz, 2000). Porém, vários caracteres morfológicos diferem as *Trachymyrmex* dos demais gêneros de Attini, indicando a monofilia do gênero (Mayhé-Nunes, Brandão, 2002).

Os gêneros *Trachymyrmex* e *Sericomyrmex*, com relação ao uso de substrato e história de vida, parecem ser intermediários entre os atíneos primitivos e os derivados (Weber, 1972a, Hölldobler, Wilson, 1990).

Alguns autores classificam o gênero *Cyphomyrmex* como o mais primitivo (Wilson, 1971, Weber, 1972a, Hölldobler, Wilson, 1990) devido a estas formigas cultivarem leveduras ao invés de fungos filamentosos como as demais. No entanto, análises filogenéticas indicam que o gênero *Cyphomyrmex* não é o mais primitivo, sugerindo que o cultivo de leveduras pode ser um comportamento derivado (Schultz, Meier, 1995; Meier, Schultz, 1996). Em culturas artificiais, leveduras simbiotes de *Cyphomyrmex* revertem para fase filamentosa, indicando que este fungo é capaz de alterar sua forma dependendo das condições de cultivo. Devido às leveduras, cultivadas por *Cyphomyrmex*, serem derivadas de um ancestral em estado micelial (Mueller et al., 1998) e a maioria dos atíneos basais cultivarem fungos filamentosos (Schultz, Meier, 1995; Meier, Schultz, 1996; Schultz, 1998), o ancestral de formigas da tribo Attini provavelmente cultivavam hifas, em vez de levedura em seus ninhos (Mueller et al., 2001).

Assim como *Atta* e *Acromyrmex* o gênero descrito recentemente por Brandão; Mayhe-Nunes (2001), *Mycetagroicus*, pertence ao grupo informal “Neoattini”, citado por Kusnesov (1963). Porém o polimorfismo existente em formigas cortadeiras, mas não em *Mycetagroicus*, é um argumento contra uma possível proximidade filogenética de *Atta* e *Acromyrmex* com

Mycetagroicus, sendo que a definição da relação deste gênero com os demais atíneos, ainda necessita de maiores estudos (Brandão, Mayhe - Nunes, 2001).

Com relação aos fungos simbios, características culturais, bioquímicas e micromorfológicas indicam que estes microrganismos são basidiomicetos subdivididos em quatro grupos. G1: fungos cultivados por *Atta*, *Acromyrmex*, *Trachymyrmex*, *Sericomyrmex*; G2 e G4: fungos simbios de *Apterostigma*; e G3: fungos simbios de *Cyphomyrmex*, *Mycetosoritis*, *Mycetophylax*, *Mycocephalus*, *Mycetarotes*, *Myrmicocrypta* (Chapela et al., 1994; Mueller, 2002).

Os fungos cultivados pelas diferentes formigas são distintos entre si e parecem ter evoluído com os insetos. Chapela et al. (1994) propuseram que os fungos do grupo 1, que são propagados clonalmente, são geneticamente similares. O mesmo ocorre com os fungos do grupo 2 e 4 (Mueller, 2002). Por outro lado, os fungos do grupo 3 são geneticamente diversos, indicando que estão mais relacionados com fungos de vida livre do que com outros fungos de atíneos.

Os fungos simbios de atíneos derivados são muito semelhantes (Silva-Pinhati et al., 2004), mas são distintos dos fungos cultivados pelos atíneos primitivos. A monofilia do hábito de cultivar fungos nas formigas da tribo Attini (Schultz, Meyer, 1995) indica que o estudo das características dos fungos cultivados pelos atíneos primitivos pode ser útil para revelar como se iniciou a simbiose.

A identificação completa dos fungos simbios de formigas da tribo Attini é realizada utilizando-se principalmente estruturas taxonomicamente informativas denominadas basidiomas ou corpos de frutificação. Foram encontrados basidiomas de fungos simbios de formigas em quase todos os gêneros de atíneos, exceto *Sericomyrmex* e *Mycetagroicus*. Estes fungos, na maioria das vezes, foram classificados como pertencentes à tribo Leucocoprineae (Agaricaceae, Agaricales, Basidiomycota) (Chapela et al., 1994; Mueller, et al., 1998; North, 1997).

Pagnocca et al. (1990) classificaram basidiomas encontrados em ninhos de *Acromyrmex hispidus falax* como sendo *Leucoagaricus gongylophorus*, e comprovaram a identidade genética entre os basidiomas e o estado micelial do fungo isolado através de RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA). Basidiomas encontrados em ninhos de *Atta sexdens rubropilosa* foram descritos como *Leucoagaricus gongylophorus* (Bononi et al., 1981; Cruz, Batista Filho, 1993) ou *Leucoagaricus weberi* (Muchovej et al., 1991), apesar de

estudos sugerirem que algumas cortadeiras do gênero *Atta* e *Acromyrmex* cultivam a mesma espécie de fungo (Stradling, Powell, 1986).

O mutualismo entre fungos e formigas é caracterizado por antiga congruência evolutiva em que grupos específicos de formigas têm se especializado em cultivar um grupo específico de fungos. A maioria das formigas da tribo Attini cultiva fungos pertencentes aos gêneros *Leucocoprinus* e *Leucoagaricus*, da família Lepiotaceae (Chapela et al., 1994; Mueller et al., 1998). Pelo fato dos atíneos mais basais cultivarem fungos da tribo Leucocoprineae, provavelmente, a fungicultura se originou com estes fungos (Mueller et al., 2001). Somente os atíneos primitivos do gênero *Apterostigma* têm adquirido secundariamente fungos da família Tricholomataceae e Pterulaceae, que são distantes dos fungos cultivados pelas demais representantes da tribo (Chapela et al., 1994; Villesen et al., 2004; Munkacsí et al., 2004). Como a formiga *Apterostigma* também cultiva fungo da família Lepiotaceae (Mueller et al., 1998), é provável que a transição para fungos tricolomatáceos ocorreu na derivação desta espécie (Mueller et al., 2001), assim com ocorreu com a transição para fungos pteruláceos.

1.2. Transmissão vertical versus horizontal de fungos entre as formigas da tribo Attini

A congruência entre as árvores de filogenia de fungos simbios, baseadas em marcadores moleculares, e dos atíneos derivados, baseadas em caracteres morfológicos (Chapela et al., 1994; Hinkle et al., 1994), é uma evidência de transmissão vertical do fungo simbiote e co-evolução iniciada quando um ancestral de formigas da tribo Attini associou-se a um ancestral dos fungos simbios, ou seja, com uma única aquisição de um fungo ancestral. Esta hipótese exige que tanto os fungos simbios, como as formigas, sejam monofiléticos. Embora haja indicações de monofilia das formigas da tribo Attini (Schultz, Meier, 1995), o mesmo não ocorre com todos os fungos simbios.

Uma outra evidência da transmissão vertical dos fungos de atíneos é o fato de rainhas de *Atta*, *Acromyrmex* e *Trachymyrmex*, terem sido observadas carregando porções do fungo do ninho de origem para o descendente (Weber, 1966 e 1972a). Esta transmissão também foi observada em formigas do gênero *Cyphomyrmex* (Mueller, 2002), mas não há observações de campo caracterizando o carregamento do inóculo do fungo pelas rainhas dos demais gêneros. No entanto, algumas análises moleculares de populações de fungos fornecem evidência indireta de transmissão vertical em simbios de formigas primitivas e derivadas (Mueller, e

al., 1996; Bot et al., 2001; Green et al., 2002), sendo que em diferentes ninhos de mesma espécie podem ser encontrados fungos geneticamente idênticos, indicando que eles podem ter sido clonalmente derivados de um ancestral comum (Mueller, 2002). As mesmas análises que sustentam a transmissão vertical de clones de fungos também revelaram níveis significativos de transferência horizontal entre espécies ou mesmo entre gêneros de atíneos.

A recente descoberta da identidade genética de alguns fungos de vida livre com alguns fungos cultivados por atíneos primitivos sugere que muitos fungos são constantemente domesticados de populações de vida livre (Mueller et al., 1998). Há também evidências genéticas da ocorrência de transferência horizontal destes fungos entre diferentes espécies e até entre gêneros dos atíneos (Mueller et al, 1996; Mueller et al, 1998; Adams et al, 2000a; Bot et al, 2001; Green et al, 2002), contradizendo a hipótese de simples domesticação seguida por propagação clonal.

A propagação clonal dos fungos desde a origem do mutualismo, pode ser regra geral para muitas espécies de formigas da tribo Attini, a curto prazo, no período evolucionário (Mueller et al., 1996). Mas, a longo prazo, esta história pode ser complexa, envolvendo transferência horizontal entre linhagens e repetidos ciclos de domesticação de fungos de vida livre, seguidos por retorno destes ao estágio de vida livre (Mueller et al., 1998).

1.3. Aspectos nutricionais e co-evolução de formigas e fungos

A existência de um mecanismo complexo de integração, caracterizado por codependência nutricional, fisiológica e antibiótica, indica uma longa história co-evolucionária (Mueller, 2002) entre formigas e fungos. Nestas condições, esperam-se encontrar integrações metabólicas entre os simbioss, desenvolvidas durante estes anos de co-evolução.

A adaptação mútua entre formigas e fungos está presente em alguns fungos simbioss. Um exemplo disso são os gongilídeos (estruturas localizadas nas hifas que são ricas em nutrientes) que são produzidos geralmente por simbioss de formigas derivadas (Mueller et al., 2001), embora já tenham sido observados em fungos simbioss de formigas primitivas (A.C.O. Silva-Pinhati, não publicado), indicando que esta estrutura pode ser uma inovação evolucionária derivada de estruturas homólogas de fungos de atíneos primitivos.

Existe uma tendência para o aumento do tamanho das colônias, da estrutura dos ninhos e do corpo das operárias, de acordo com a derivação dos gêneros dentro da tribo Attini

(Hölldobler, Wilson, 1990). O tamanho das colônias, a complexidade dos ninhos e o tamanho das operárias, são relativamente semelhantes entre os atíneos primitivos e bem menores que aqueles apresentados pelas formigas cortadeiras *Acromyrmex* e *Atta* (Leal, 1998).

As colônias de *Apterostigma* e *Cyphomyrmex* são as menores dentro da tribo, enquanto que *Acromyrmex* e *Atta* são as maiores (Weber, 1972a). Os demais gêneros como *Myrmicocrypta*, *Sericomyrmex* e *Trachymyrmex*, apresentam tamanhos intermediários muito mais próximos de *Apterostigma* e *Cyphomyrmex* do que de *Acromyrmex* e *Atta* (Weber, 1972a) (tabela 1).

A nutrição das formigas também teve que se adaptar para sustentar o aumento da população. Assim, as quantidades de substrato coletadas para o cultivo de fungo pelos atíneos primitivos são similares entre si, mas muito inferiores às coletadas por formigas cortadeiras (Leal, 1998). Além disso, há uma dependência nutricional das formigas com relação aos fungos simbiotes, uma vez que eles fornecem enzimas que degradam polissacarídeos vegetais (Bacci, et al. 1995). Dessa forma, espera-se que o fungo simbiote destas formigas assimile estes polissacarídeos. De fato, a estratégia deste fungo para acessar e utilizar estes nutrientes dos vegetais, foi estudada em nosso laboratório para a formiga *Atta sexdens*, uma espécie derivada (Siqueira et al., 1998) e *Mycetarotes parallelus*, uma espécie primitiva (Silva, 2000), sendo constatado que os fungos podem servir de intermediários para a assimilação de polímeros pelas formigas.

Também, os fungos simbiotes sofreram alterações metabólicas para suportar o aumento da complexidade dos ninhos das formigas (Silva, 2000). Assim, o fungo simbiote de *M. parallelus* apresenta um crescimento muito mais rápido do que *L. gongylophorus*, simbiote de *Atta sexdens*. Porém o crescimento lento de *L. gongylophorus* pode ser compensado por sua alta capacidade de produzir enzimas. Portanto, além da biomassa fúngica, a quantidade de enzimas produzidas pelo fungo poderia influenciar diretamente na alimentação das formigas, e conseqüentemente no tamanho dos ninhos. Dessa forma o desenvolvimento de uma alta capacidade de produzir despolimerases parece ser uma característica importante na evolução das formigas da tribo Attini.

1.4. Sistemática do gênero *Atta*

O gênero *Atta* Fabricius, 1805 (Hymenoptera; Formicidae; Myrmicinae; Attini), compreende os atíneos popularmente conhecidos por saúvas. No Brasil, encontra-se o maior

número de espécies deste gênero, ocupando toda a extensão do País (Della Lucia, 1993). Tal distribuição sugere que aqui tenha ocorrido a sua origem, supostamente na região Norte, onde hoje se encontra a Floresta Amazônica (Weber, 1972a).

A sistemática do gênero *Atta* foi sempre controversa. Segundo Borgmeier (1950) “um dos aspectos menos agradáveis da taxonomia das formigas é o fato de ela ser baseada quase que exclusivamente em operárias, isto é, em fêmeas estéreis”. Assim, a distinção das espécies de *Atta* através de caracteres morfológicos é dificultada pelo polimorfismo das castas, além da variação de certos caracteres entre operárias do mesmo tamanho.

A análise da genitália masculina mostrou-se uma ferramenta mais segura para a sistemática de *Atta*, que inicialmente foi caracterizada com apenas 3 espécies, *Atta cephalotes*, *Atta insularis* e *Atta sexdens*, sendo as demais formas consideradas como subespécies ou variedades (Emery, 1913). Quase dez anos mais tarde Emery (1922) reconheceu *Atta colombica* e *Atta laevigata* como espécies, mas distribuiu estas 5 espécies em 3 grupos. No mesmo caminho Borgmeier (1939) considerou 9 espécies, 6 subespécies e 11 variedades. Com base no trabalho de Emery, Gonçalves (1942) validou 11 espécies e 18 subespécies, definiu os subgêneros Archeatta, Neoatta e Atta, e descreveu duas novas espécies, *Atta goiana* (Gonçalves, 1942) e *Atta capiguara* (Gonçalves 1944). Posteriormente, o número de subgêneros aumentou com a inclusão de Paleatta e Epiatta e as espécies passaram a ser 14, com 16 subespécies definidas (Borgmeier, 1950).

Borgmeier (1959) sinonimizou Epiatta e Neoatta, e considerou somente 14 espécies. Em seguida, três das subespécies, as de *Atta sexdens*, foram novamente consideradas (Gonçalves, 1963; Mariconi, 1970), totalizando 16 formas entre espécie e subespécie. Com a descrição de *Atta silvai*, o número de espécies foi elevado para 15 (Gonçalves, 1982), mas, em seguida, esta nova espécie foi sinonimizada a *Atta laevigata* (Delabie, 1998), de modo que o número de espécies voltou a ser 14. Finalmente, as três subespécies de *Atta sexdens* foram sinonimizadas e chamadas simplesmente de *Atta sexdens* (Bolton, 1995). Atualmente, as seguintes espécies são descritas: *A. colombica* Guérin, 1845; *A. insularis* Guérin, 1845; *A. mexicana* (F. Smith, 1858); *A. saltensis* Forel, 1913; *A. texana* (Buckley, 1860); *A. bisphaerica* Forel, 1908; *A. capiguara* Gonçalves, 1944; *A. cephalotes* (L., 1758); *A. goiana* Gonçalves, 1942; *A. laevigata* (F. Smith, 1858); *A. opaciceps* Borgmeier, 1939; *A. robusta* Borgmeier, 1939; *A. sexdens* (L., 1758) e *A. vollenweideri* Forel, 1893. Com exceção das cinco primeiras espécies, as demais são encontradas no Brasil.

2. ESTUDOS DESENVOLVIDOS NESTA TESE

Os objetivos deste trabalho foram estudar as formigas da tribo Attini e seus fungos simbiotes, buscando contribuir no esclarecimento de alguns aspectos da simbiose que ainda não estão bem definidos, como: a transmissão dos fungos, se horizontal ou vertical; o caminho evolutivo e nutricional que estes simbiotes tomaram; e a sistemática do gênero *Atta* que é sempre controversa.

Para estudar os fungos é necessário, primeiramente realizar o isolamento e cultivo destes microrganismos, sendo que este procedimento normalmente é dificultado devido à baixa velocidade de crescimento de fungos simbiotes, e também pela presença de muitos microrganismos contaminantes nos ninhos das formigas. Para facilitar o estudo do fungo simbiote, nós desenvolvemos um método que aumenta a eficiência de isolamento e cultivo, quando comparado àqueles obtido por método tradicional (Capítulo II). Este novo método vem sendo utilizado para isolar e manter culturas de laboratório de fungos simbiotes de diversas espécies de formigas da tribo Attini.

A seguir, nós utilizamos métodos moleculares para estudos sobre a sistemática e, a maneira de transmissão dos fungos simbiotes das formigas cortadeiras (Capítulo III), além de estudos para caracterização do metabolismo de polissacarídeos pelos fungos simbiotes de formigas de diversos gêneros da tribo Attini (Capítulo IV) e de estudos para a caracterização morfológica dos gongilídeos de fungos simbiotes de formigas nos gêneros *Atta*, *Acromyrmex* e *Trachymyrmex* (Capítulo V). Estes estudos são discutidos de forma a reconstituir a história evolutiva e nutricional dos simbiotes.

Finalmente, nós apresentamos os resultados sobre a sistemática molecular das formigas do gênero *Atta*, que foi sempre muito controversa (Capítulo VI), devido ao estudo deste gênero ser, até o momento, baseado em caracteres morfológicos que, embora extremamente úteis, por vezes não conseguem resolver alguns ramos da filogenia. Dessa forma, os estudos filogenéticos realizados nesta tese podem, juntamente com estudos morfológicos, comportamentais, ecológicos e fisiológicos, colaborar para reconstrução filogenética do gênero *Atta*.

3. REFERÊNCIAS

- Adams, R. M. M.; Mueller U. G.; Holloway A. K.; Green A. M.; Narozniak J. Garden sharing and garden stealing in fungus-growing ants. *Naturwissenschaften* 87: 491-493, 2000a.
- Adams, R. M. M.; Mueller, U. G.; Schultz, T. R.; Norden, B. Agro-predation: usupation of attine fungus garden by *Megalomyrmex* ants. *Naturwissenschaften* 87: 549-554, 2000b.
- 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*. *Antonie van Leeuwenhoek Amsterdam*, v. 67, n. 4, p. 385-386, 1995.
- 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.
- Bolton, B. *A new general catalogue of the ants of the world*. Harvard University Press, Cambridge, MA, USA, 1995.
- Bononi, V. L. R.; Autuori, M.; Rocha M. B. *Leucocoprinus gongylophorus* (Möller) Heim, o fungo do formigueiro de *Atta sexdens rubropilosa* Forel. *Rickia*, v. 9, p. 93-97, 1981.
- Borgmeier, T. Nova contribuição para o conhecimento das formigas neotropicais (Hym. Formicidae). *Revista de Entomologia* 10 (2): 403-428, 1939.
- Borgmeier, T. *Estudos sobre Atta* (Hym. Formicidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 48, p. 239-263, 1950.
- Borgmeier, T. Revision der Gattung *Atta* Fabricius (Hymenoptera, Formicidae). *Studia Entomológica*, v. 2 (1-4), p. 321-390, 1959.
- Bot, A. N. M.; Rehner, S. A.; Boomsma J. J. Partial incompatibility between ants and symbiotic fungi in two sympatric species of *Acromyrmex* leaf-cutting ants. *Evolution*, 55:1980-2001, 2001.
- Brandão, C. F. R.; Nunes, A. M. A new fungus-growing ant genus *Mycetagroicus* gen. n., with the description of three new species and comments on the monophyly of the Attini (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, 38: 639-665, 2001.
- Brandão, C. R. F. Systematic revision of the neotropical ant genus *Megalomyrmex* Forel (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae) with the description of thirteen new species. *Arquivos de Zoologia* 31: 411-481, 1990.

- Chapela, I. H.; Rehner, S. A.; Schultz, T. R.; Muller, U. G. Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi. *Science*. v. 266, p.1691-1694, 1994.
- Cruz, B. P. B.; Batista Filho, A. Manifestação da forma perfeita de *Leucocoprinus gongylophorus* (Möller) Heim em saúveiro artificial de *Atta sexdens rubropilosa* Forel. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 60, p. 66-69, 1993.
- Currie, C., Mueller, U. G. & Malloch, D. The agricultural pathology of ant fungus gardens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **96**, 7998-8002, 1999a.
- Currie, C. R. A Community of Ants, Fungi, and Bacteria: A Multilateral Approach to Studying Symbiosis. *Annu. Rev. Microbiol.* 55:357, 2001.
- Currie, C. R.; Scott, J. A.; Summerbell, R. C.; Malloch, D. Fungus-growing ant use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *Nature*, 398: 701-704, 1999b.
- Currie, C. R.; Wong B.; Stuart, A. E.; Schultz, T. R.; Rehner, S. A.; Mueller, U. G., Sung, G. H., Spatafora, J. W.; Strauss, N. A. Ancient tripartite coevolution in the attine ant-microbe symbiosis. *Science*, 299: 386-388, 2003.
- Delabie, J. H. C. *Atta silvai* Gonçalves, sinônimo júnior de *Atta laevigata* (Fred. Smith) (Hymenoptera, Formicidae, Attini). *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 41 (2-4), p. 339-341, 1998.
- Della Lucia, T. M. C. As formigas cortadeiras. Viçosa. Ed. *Folha de Viçosa*. 262 p, 1993.
- Diniz, J. L. M., Brandão, C. R. F. , Yamamoto, C. I. Biology of *Blephariatta* ants, the sister group of the Attini: a possible origem of fungus-ants symbiosis. *Naturwissenschaften*. 85:270-274, 1998.
- Emery, C. Études sur les Myrmicinae: V-VII. *Annales de la Société Entomologique de Belgique*. 57:250-262, 1913.
- Emery, C. Formicidae: Myrmecinae. IN: *Genera Insectorum*. v. 174B, editado por P Wytsman. Brussels: Verteneuil & Desmet. p. 95-206, 1922.
- Green, A. M.; Adams, R. M. M.; Mueller, U. G. Extensive exchange of fungal cultivars between sympatric species of fungus-growing ants. *Molecular Ecology* 11: 191-195, 2002.
- Gonçalves, C. R. Contribuição para o conhecimento do gênero *Atta* Fabr., das formigas saúvas. *Boletim da Sociedade Brasileira de Agronomia*, v. 5, (3), p. 333-358, 1942.

- Gonçalves, C. R. Descrição de uma nova saúva brasileira. *Revista Brasileira de Biologia*, v. 4 (2), p. 233-2238, 1944.
- Gonçalves, C. R. *Atta silvai*, nova espécie de formiga saúva (Hymenoptera, Formicidae). *Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*, v. 5 (2), p.173-178, 1982.
- Gonçalves, C. R. Nota sobre a sistemática de *Atta sexdens* (L., 1758) e de suas subespécies. (Hym., Formicidae). *Boletim Fitossanitário*, v. IX (1 e 2), p. 1-3, 1963.
- Hinkle, G.; Wetterer, J. K.; Schultz, T. R.; Sogin, M. L. Phylogeny of the attine fungi based on analysis of small subunit ribosomal RNA gene sequences. *Science*, Washington, v. 226, n. 5191, p. 1695-1697, 1994.
- Hölldobler, B.; Wilson, E. O. *The ants*. Cambridge: Harvard Univ. Press, p. 596-608, 1990.
- Kusnezov, N. Zoogeografia de las hormigas em Sudamerica. *Acta Zoológica Lilloana*. 19: 25-185, 1963.
- Leal, I. R. *Ecologia e história natural de formigas Attini em vegetação de cerrado*. Campinas, 1998. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas (Ecologia) – Instituto de Biologia) - Universidade Estadual de Campinas.
- Mariconi, F. A. M. *As saúvas*. São Paulo, Ed. Agronômica Ceres. 167 p, 1970.
- Martin, J. S.; Martin, M.M.. The biochemical basis for the symbiosis between the ant, *Atta colombica tonsipes*, and its food fungus. *J. Insect. Physiol.* 16: 109-119 1970.
- Meier, R.; Schultz, T. R. Pilzzucht und Blattschneiden bei Ameisen - Präadaptationen und evolutive Trends. *Sitzungsber. Ges. Naturforsch. Freunde Berl. N.F.* 35, 57-76, 1996.
- Mueller, U. G.; Lipari, S. E.; Milgroom, M. G. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) fingerprinting of symbiotic fungi cultured by the fungus-growing ant *Cyphomyrmex minutus*. *Molecular Ecology*, 5: 119-122, 1996.
- Mueller, U. G.; Rehner, S. T.; Schultz, T. R. The Evolution of Agruculture in Ants. *Science*, v. 281, pp. 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 of Biology*, New York, v. 76, n. 2, p. 169-197, 2001.
- Mueller, U. G. Ant versus Fungus versus Mutualism: Ant-Cultivar Conflict and the Deconstruction of the Attini Ant-Fungus Symbiosis. *American Naturalist*, v. 160, pp. S67-S98, 2002.

- Mueller, U. G.; Geraldo, N. Fungus-farming insects: Multiple origins and diverse evolutionary histories. *PNAS*. 23:15247-15249, 2002.
- Mayhé-Nunes, A. J. *Filogenia de los Attini (Hym., Formicidae): un aporte al conocimiento de las hormigas fungívoras*. Caracas, 1995. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidad Simón Bolívar.
- Mayhé-Nunes, A. J.; Brandão, C.R.F. Revisionary studies on the Attini ant genus *Trachymyrmex* Forel. Part 1: Definition of the genus and the *Opuletus* group (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*. 40: 667-698, 2002.
- Muchovej, J. J.; Della Lucia, T. M., Muchovej, R. M. *Leucoagaricus weberi* sp nov. from a live nest of leaf-cutting ants. *Mycol. Res.*, v. 95, p.1308-1311, 1991.
- Munkacsi, A. B.; Pan, J. J.; Villesen, P.; Mueller, U. G.; Blackwell, M.; McLaughlin, D. J. Convergent coevolution in the domestication of coral mushrooms by fungus-growing ant. *Proc. Roy. Soc.*, in press.
- North, R. D.; Jackson, C. W.; Howse, P. E. Evolutionary aspects of ant-fungus interactions in leaf-cutting ants. *Tree.*, v. 12 p. 386-389, 1997.
- Pagnocca, F. C.; Silva, O. A.; Hebling-Beraldo, M. J.; Bueno, O.C.; Fernandes, J. B.; Vieira, P. C. Toxicity of sesame extracts to the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. *Bul. Entomol. Res.*, 80: 349-352, 1990.
- Quinlan, R. J., Cherrett, J. M. Role of substrate preparation in symbiosis between leaf-cutting ant *Acromyrmex-Octospinosus*(Reich)and its food fungus. *Ecological Entomology* 2 (2): 161-170, 1977.
- Quinlan, R. J.; Cherret, J. M. The role of fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L). *Ecol. Entomol.*, v. 4, p. 151-60, 1979.
- Schultz, T. R.; Meyer R. A phylogenetic analysis of the fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini) based on morphological characters of the larvae, *Syst. Entomol.*, v. 20, p. 337-370, 1995.
- Silva, A.C.O. *Isolamento do fungo simbiote da formiga *Mycetarotes parallelus* e avaliação de suas habilidades metabólicas*. Rio Claro, SP, 2000. (Master Degree Thesis. Instituto de Biociências, UNESP).

- Silva-Pinhati, A. C. O.; Bacci Jr, M.; Hinkle, G.; 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 symbiotic fungi of leaf-cutting ants (Attini: Formicidae). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 37, p. 1463-1472, 2004.
- Silva-Pinhati, A. C. O.; Bacci Jr.,M.; Siqueira, C. G.; Silva, A.; Pagnocca, F. C.; Bueno, O. C.; Hebling, M. J. A. Isolation and Maintenance of Symbiotic Fungi of Ants in the Tribe Attini (Hymenoptera: Formicidae). *Neotropical Entomology*, 2004 (no prelo).
- 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 the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 4820-4822, 1998.
- Stradling, D. J.; Powel, R. J.. The cloning of more highly productive fungal strains: a factor in the speciation of fungus growing ants. *Experientia*, v. 42, p. 962-964, 1986.
- Schultz, T. R.. The origin and evolution the fungus-growing ants: Clues from the phylogeny of the fungus-growing ants. IN: *Internationall Congress of Entomology* (21: 2000. Foz do Iguaçu), vol. 2, p. 865.
- Villesen, P.; Mueller, U. G.; Schutz, T. R.; Adans, R. M. M.; Bouck, A. C. Evolution of ant-cultivar specialization and cultivar switching in *Aperostigma* fungus-growing ants. *Evolution*, in press.
- Weber, N. A. The fungus growing ants. *Science*, v. 153, p. 587-604, 1966.
- Weber, N. A. *Gardening ants: the attinies*. The American Philosophical Society, Philadelphia, p. 23, 1972a.
- Weber, N. A. Fungus-culturing by ants. IN *Insect- fungus symbiosis: Mutualism and commensalism*, Monticlar: Allanhed e Osmun, p. 77-116, 1979.
- Wetterer, J. K; Schultz, T. R.; Meier, R. Phylogeny of fungus-growing ants (tribo Attini) based on mtDNA sequence and morphology. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 9: 42-47, 1998.
- Wilson, E. O. *The insect societies*. Cabridge: Belknap Press of Havard University Press, 1971. 548 p.

CAPÍTULO II

**Isolation and maintenance of symbiotic fungi of
ants in the tribe Attini (Hymenoptera:
Formicidae)**

Aceito pela revista Neotropical Entomology

ISOLATION AND MAINTENANCE OF SYMBIOTIC FUNGI OF ANTS IN THE TRIBE ATTINI (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

Ana Carla O. Silva-Pinhati, Maurício Bacci Jr., Célia G. Siqueira, Aline Silva, Fernando Carlos Pagnocca, Odair C. Bueno & Maria José A. Hebling.

Centro de Estudos de Insetos Sociais, Universidade Estadual Paulista.

Av. 24A, 1515. Rio Claro, SP. CEP 13506-900. Brazil.

RESUMO

O isolamento e a manutenção de fungos basidiomicetos simbiotes de formigas da tribo Attini tem sido dificultado pela baixa velocidade de crescimento desses fungos, bem como pela presença de muitos microrganismos que vivem na superfície do material que as formigas mantêm no interior nos ninhos como substratos para o crescimento dos seus fungos simbiotes. No presente trabalho nós descrevemos um método que aumenta em mais de sete vezes a eficiência de isolamento destes fungos, quando comparada àquela obtida por procedimentos tradicionais. Ninhos subterrâneos de formigas atíneas dos gêneros *Atta*, *Acromyrmex*, *Trachymyrmex* e *Mycetarotes* foram localizados e deles foram coletadas amostras contendo fungos simbiotes e formigas, que foram transportadas para o laboratório, onde as formigas foram capazes de limpar a cultura do fungo e estimular o seu crescimento. Em seguida, porções dos micélios foram assepticamente coletadas e transferidas para meio Yeast Nitrogen Base contendo glicose e cloranfenicol. Para facilitar a manutenção dos isolados em culturas de laboratório, diferentes nutrientes foram analisados para a elaboração de um meio de cultivo complexo, que possibilitou aumentar a velocidade de crescimento dos fungos e estocá-los por longos períodos. Este método foi aplicado com sucesso para os fungos simbiotes de todos os gêneros de formigas estudados, gerando, assim, um procedimento extremamente útil para a formação e manutenção de uma coleção representativa de diferentes fungos simbiotes de formigas da tribo Attini.

PALAVRAS-CHAVES: Formiga, Attini, basidiomiceto, fungo, simbiose.

ABSTRACT

The isolation and maintenance of symbiotic basidiomycete fungi living in association with ants of the tribe Attini has been hindered by the slow growth rate of these fungi and the presence of other microorganisms on the surface of the material which the ants maintain inside their nests to provide a growth substrate for their symbiont. In this paper we describe a method which increases the efficiency of isolation of these fungal symbionts by over seven fold as compared to traditional isolation procedures. Underground nests of attine ants of the genera *Atta*, *Acromyrmex*, *Trachymyrmex* and *Mycetarotes* were located, from which samples containing the fungal symbiont and ants were collected and transported to the laboratory where the ants were able to clean the fungal culture and stimulate its growth. As the symbiotic fungus grew, portions of its mycelium were collected and transferred to solid Yeast Nitrogen Base culture medium containing glucose and chloramphenicol. To facilitate the maintenance of the isolates in laboratory cultures, several nutrients were tested to formulate a complex culture medium for fast fungal growth and long-term storage. We successfully applied this methodology to the fungal symbionts of all the ant genera studied, thus producing a useful tool for the creation and maintenance of a comprehensive collection of fungi symbiotic of ants in the tribe Attini.

KEY WORDS: Ant, Attini, basidiomycete, fungus, symbiosis.

An obligate symbiosis exists between basidiomycete fungi and leaf-cutting ants of the tribe Attini. This association results in the exploitation of a great variety of vegetation by leaf-cutting ants (Cherrett 1968), which are important both as herbivores in natural habitats (Wint 1983) and pests in agriculture settings (Cherrett & Pregrine 1976, Fowler *et al.* 1986).

In their nests, leafcutter ants propagate the fungal symbiont by providing it with cut leaves and inhibiting the growth of competing microorganisms (Cherrett *et al.* 1989), while the fungus produces enzymes, principally polysaccharidases and proteinases (Boyd & Martin 1975, Cherrett *et al.* 1989, Siqueira *et al.* 1998), which digest the cut leaves to produce the nutrients necessary for the survival of the larvae and adult ants (Quinlan & Cherrett 1979, Bass & Cherrett 1995), the fungus growing in the cut leaves inside the nests being called ‘fungus garden’.

The dependence of Attini ants on their fungal symbiont is so great that the ants have never been seen living isolated from their fungi and any disruption to this symbiotic association is highly deleterious for the ants, thus the control of the attine pest ants would greatly benefit from an understanding of the mechanisms by which the fungal symbiont contributes to ant herbivory and survival. However, the study of these symbiotic fungi has been hampered by their slow growth rate in laboratory culture, which makes isolation and storage a very laborious and time-consuming task. To facilitate future work on Attini symbiotic fungi, we have improved the isolation procedure and developed a culture medium which allows fast fungal growth and which can also be used for long-term storage.

MATERIALS AND METHODS

Ants and nest location. Underground nests of Attini ants of the genera *Atta*, *Acromyrmex*, *Trachymyrmex* and *Mycetarotes* were located and samples of the fungus garden and ants collected and transported to the laboratory where the ants were able to reorganize the fungus garden material and clean the fungal culture and stimulate its growth. The ant species, nest location and date of sampling are listed in Table 1, all the ant species involved in this study being deposited in the Coleção Entomológica Adolph Hempel at the Instituto Biológico, São Paulo-SP, Brazil.

Culture media. For fungal isolation from the fungus garden we used Yeast Nitrogen Base Glucose Chloramphenicol (YNBGC) agar consisting of Yeast Nitrogen Base media (YNB, Difco 100697) supplemented with (gl^{-1}) glucose (Merck, 108342, Darmstadt, Germany), 5; agar-agar (Merck, 1.01614), 17; chloramphenicol (Sigma C-0378), 0.1 and sufficient 2M-NaOH to adjust the pH to 6.0. For maintenance we used YNB-glucose agar (i.e. YNBGC without chloramphenicol).

To assess biomass production as a measure of growth we used unsupplemented Pagnocca's *et al.* (1990) liquid Medium A containing (gl^{-1}) glucose, 10; NaCl (Labsynth C1060.01.AH, São Paulo, Brazil), 5; peptone (Sigma P-0556), 5; malt extract (Difco 0186-01), 10, as well as Medium A agar (containing 17 gl^{-1} agar-agar). We also used liquid Medium A supplemented with (gl^{-1}) casein hydrolysate (Sigma 'Amicase' A-2427), 20; flaked oats (Maisvita, São Paulo, Brazil), 20; flaked soybean (Imalaia Oriente, Santa Gertrudes, Brazil), 20. Both unsupplemented and supplemented liquid Medium A had a final pH of 6.0. We also used YNB media supplemented with 5 gl^{-1} of one of the following: bovine albumin (Sigma A-6003), casein (Quimibrás 10578, São Paulo, Brazil), casein hydrolysate, egg albumin (Riedel de Hæn 188 01), gelatin (Sigma G-9382), glucose, flaked oats, flaked soybean, soybean flour (Sigma S-9633) or xylose (Sigma X-1500), the final pH being 6.0.

Based on the experimental evidence presented in this paper and published data we produced a new buffered and supplemented formulation of Pagnocca's Medium A agar that we called Medium B agar and which contained (gl^{-1}) glucose, 10; NaCl, 2; peptone, 2; malt extract, 10, agar-agar, 17; casein hydrolysate, 20; flaked soybean, 20; flaked oats, 20; dibasic

sodium phosphate, 3.8; citric acid, 2.5; final pH 5.0. All media were sterilized for 20 minutes at 120° C.

Fungal isolation and cultivation. The fungus garden material collected from underground nests of the different ant species was incubated (25° C, 80% humidity) for 10 to 20 days in the dark in petri dishes containing worker ants which cleaned the garden material by removing soil fragments to a different part of the petri plate. When white mycelial spots of the fungal symbiont appeared on the leaf material some of the mycelia was collected using aseptic technique and transferred to YNBGC agar in petri plates where it was incubated at 25°C in the dark for 30 days. Alternatively, the fungus garden material from underground nests was collected and immediately plated onto YNBGC agar and incubated at 25°C in the dark for 30 days. In both cases, after 30 days of cultivation on YNBGC agar the fungal isolates were subcultured to YNB-glucose agar (without chloramphenicol) and cultured for a further 30 days. To evaluate biomass production by the symbiotic fungus of the ant *Atta sexdens* (Linnaeus, 1758) (formerly *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908) on various carbon substrates we subcultured the fungus on YNB-glucose agar for 30 days to produce large amounts of mycelia which was collected and suspended in sterile water with a Potter homogenizer. A suitable volume (containing 2.1 ± 0.11 mg dry weight) of this suspension was transferred to tubes containing 5 ml of liquid Medium A (supplemented and unsupplemented), supplemented YNB media or supplemented culture media A agar and B agar. After 30 days static incubation at 25° C, liquid media without insoluble components was filtered through a 0.25 µm Millipore filter to collect the mycelia while for liquid media containing insoluble carbon sources (casein, gelatin, soybean, flaked flour or flaked oats) mycelia was harvested with a loop. In both cases the mycelia was dried at 65° C for 24h and weighed. Fungal growth in solid culture media was estimated based on the mycelial surface and density as previously described in Pagnocca *et al.* (1990).

Statistics. Cultures in liquid media were replicated six to ten times for each of the carbon sources. The determined dry weight values were expressed as means $\pm$ standard deviations, the Tuckey test being used to test for differences between the weight of mycelia produced in the different media and the Mann-Whitney test for differences between initial and final pH (Zar 1996).

RESULTS AND DISCUSSION

The maintenance of fungus garden material from ants' nests in the absence of ants resulted in the development of many filamentous fungi and yeasts which often overgrew the characteristic white spots of the symbiotic fungus (Fig. 1a) initially seen on the fungus garden material, and because of this only one in about 30 attempts resulted in the isolation of the symbiotic fungus.

Isolation efficiency was increased by keeping the fungus garden material in petri plates at 25° C and 80% humidity in the presence of worker ants which started to clean the fungus garden material by removing soil fragments to a different part of the plate, almost all soil debris being removed from the leaf material within 24 hours. This cleaning activity stimulated the growth of the fungal symbiont as characterized by the accumulation of white mycelial spots on the surface of the leaf material in the fungus garden (Fig. 1b). These spots were collected over the 20 days of the experiment and plated onto YNBGC agar, a procedure which resulted in one successful isolation out of every four attempts. As explained in the Materials and Methods, after 30 days of cultivation on YNBGC agar the fungal isolates were transferred to YNB-glucose agar (without chloramphenicol) and cultured for 30 days to produce larger amounts of mycelia. Few contaminants developed at this stage allowing the mycelia to be subcultured to YNB-glucose without antibiotics for further cultivation and maintenance.

Among the symbiotic fungi isolated (Table 1), those from *Atta*, *Acromyrmex* or *Trachymyrmex* ants exhibited white mycelium which slowly spread as a thin film over the YNB-glucose agar (Fig. 1c) and had swollen hyphal tips (Fig. 1d) called gongylidium (Chapela *et al.* 1994, Fisher *et al.* 1994), the isolates from *Mycetarotes* ants rarely, if ever, presenting gongylidia. In general, isolates started to become dark brown after 30 to 40 days so that further replication in fresh culture media results poor or no fungal growth, this loss of viability meaning that many replications are needed to maintain the isolates, making laboratory cultivation a continuous and exhaustive task.

To minimize laboratory work, attempts have been made to formulate a culture medium which was more efficient at maintaining laboratory cultures of symbiotic fungi. To accomplish that we investigated the growth rate of the *A. sexdens* fungal symbiont by cultivation in liquid Medium A and YNB containing different nutrients (Table 2), glucose and

xylose being used as controls because these simple carbohydrates efficiently support the growth of this fungus in laboratory cultivation and it has been proposed (Siqueira *et al.* 1998) that the production of glucose and xylose by the fungal degradation of starch and xylan is the major process for the generation of nutrients from the vegetal matter which the ants bring into their nests.

Our results (Table 2) using supplemented YNB confirm that the simple carbohydrates glucose and xylose were the most efficient carbon sources in respect to the production of fungal biomass, while the most efficient complex carbon sources was flaked oats, followed by gelatin, flaked soybean, bovine albumin, casein hydrolysate, soybean flour, egg albumin and casein. It seems, therefore, that the *A. sexdens* fungal symbiont is better adapted to grow on carbohydrates and not on proteinaceous substrates, the slow growth rate on proteins having also been reported for the symbiotic fungus of the ant *Atta colombica tonsipes* Santschi, 1929a (Martin & Martin 1970).

After 30 days incubation there was a statistically significant (Mann-Whitney test, 95% confidence limit) decrease in the original pH (6.0) of YNB broth supplemented with xylose to pH 4.8 and to pH 2.7 for YNB supplemented with glucose. Supplementation of YNB with bovine or egg albumin or flaked oats resulted in no significant pH change, while supplementation with gelatin, flaked soybean, soybean flour, casein or casein hydrolysate resulted in a small (but statistically significant) increase in pH to 6.2-6.3 (Table 2). It thus seems that metabolism of carbohydrates by fungal symbiont causes a decrease in pH while the metabolism of proteins either does not affect or slightly increases pH.

Medium A agar, described by Pagnocca *et al.* (1990), is normally used for culturing the fungal symbiont of *A. sexdens*. We tested the effect of supplementing liquid Medium A with casein hydrolysate, flaked soybean and flaked oats and found that the quantity of fungal biomass produced in supplemented liquid Media A after 30 days cultivation was over 2.5 times higher than in unsupplemented liquid Medium A (Table 2) and more than twice the biomass achieved in YNB-glucose. Both supplemented and unsupplemented liquid Medium A reached pH 5.0 after 30 days incubation, significantly different from their initial pH of 6.0 (Table 2). That supplemented liquid Medium A attained the same pH value as unsupplemented liquid Medium A may have been due to the fact that both media contained glucose and peptone, the metabolism of which had opposing effects on pH and which may have helped to stabilize the final pH of these media.

Considering the optimum pH values (around pH 5) reported for fungal symbionts of Attini ants (Silva 1999) and the good growth achieved on supplemented liquid Medium A we decided to buffer Medium A agar to pH 5.0 as described by Stoll & Blancard (1990) and to supplement it, as described in Materials and Methods, in order to produce what we called Medium B agar. We found that Medium B agar supports faster growth of the symbiotic fungus of *A. sexdens* than that found in Medium A agar and that although Medium B agar contained suspended particles of the insoluble components (flaked soybean and flaked oat) of the medium and appeared lumpy, removal of these particles by filtration (before agar addition) caused a decrease in fungal growth rate (Table 3). Cultures could be conserved for up to 40 days in Medium B agar instead of starting to become dark brown after 30 to 40 days as on YNB-glucose agar or Medium A agar, indicating that the mycelia is still viable, while there also appeared to be less contamination on Medium B agar. These characteristics indicate that Medium B agar is better optimized for the cultivation of Attini ant symbiotic fungi and can facilitate the maintenance of several isolates simultaneously.

The methods for the isolation and maintenance of Attini ant symbiotic fungi described in this paper will facilitate the formation of collections of the fungi associated with these ants, and thus help provide important information that may be useful for the control of those Attini ant species which are agricultural pests.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for the financial support of this work, as well as the Ph.D. degree fellowships of A. C. O. S. P., C. G. S. and A. S.

REFERENCES

- Bass, M. & J.M. Cherrett. 1995.** Fungal hyphae as a source of nutrients for the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. *Physiol. Entomol.* 20: 1-6.
- Boyd N.D. & M.M. Martin. 1975.** Faecal proteinases of the fungus growing ant, *Atta texana*: Properties, significance and possible origin. *J. Insect Physiol.* 21:1815-1820.
- Chapela, I.H., S.A. Rehner, T.R. Schultz & U.G. Mueller. 1994.** Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi. *Science* 266: 1691-1694.
- Cherrett, J.M. 1968.** The foraging behavior of *Atta cephalotes* L. (Hymenoptera, Formicidae) 1. Foraging pattern and plant species attacked in tropical rain forest. *J. Animal Ecol.* 37: 387-403.
- Cherrett, J.M & D.J. Peregrine. 1976.** A review of the status of leaf-cutting ants and their control. *Ann. Appl. Biol.* 84: 124-128
- Cherrett, J.M., R.J. Powell & D.J. Stradling. 1989.** The mutualism between leaf-cutting ants and their fungus, p.93-120. In N. Wilding, N.M. Collins, P.M. Hammond & J.F. Weber (eds.), *Insect-fungus interactions*. Academic Press, San Diego, 146p.
- Fisher, P., D.J Stradling & D.N. Pegler. 1994.** *Leucoagaricus* basidiomata from a live nest of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. *Mycol. Res.* 98: 884-888.
- Fowler, H.G., L.C. Forti, V.P Silva, & M.B Saes. 1986.** Economic of grass-cutting ants, p.18-35. In C.S. Lofgren, & R.K. Vandermeer (eds.), *Fire ants and leaf-cutting ants. Biology and management*. Westview Press, Bolder, Colorado and London, 253p.
- Martin, J.S. & M.M. Martin. 1970.** The biochemical basis for the symbiosis between the ant, *Atta colombica tonsipes*, and its food fungus. *J. Insect. Physiol.* 16: 109-119.
- Pagnocca, F.C., O.A. Silva, M.J. Hebling-Beraldo, O.C. Bueno, J.B. Fernandes & P.C. Vieira. 1990.** Toxicity of sesame extracts to the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. *Bul. Entomol. Res.* 80: 349-352.
- Quinlan, R.L. & J.M. Cherrett. 1979.** The role of the fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.). *Ecol. Entomol.*, 4: 151-160.
- Silva, A.C.O. 1999.** Isolamento do fungo simbiote da formiga *Mycetarotes parallelus* e avaliação de suas habilidades metabólicas. Rio Claro, SP, Master Degree Dissertation. Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, 104p.

- Siqueira, C.G., M. Bacci, Jr., F.C. Pagnocca, O.C. Bueno & M.J.A Hebling. 1998.** Metabolism of plant polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of the ant *Atta sexdens* L. Appl. Environm. Microbiol. 64: 4820-4822.
- Stoll, V.S. & J.S. Blancar. 1990.** Buffers: Principles and practice, p. 31-32. In M.P. Deutscher (ed.), Guide to protein purification. Pasadena Academic Press, Pasadena, v. 182, 45p.
- Wint, G.R.W. 1983.** Leaf damage in tropical rain forest canopies. p. 229-239. In S.L. Sutton, T.C. Whitmore & A.C.Chadwick (eds.), Tropical rain forest: Ecology and management. British Ecological Society, Blackwell Scientific, Oxford, 245p.
- Zar, J.H. 1996.** Bioestatistical analysis, 3rd ed. Prentice-Hall do Brasil, Ltda, Rio de Janeiro, Brazil, 1996, 663p.

Table 1. Attini ants from which symbiotic fungi have been isolated.

Ant	Nest location¹	Isolation date
<i>Atta sexdens</i> (Linnaeus, 1758)	Rio Claro	Aug, 1997
<i>Atta capiguara</i> Gonçalves, 1944	Botucatu	Sep, 1995
<i>Atta laevigata</i> (Fr. Smith, 1858b)	Rio Claro	Nov, 1995
<i>Atta cephalotes</i> (Linnaeus 1758)	Almeirin	Aug, 1997
<i>Acromyrmex crassispinus</i> (Forel, 1907)	Rio Claro	Sep, 1995
<i>Acromyrmex hispidus fallax</i> Santschi, 1925	Rio Claro	Mar, 1996
<i>Trachymyrmex fuscus</i> Emery, 1834	Rio Claro	Dec, 1998
<i>Mycetarotes parallelus</i> (Emery, 1905b)	Rio Claro	Jul, 1997

¹All the collection sites, except for the *A. cephalotes* site, were in the Brazilian state of São Paulo. *A. cephalotes* was collected in the Brazilian state of Pará.

Table 2. Weight of mycelia and final pH (mean $\pm$ SD) of liquid culture media after growth of the symbiotic fungus of *A. sexdens*.

Medium	Weight of mycelia ¹ (mg, dry weight)	pH
Supplemented ² Medium A (9) ³	34.4 $\pm$ 8.82 a	5.0 $\pm$ 0.11*
Medium A (9)	13.2 $\pm$ 1.44 b	5.0 $\pm$ 0.11*
YNB-xylose (9)	15.5 $\pm$ 0.91 b	4.8 $\pm$ 0.12*
YNB-glucose (9)	14.6 $\pm$ 0.91 b	2.7 $\pm$ 0.11*
YNB-flaked oats (7)	12.0 $\pm$ 1.33 b, c	6.1 $\pm$ 0.11
YNB-gelatin (10)	9.4 $\pm$ 0.32 c, d	6.3 $\pm$ 0.13*
YNB-flaked soybean (9)	8.3 $\pm$ 1.19 d	6.2 $\pm$ 0.09*
YNB-bovine albumin (8)	7.9 $\pm$ 0.8 d	5.9 $\pm$ 0.33
YNB- casein hydrolysate (8)	7.6 $\pm$ 0.38 d	6.3 $\pm$ 0.23*
YNB-soybean flour (8)	6.4 $\pm$ 0.63 d	6.2 $\pm$ 0.12*
YNB-egg albumin (6)	5.1 $\pm$ 0.58 d	5.9 $\pm$ 0.11
YNB-casein (6)	4.7 $\pm$ 0.5 d	6.2 $\pm$ 0.11*

¹Values followed by different letters are significantly different by the Tuckey test (95% confidence limit).

² Supplemented with (gl⁻¹) casein hydrolysate, 20: flaked soybean 20; flaked oats, 20.

³ Number of replicates.

*Values significantly different from the initial pH value (6.0) by the Mann-Whitney test (95% confidence limit).

Table 3. Relative growth of the symbiotic fungus of *A. sexdens* in different solid culture media.

Medium	Relative Growth (30 days)
Medium A agar (8) ¹	2 +
Medium B agar (9)	5 +
Filtered ² Medium B agar (6)	3 +

¹ Number of replicates.

² Filtration was tentatively carried out (before agar addition) to remove suspended particles of the insoluble components (flaked soybean and flaked oat) of the medium, which minimized the lumpy appearance of Medium B agar, but however caused a decrease in fungal growth rate.

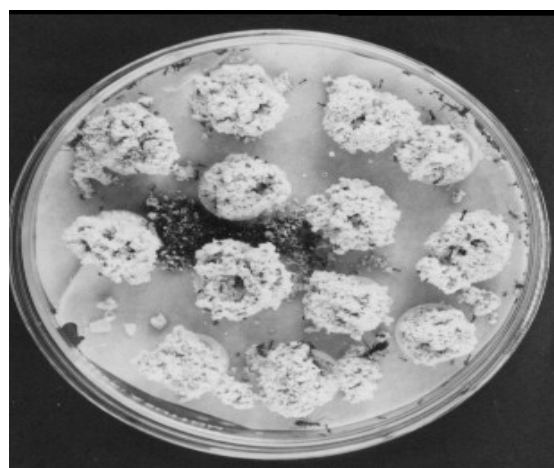
Figure 1. Isolation of the fungal symbiont of the ant *A. crassispinus*. Note the development of contaminants in fungus garden samples after 15 days without ants (a), in contrast to the selective propagation of the fungus in the presence of ants (b). After isolation, the fungus grew as white mycelium on Yeast Nitrogen Base Glucose (YNBG) agar (c) and presented swollen hyphal tips called gongylidium (d) which is a general characteristic of the symbiotic fungi of higher Attini.

Figure 1, Silva-Pinhati et al.

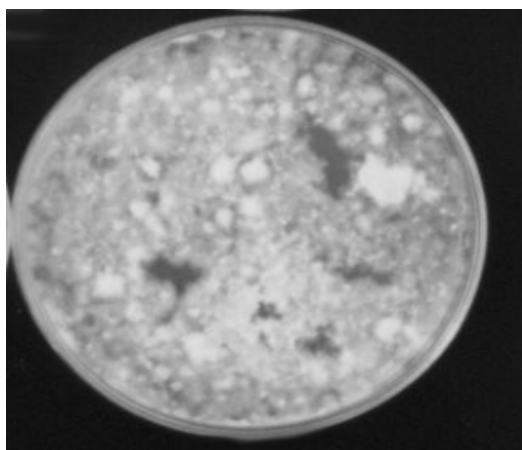
(a)



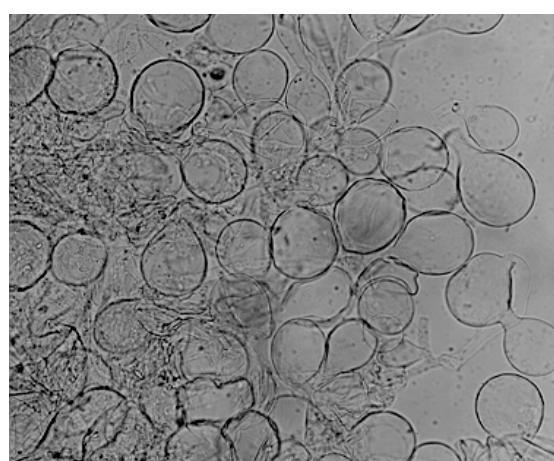
(b)



(c)



(d)



CAPÍTULO III

**Low variation in ribosomal DNA and internal
transcribed spacers of symbiotic fungi of leaf-
cutting ants (Attini: Formicidae)**

**Brazilian Journal of Medical and Biological
Research**

(Vol. 37 p. 1463 – 1472, 2004)

LOW VARIATION IN RIBOSOMAL DNA AND INTERNAL TRANSCRIBED SPACERS OF SYMBIOTIC FUNGI OF LEAF-CUTTING ANTS (ATTINI: FORMICIDAE)

A.C.O. Silva-Pinhati¹, M. Bacci Jr^{1,2}, G. Hinkle⁵, M.L. Sogin⁵, F.C. Pagnocca^{1,2}, V.G. Martins^{1,4}, O.C. Bueno^{1,3}, M.J.A. Hebling¹.

¹Centro de Estudos de Insetos Sociais. ²Departamento de Bioquímica e Microbiologia,

³Departamento de Biologia, Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Av. 24A, 1515, Rio Claro-SP, Brazil 13506-900.

⁴Departamento de Fonoaudiologia. Universidade Estadual Paulista. Av. Hygino Muzzi Filho, 737. Marília-SP, Brazil 17525-900.

⁵Josephine Bay Paul Center for Comparative Molecular Biology and Evolution, Marine Biological Laboratory. 7 MBL Street, Woods Hole, MA, USA 02540-1015.

Correspondence

M. Bacci Jr. Universidade Estadual Paulista, Centro de Estudos de Insetos Sociais, Av. 24A, 1515, Rio Claro, SP, Brazil 13506-900. Telephone: 19-3526-4165. FAX: 19-3534-8523.

E-mail: mbacci@rc.unesp.br

Key words: *Atta*, *Acromyrmex*, internal transcribed spacer, leaf-cutting ants, *Leucoagaricus*.

Running title: fungi of leaf-cutting ants

ABSTRACT

Leaf-cutting ants of the genera *Atta* and *Acromyrmex* (tribe Attini) are symbiotic with basidiomycete fungi of the genus *Leucoagaricus* (tribe Leucocoprinae) which they cultivate on vegetable matter inside their nests. We assessed the variation of 28S, 18S, and 5.8S ribosomal DNA (rDNA) gene loci and the rapidly evolving internal transcribed spacers 1 and 2 (ITS1 and ITS2) of sympatric and allopatric fungi associated with colonies of eleven species of leafcutter ants living up to 2,600 km apart. We found that the fungal rDNA and ITS sequences from different species of ants were identical (or nearly identical) to each other, whereas ten GenBank *Leucoagaricus* species showed higher ITS variation. Our findings suggest that *Atta* and *Acromyrmex* leafcutters living in geographic sites that are very distant from each other cultivate a single fungal species made up of very closely related lineages of *Leucoagaricus gongylophorus*. We discuss the strikingly high similarity in the ITS1 and ITS2 regions of the *Atta* and *Acromyrmex* symbiotic *L. gongylophorus* studied by us, in contrast to the lower similarity displayed by their non-symbiotic counterparts. We suggest that the similarity of our *L. gongylophorus* isolates is an indication of the recent association of *L. gongylophorus* with these ants, and propose some mechanisms involved in the homogenization of the symbiotic fungal stock.

INTRODUCTION

The tribe Attini is comprised of approximately 200 species of ants living in symbiosis with three distinct groups of microorganisms, in what has been called ‘one of the most complex symbiotic association discovered in nature’ (1). These microorganisms include symbiotic basidiomycete fungi which the ants utilize as food source, a parasite fungus in the genus *Escovopsis* which attacks the symbiotic fungal culture, and basidiomycete bacteria which grow in the ants body and produce antibiotics that are active against *Escovopsis* (1).

There are 13 genera of attines (2, 3), the most derived being the leafcutter ants of the genera *Atta* and *Acromyrmex*, which are the dominant herbivores in the Neotropical region between 12° North and 33° South (4, 5). This dominance results from the metabolic integration between the symbionts (6-9), which has been established during 50 million years of co-evolution (10, 11).

To understand the processes involved in the association between leaf-cutting ants and symbiotic fungi the diversity within each member of the symbiont pair needs to be characterized, but although the taxonomy of ants is well advanced (2) the taxonomy, and hence the diversity, of their symbiotic fungi has not yet been completely elucidated. Basidiocarps collected from nests of *Atta* species have been named as *Leucocoprinus gongylophorus* (12), *Leucoagaricus gongylophorus* (13) and *Leucoagaricus weberi* (14), but paired tests with mycelia suggest that some *Atta* and *Acromyrmex* ants cultivate a single species of fungus (15).

The multiple fungal species versus single species theories have more than taxonomic implications, being also related to the modes of fungal transmission within leafcutter colonies. Vertical transmission occurs when queen ants leave their parent nest carrying the symbiotic fungus which is then cultured by the newly founded colony (16). It has been proposed that vertical transmission has selected host-specific lineages of symbiotic fungi in leafcutters nests during the past 23 million years (10), so that the exclusive vertical transmission of fungal cultures within leafcutters is consistent with the existence of multiple symbiotic fungal species. On the other hand, the culturing of the same fungal species by *Atta* and *Acromyrmex* ants may indicate lateral transmission of fungal lineages. In laboratory nests, lateral transmission of symbiotic fungal strains has been induced between and within species of basal attines of the genus *Cyphomyrmex* (17) as well as two *Acromyrmex* species (18) and also seems occasionally to occur in nature (18-21).

In this paper, we present new information on the systematics of *Leucoagaricus* symbiotic fungi which we obtained by sequencing the 28S, 18S and 5.8S rDNA loci and internal transcribed spacers 1 and 2 (ITS1 and ITS2) of two basidiocarp and ten mycelial fungal isolates collected from the nests of attine ants located in several geographic regions of Brazil between latitudes 1.52° and 23.43° South. Our results suggest that all the isolates studied belong to the species *Leucoagaricus gongylophorus* and that lateral transmission was a common event through which selected lineages of the symbiotic fungus quickly proliferated in nests of many of the higher attine ants living in the tropical Americas.

MATERIALS AND METHODS

Fungal isolates and culture conditions. The *Leucoagaricus* isolates (Table 1) were collected as basidiocarps or as mycelial states from the nests of *Atta* and *Acromyrmex* ants from July 1985 to December 2001 from the geographic sites shown in figure 1. The basidiocarp collected from *Acromyrmex hispidus fallax* was identified as *Leucoagaricus gongylophorus* Heim (22). For the isolation of the mycelial form of the fungus from the fungus garden we used Yeast Nitrogen Base Glucose Chloramphenicol (YNBGC) agar, which increases the efficiency of this fungus isolation (Silva-Pinhati *et al.*, in analysis) and consists of Yeast Nitrogen Base media (YNB, Difco 100697) supplemented with (gl⁻¹) glucose (Merck, product number 108342, Darmstadt, Germany), 5; agar (Merk, product number 1.01614), 17; chloramphenicol (Sigma product number C-0378), 0.1 and sufficient 2M-NaOH to adjust the pH to 6.0. For maintenance we used YNB-glucose agar (i.e. YNBGC without chloramphenicol). The fungus garden material, collected from the underground nests of different ant species, was incubated (25° C, 80 % humidity) in the dark for 10 to 20 days in petri dishes containing worker ants which cleaned the garden material by removing soil fragments to a different part of the petri plate. When white mycelial spots of the fungal symbiont appeared on the leaf material some of the mycelia was collected using aseptic technique and transferred to YNBGC agar in petri plates where it was incubated at 25° C in the dark for 30 days. Alternatively, the fungus garden material from underground nests was collected and immediately plated onto YNBGC agar and incubated at 25° C in the dark for 30 days. In both cases, after 30 days of cultivation on YNBGC agar the fungal isolates were subcultured to YNB-glucose agar (without chloramphenicol) and cultured for a further 60 days, the hyphae having the swollen tips (gongylidium) which are a distinctive characteristic

of the symbiotic fungi of higher attine ants (5). The experiments described in this paper were carried out after two months to ten years of storage. When needed for DNA extraction, mycelia was transferred to fresh YNBG agar and grown for 30 days, after which approximately 100 mg of mycelia was processed as described below.

DNA extraction. Fungal mycelium was disrupted by placing 100 mg of mycelia in a 1.5 ml microcentrifuge tube, freezing the tube and contents in liquid nitrogen, adding 0.5 ml of ice-cold TE buffer (pH 8.6) containing 0.1% (w/v) SDS and homogenizing the mycelia with a plastic pestle which fitted inside the tube. The nucleic acid was purified using buffered phenol, followed by a buffered phenol:chloroform mixture (1:1 v/v) and finally pure chloroform. Total nucleic acids were precipitated with ethanol and sodium acetate, washed with ethanol and dissolved in 100 µl of TE buffer.

Amplification of ribosomal DNA and ITS regions. A polymerase chain reaction (PCR) amplification was carried out in a 100 µl reaction mixture using 100 ng of fungal genomic DNA and 6 pmol each of primers F-5.8S (5'-GGATCACTCGGCTCRTCNRTCGATGAAG-3') and R-635 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'). The amplification protocol used an initial denaturation at 94 °C for 3 min, followed by 30 PCR amplification cycles of 94° C for 10 sec, 37° C for 1 min and 72° C for 3 min. The amplification produced fragments of approximately 1 kb comprising the 5.8S gene, the ITS2 region and 0.6 kb of the 28S gene. The same procedure and protocol were used to amplify the 18S rRNA gene and the ITS1-5.8S-ITS2 region, except that the primers for the 18S rRNA gene were the eukaryotic universal primers (23) A (5'-CCGAATTCGTCGACAACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3') and B (5'-CCCGGGATCCAAGC TTGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC-3') while the ITS4 and ITS5 primers (24) were used to amplify the ITS1-5.8S-ITS2 region. Primers were purchased from Invitrogen/Life Technologies (São Paulo, Brazil).

Cloning. PCR products were cloned in the pGEM-T vector (Promega, Madison, WI, USA), and transformed into competent XL1-BLU *E. coli* cells and recombinant clones selected and purified by a miniprep procedure (25).

Sequencing. Both strands of recombinant plasmids or PCR products were individually sequenced with the SequiTherm kit (Epicentre Technologies, Madison, WI, USA) according to the manufacturers directions. Each reaction contained 800 ng of purified DNA and 0.30-0.36 pmol of Li-Cor infrared dye-labeled primer (Epicentre Technologies). Sequences of the 5.8S-ITS2-28S fragments were obtained using the vector primers M13F (5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3') and M13R (5'-GGATAACAATTCACACAGG-3') and the internal primers F-63 (5'-TTCCTCCGCTTATTGATA-TGC-3') and R-63 (5'-TTCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Invitrogen/Life Technologies). Reactions conditions included denaturation at 94° C for 3 min, followed by 30 amplification cycles of 94° C for 30 sec, 50° C for 30 sec and 70° C for 30 sec. The same procedure was used for sequencing the 18S gene, using the M13F and M13R primers as well as the internal primers 514F (5'-TCTGGTGCCAGCASC CGCGG-3'), 536R (5'-TGGWATTACCGCGGSTGCTG-3'), 1055F (5'-GTGGTGGTGCATGGCCG-3') and 1055R (5'-AAGAACGGCCATGCACCAC-3') (26). Reaction products were sequenced on a Li-Cor 4000L automated sequencing system (Epicentre Technologies). The ITS1-5.8S-ITS2 amplicons were sequenced using a 10 µl reaction mixture containing 6 pmol of the same primers as for their amplification, 100 ng template, 2.5 µl Big Dye reactant (PE Applied Biosystems, product number 4303153, Foster City, CA), 2 µl 100 mM Tris and 2.5 mM MgCl₂, pH 9.0. Reaction products were sequenced on an ABI 377 automated sequence system (Applied Biosystems).

Sequence analysis. DNA sequences were aligned using the ClustalW program (27), and compared to each other using the distance values generated according to Jukes and Cantor's substitution model (28) as implemented by the DNADIST program, version 3.5c, contained in the Phylip package (29). Nucleotide diversity (π), i.e. the average number of differences per site between two homologous sequences, was calculated using DnaSP, version 2.0 (30), according to equation 10.5 of Nei (31). Phylogenetic analysis was carried out using the maximum parsimony method as implemented by the PAUP* software 4.0b4a (32). Median-joining network connecting the sequences were constructed using the program Network 3.1.1.1 (available at www.fluxus-engineering.com) and the median joining algorithm (33). Default settings were chosen ($r = 2$ and $\epsilon = 0$).

RESULTS

In order to assess heterogeneity within and among isolates we sequenced individual clones containing the 5.8S-ITS2-28S amplicon, at least seven clones were sequenced for each fungal isolate. We were especially interested in the ITS regions, which are known to incorporate changes at relatively high rates (e.g. 34, 35). The 18S rDNA, which evolves comparatively slowly, was sequenced using pooled clones of each isolate. The 18S and 5.8S-ITS2-28S sequences generated are deposited in GenBank under the accession numbers AF076380 to AF076430 and the ITS1-5.8S-ITS2 sequences are under the accession numbers AY642807 to AY642816.

Few differences were found between isolates A to F, which were collected from two geographic sites (Table 1) and had identical 1760 bp 18S sequences, the 121 bp 5.8S and 690 bp 28S sequences being over 99 % similar. Variation in the ITS2 region (212 to 218 bp) was higher, the 45 sequenced clones containing 15 distinct ITS2 haplotypes which had 25 variable positions corresponding to 7 micro-satellites (1, 2 or 4 base repeats) and 14 transitions (8 C/T and 6 A/G) (Figure 2). Nucleotide diversity in the 45 ITS2 sequenced clones ($\pi = 0.00589 \pm 0.00110$) was too low to allow population studies and, similarly, the 2 parsimony-informative characters present in the 14 haplotypes (haplotype 11 was not considered in the parsimony analysis, since isolated D and E are from the same source nest) resulted in a highly polytomic tree (not shown).

Although the information available was insufficient to reveal detailed relationships between our isolates in a phylogenetic tree or to support a population study of these isolates, it was possible to group them by considering the three ITS2 haplotypes which were shared by several isolates (Table 2). The distribution of the shared haplotypes suggests that leafcutter fungal isolates A to F belong to two genetic groups, one group being composed of isolates A (from *Atta laevigata*), C (from *Acromyrmex crassispinus*) and F (from *Atta capiguara*) all containing ITS2 haplotype 1 but not haplotype 2, and the other group containing isolate B (from *Atta sexdens rubropilosa*) and isolates D and E (both from *Acromyrmex hispidus fallax*) all containing ITS2 haplotype 2 but not haplotype 1. Fungal isolates D and E also shared ITS2 haplotype 3. A phylogenetic network derived from the median-joining method showed that haplotypes 1 and 2 are likely centers of radiation / convergence of the ACF and BDE groups, respectively, so that some haplotypes are more closely related within ACF (haplotypes 1, 4, 8, 9, 12, 14) or BDE (haplotypes 2, 5, 10, 11) groups than between groups, although haplotypes

3, 6, 7, 13 and 15 were equally related to both ACF and BDE groups (Figure 3). These results suggest that the ACF and BDE genetic groups are in fact two distinct lineages of symbiotic fungi.

To extend our observations to a wider geographic region and other ant species, we investigated fungal isolates G to O (Table 1), collected from the nests of seven leafcutter species living in five different geographic sites. Both ITS1 and ITS2 regions were analyzed by sequencing the ITS1-5.8S-ITS2 amplified fragments, but few polymorphic positions were found in the first clones obtained from isolates K and N. Because of this we decided to directly sequence the PCR products of isolates E and G to O and found them to be identical or to differ by only a maximum distance of 1.5 %, in contrast to the 6.7 to 26 % distance found between the 10 closest related sequences of the GenBank *Leucoagaricus* species (see species names in Figure 4).

Similarly, the distance between the ITS2 regions of isolates A to O was zero to 2.5 %, while the distance between the ITS2 regions of the 10 most closely related GenBank *Leucoagaricus* isolates was 9.4 to 26 %. In addition, the ITS1 locus presented a highly variable portion that had a base composition and sequence length which was characteristic for each of the GenBank 10 *Leucoagaricus* species investigated, conversely, this region was identical for our leafcutter isolates E and G to O (Figure 4). These results indicate that the leafcutters studied by us cultivate very closely related fungal material, probably the same species, over a wide geographic region.

DISCUSSION

In the past it has been difficult to demonstrate that a basidiocarp found in *Atta* or *Acromyrmex* nests is that of the ant's symbiotic fungus and not one of the many contaminant fungi existing in the nests (36). This situation has led to uncertainties in the identification of ant fungi, which have received over a dozen names (4, 37, 38).

In our investigation we found that the *Leucoagaricus gongylophorus* basidiocarp (E in Table 1) and the mycelial isolate (D in Table 1), both collected from the same *Acromyrmex hispidus fallax* nest, had two identical (and some nearly identical) ITS2 sequences (Table 2). Since ITS regions have been used to distinguish species of fungi (e.g. 39) our results suggest that this *Leucoagaricus gongylophorus* basidiocarp represents the sexual stage of the

symbiotic fungus of *Acromyrmex hispidus fallax*, these findings reinforcing our previous results showing identical RAPD fingerprints for these two isolates (22).

The *Leucoagaricus gongylophorus* basidiocarp was also found to have ITS2 sequences which were identical, or nearly identical, to those of mycelial isolates from the nests of *Atta laevigata* (isolate A), *Atta sexdens rubropilosa* (isolate B) and *Acromyrmex crassispinus* (isolate C), all sympatric leafcutter species collected near the town of Rio Claro, as well as to fungal isolate F collected from an *Atta capiguara* nest near the town of Botucatu, 105 km from Rio Claro, and other fungal symbionts (isolates G to O) from sites near the towns of Botucatu, Ubatuba, Viçosa and Almeirim, which are up to 2,600 km apart from each other. The variations found in these ITS2 sequences were very low compared to those of GenBank ITS2 sequences belonging to 10 distinct *Leucoagaricus* species. In addition, the ITS1 highly variable portion, which contains a characteristic signature for each *Leucoagaricus* species, was identical in 10 of our fungal symbionts (isolates E and G to O) living in each of the investigated sites.

Taken together, these results indicate that the sympatric and allopatric leafcutter species studied in the present investigation are associated with very similar fungal material which may represent a single *Leucoagaricus* species, suggesting that leaf-cutting ants cultivate the same fungal species over a wide geographic region of South America and indicating that the ‘single species theory’ regarding fungal culture by leafcutters is more likely than the ‘multiple species theory’. Therefore it is likely that the *Leucoagaricus gongylophorus* basidiocarp (E in Table 1) represents the sexual stage of all the mycelial states isolates studied in the present investigation.

The degree of polymorphism that we found in the ITS sequences was too low to reveal detailed relationships between our isolates in a phylogenetic tree. However, distribution of ITS sequences within our fungal isolates collected from the Rio Claro or Botucatu areas suggests that these isolates belong to distinct genetic groups characterized by a specific ITS2 haplotype (Table 2), haplotype 1 only being found in isolates A, C and F (14 hits in 23 sequenced clones) and haplotype 2 only in isolates B, D and E (10 hits in 22 sequenced clones). These results, as well as the phylogenetic relationship between haplotypes derived from the median-joining analysis (Figure 3), suggested that these two genetic groups are in fact two distinct fungal lineages. Thus, it seems that the fungal strains cultured by *Atta laevigata*, *Acromyrmex crassispinus* and *Atta capiguara* (belonging to the ACF lineage) are

more similar to each other than they are to the fungal strains cultured by *Atta sexdens rubropilosa* and *Acromyrmex hispidus fallax* (BDE lineage),. Chapela *et al.* (10) has hypothesized that there has been restricted vertical transmission of symbiotic fungi in the higher attines for the last 23 million years, which suggests that the symbiotic fungi of *Atta* ants should be more similar to each other than they are to the symbiotic fungi of *Acromyrmex* ants. However, our findings do not support the exclusively vertical transmission of symbiotic fungi in higher attines, suggesting instead that lateral transmission may occur under some circumstances.

Our findings are in part supported by those of Bot *et al.* (18), who found that, in Panama, lateral transmission of fungal material may have occurred between the sympatric species *Acromyrmex octospinosus* and *Acromyrmex echinator*. However, these authors also mention that lateral transfer of symbiotic fungi between *Atta* and *Acromyrmex* ants does not occur, although our results show that some *Atta* and *Acromyrmex* species do indeed cultivate the same lineage of *Leucoagaricus gongylophorus* and hence have probably recently shared their symbiotic fungi.

Markers may exist which are evolving faster than the ITS regions and their sequences would provide more polymorphic sites and provide suitable information for population studies, so that detailed information on the propagation of *Leucoagaricus gongylophorus* lineages throughout distinct leafcutter nests could be assessed. Such propagation seems to be a general characteristic within leafcutters, considering the evidences that we found for lateral transmission of fungal material within the ants from Rio Claro and Botucatu, in Brazil, as well as similar evidences described for some Panamanian *Acromyrmex* (18). Thus, it is conceivable that during the symbiosis evolution a continuous sharing of fungal strains has often occurred and has led to the homogenization of symbiotic fungal stock through the selection of the *Leucoagaricus gongylophorus* lineages found in both the sympatric and allopatric leafcutters sampled in our study. This scenario of intense lateral transmission of fungal material between leafcutters is consistent with the low variation in both ITS1 and ITS2 found in our isolates and resembles the ‘mycocentric’ view of the ant-fungus symbiosis that was recently pointed out by Mueller (40), who suggested that symbiotic fungi may play a dominant part in the ant-fungus association. This point of view stands in contrast with the traditional ‘myrmicocentric’ view of the ant-fungus symbiosis in which the fungus has the passive role of a mere cultivated crop that is manipulated by the ants according to their needs.

The symbiotic fungus, *Leucoagaricus gongylophorus*, may be transferred by leafcutters directly from one nest to another or, conversely, this transmission may involve an intermediary free-living fungal stage so that many clones of the original symbiotic fungus could have been spread during the period of time through which these ants have been living in America. Thus, it is possible that free-living close relatives (or even free-living forms) of *Leucoagaricus gongylophorus* exist.

In addition to intensive lateral transmission, some features of symbiotic fungal lineages may have shaped the population structure of *Leucoagaricus gongylophorus*, such as resistance to antibiotics produced either by the ants and the actinomycete symbiont or sensitivity to the parasite *Escovopsis*. Thus, the complete elucidation of the factors that led to the low variation in *Leucoagaricus gongylophorus* ITS sequences requires an intensive sampling and characterization of the three groups of symbiotic microorganisms of many leafcutters from distinct geographic sites in America.

Acknowledgments.

We thank the Brazilian agencies Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for supporting this work (00/12538-5) and for fellowships for MBJ (postdoctoral) and ACOSP (doctoral) and Coordenação de Apoio ao Pessoal de Nível Superior (CAPES) for supporting this research through the CAPES-University of Texas in Austin International Cooperation Program (CAPES-UT 005). Dr. Fábio O. Freitas is acknowledged for his comments on median-joining analysis and Dr. Ulrich Mueller is also acknowledged for his comments on the earlier versions of this paper.

Table 1. *Leucoagaricus* isolates obtained from the nests of leaf-cutting ants

Isolate code	<i>Location in Brazil</i>	Ant	<i>Physical state of the culture</i>
A	Rio Claro	<i>Atta laevigata</i>	Mycelial
B	Rio Claro	<i>Atta sexdens rubropilosa</i>	Mycelial
C	Rio Claro	<i>Acromyrmex crassispinus</i>	Mycelial
D	Rio Claro	<i>Acromyrmex hispidus fallax</i>	Mycelial ¹
E	Rio Claro	<i>Acromyrmex hispidus fallax</i>	Basidiocarp ¹
F	Botucatu	<i>Atta capiguara</i>	Mycelial
G	Botucatu	<i>Atta bispherica</i>	Mycelial
H	Botucatu	<i>Acromyrmex rugosus</i>	Mycelial
I	Ubatuba	<i>Acromyrmex disciger</i>	Mycelial
J	Viçosa	<i>Atta sexdens rubropilosa</i>	Mycelial
K	Viçosa	<i>Acromyrmex subterraneus molestans</i>	Mycelial
L	Viçosa	<i>Acromyrmex subterraneus molestans</i>	Mycelial ²
M	Viçosa	<i>Acromyrmex subterraneus molestans</i>	Basidiocarp ²
N	Almeirim	<i>Atta cephalotes</i>	Mycelial
O	Almeirim	<i>Acromyrmex laticeps</i>	Mycelial

^{1, 2} Basidiocarp and mycelial states collected from the same ant's nest.

Table 2. Distribution and number of hits of each of the 15 ITS2 haplotypes found in the 45 sequenced clones of six sympatric or allopatric fungal isolates from *Atta* and *Acromyrmex* leafcutter ants.

Isolate ¹	ITS2 haplotype															Total
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	
A	7	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8
B	-	2	-	-	3	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	7
C	5	-	-	-	-	-	-	1	2	-	-	-	-	-	-	8
D	-	4	3	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	8
E	-	4	2	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	7
F	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1	1	1	7
Total	14	10	5	1	3	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	45

¹Fungal symbiotic with *Atta laevigata* (A), *Atta sexdens rubropilosa* (B), *Acromyrmex crassispinus* (C), *Acomyrmex hispidus fallax* (D = mycelium; E = basidiocarp) and *Atta capiguara* (F). Shaded numbers indicate the number of hits for haplotypes that were shared by distinct isolates.

Figure 1. The five geographic sites from which the fungal isolates were collected. The numbers indicate the site coordinates.

Figure 2. Polymorphic sites of the 15 ITS2 haplotypes of six symbiotic fungal isolates. Fungal isolates were collected from nests of *Atta laevigata* (A), *Atta sexdens rubropilosa* (B), *Acromyrmex crassispinus* (C), *Acromyrmex hispidus fallax* (D = mycelium; E = basidiocarp) and *Atta capiguara* (F). The ITS2 region of these isolates contained 212 to 218 bp, of which a 201 bp alignment containing the ITS2 polymorphic sites is represented. Dots indicate conserved sites and letters polymorphic sites, micro-satellite repeats being shaded and transitions unshaded. Haplotypes are numbered from 1 to 15 and isolates in which a known ITS2 haplotype was found are shown in parenthesis.

Figure 3. Phylogenetic relationship between the 15 ITS2 haplotypes of six symbiotic fungal isolates. Network nodes (circles) represent the haplotypes, which are numbered in bold and sized proportionally to the number of sequences they represent, i.e. 1, 2, 3, 5, 10, and 14 sequences. Colored areas in the circles are proportional to the number of sequence copies from each of the fungal isolates A to F (see also Table 2). The numbers on the joining lines refer to the position of the polymorphic sites in the alignment depicted in Figure 2. Note that haplotypes from fungal isolates A, C and F are, in general, more closely related to each other than to haplotypes from isolates B, D and E.

Figure 4. The characteristic signature for each *Leucoagaricus* species. Representation of the portion of the ITS1 sequence that was highly variable in *Leucoagaricus* species but identical in ten fungal isolates collected from eight leafcutter species living in five geographic sites. Dots represent the conserved sites and letters the polymorphic sites of the ITS1 sequences regarding that of *Leucoagaricus americanus*. The accession numbers of the GenBank *Leucoagaricus* sequences were LAU85317, AF295929, AF482863, AF482843, AF482866, LNU85315, AF482869, AF482871, AF482872, AF482874 (in order from the top to the bottom of the figure).

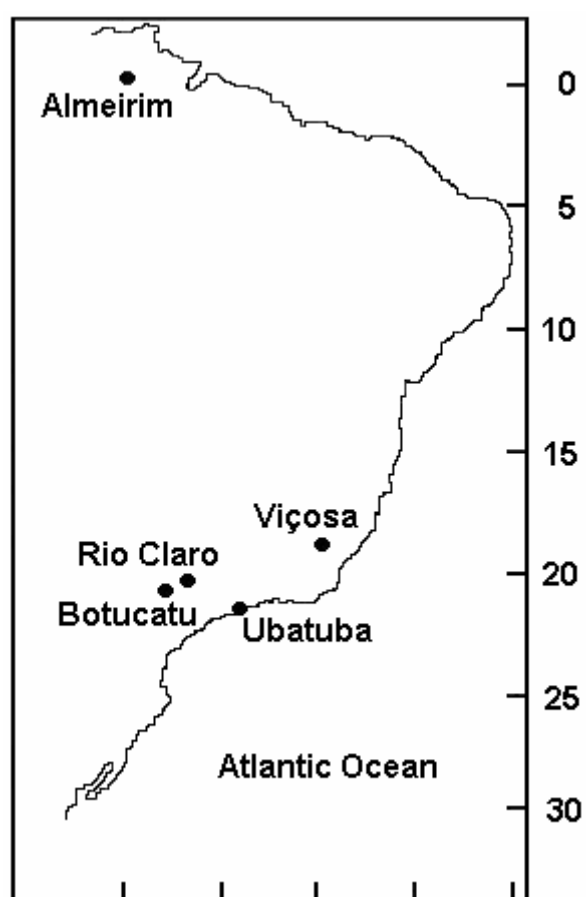


FIGURE 1

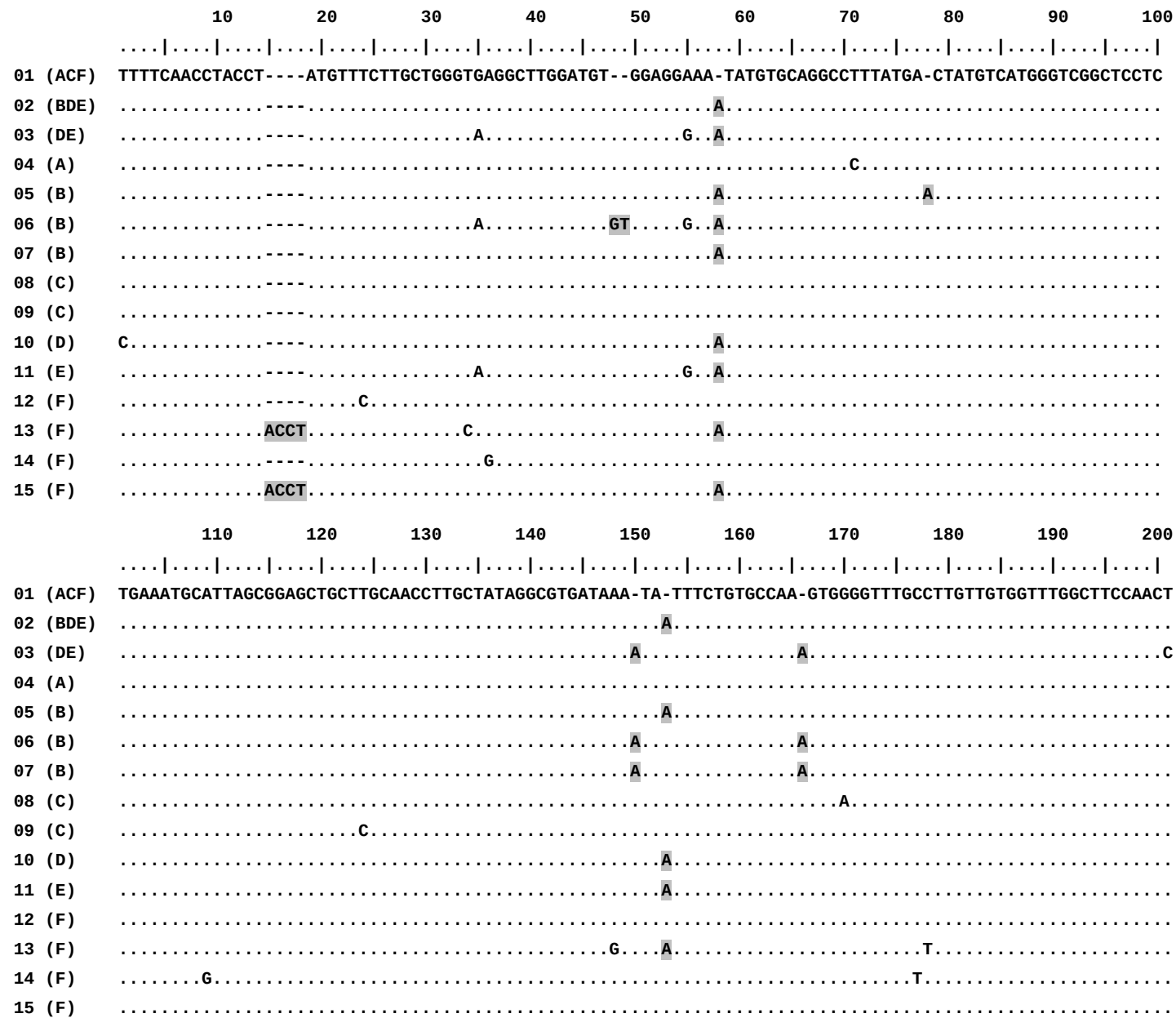


FIGURE 2

	10	20
		
<i>L. americanus</i>	GTCTTTTT	-GGGGGCTGACAAGCGA
<i>L. bresadolae</i>	CGGG	.TCT.GGA.GCG...--
<i>L. crystallifer</i>	--G.C...	GA...CTGA..GCG..TG
<i>L. hortensis</i>	G.GG..	TT.AGA.GTG..CG
<i>L. marriagei</i>	C.-.....	TG...A.
<i>L. naucinus</i>	..A..CG.GT.A.C.TC..	GGGAA.-
<i>L. purpureolilacinus</i>	G-...-A.....	G..CA.T
<i>L. sereneus</i>	GGAGAAT	.AGATGG..CA.T
<i>L. sericifer</i>	C.CTT.....	GG.AA.T
<i>L. wychanskyi</i>	--GC....GA...	CTGA..GCG.A.T
<i>L. gongylophorus</i> E, G - 0	C..TCAA..	T.GA.GTG..TT

FIGURE 4

REFERENCES

1. Currie CR, Wong B, Stuart AE, Schultz TR, Rehner SA, Mueller UG, Sung GH, Spatafora JW, Strauss NA (2003). Ancient tripartite coevolution in the attine ant-microbe symbiosis. *Science*, 299: 386-388.
2. Bolton B (1995). *A New General Catalogue of the Ants of the World*. Harvard University Press, Cambridge, MA, USA.
3. Brandão CFR & Nunes AM (2001). A new fungus-growing ant genus *Mycetagroicus* gen. n., with the description of three new species and comments on the monophyly of the Attini (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, 38: 639-665.
4. Weber NA (1979). Fungus culturing by ants. In: Batra LR (Editor.), *Insect-Fungus Symbiosis, Mutualism and Commensalism*. 20th International Mycological Congress, Tampa, FL, Halsted Press, New York, NY, 77-115.
5. Hölldobler B & Wilson EO (1990). *The Ants*. The Belknap Press of Harvard University Press. Cambridge, MA, USA.
6. Martin MM (1970). The biochemical basis of the fungus-attine ant symbiosis. *Science*, 169: 16-20.
7. Bass M & Cherrett JM (1995). Fungal hyphae as a source of nutrients for the leaf-cutting ants *Atta sexdens*. *Physiology Entomology*, 20: 1-6.
8. North RD, Jackson CW & Howse PE (1997). Evolutionary aspects of ant-fungus interactions in the leaf-cutting ants. *Trends in Ecology and Evolution*, 12: 386-389.
9. Siqueira CG, Bacci M, Pagnocca FC, Bueno OC & Hebling MJA (1998). Metabolism of plant polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 4820-4822.
10. Chapela IH, Rehner SA, Schultz TR & Muller UG (1994). Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi. *Science*, 266: 1691-1694.
11. Hinkle G, Wetterer JK, Schultz TR & Sogin ML (1994). Phylogeny of the attine fungi based on analysis of small subunit ribosomal RNA gene sequences. *Science*, 226: 1695-1697.
12. Bononi VLR, Autuori M & Rocha MB (1981). *Leucocoprinus gongylophorus* (Möller) Heim, o fungo do formigueiro de *Atta sexdens rubropilosa* Forel. *Rickia*, 9: 93-97.

13. Fisher PJ, Stradling DJ & Pegler DN (1994). Leaf cutting ants, their fungus gardens and the formation of basidiomata of *Leucoagaricus gongylophorus*. *Mycologist*, 8: 884-888.
14. Muchovej JJ, Della Lucia TM & Muchovej RM (1991). *Leucoagaricus weberi* sp nov. from a live nest of leaf-cutting ants. *Mycological Research*, 95: 1308-1311.
15. Stradling DJ & Powel RJ (1986). The cloning of more highly productive fungal strains: a factor in the speciation of fungus growing ants. *Experientia*, 42: 962-964.
16. Weber NA (1972a). Gardening ants, the attines. *The American Philosophical Society*, 92: 1-146, Philadelphia, USA.
17. Adams RMM, Mueller UG, Holloway AK, Green AM, Narozniak J. (2000). Garden sharing and garden stealing in fungus-growing ants. *Naturwissenschaften* 87: 491-493.
18. Bot, ANM, Rehner, SA, Boomsma JJ. (2001). Partial incompatibility between ants and symbiotic fungi in two sympatric species of *Acromyrmex* leaf-cutting ants. *Evolution*, 55:1980-2001.
19. Mueller UG, Lipari SE & Milgroom MG (1996). Amplified fragment length polymorphism (AFLP) fingerprinting of symbiotic fungi cultured by the fungus-growing ant *Cyphomyrmex minutus*. *Molecular Ecology*, 5: 119-122.
20. Mueller UG, Rehner SA & Shultz TR (1998). The evolution of agriculture in ants. *Science*, 281: 2034-2038.
21. Green AM, Adams RMM & Mueller UG (2002). Extensive exchange of fungal cultivars between sympatric species of fungus-growing ants. *Molecular Ecology* 11: 191-195.
22. Pagnocca FC, Bacci M, Fungaro MH, Bueno OC, Hebling MJA, Sant'anna A & Cappellari M (2001). RAPD analysis in basidiomata found in a nest of the leaf-cutting ant *Acromyrmex hispidus fallax*, Santschi. *Mycological Research*, 105: 173-176.
23. Medlin L, Elwood HJ & Stickel S (1988). The characterization of enzymatically amplified eucaryotic 16S-like rRNA coding regions. *Gene*, 71: 491-499.
24. White TJ, Bruns T, Lee S & Taylor J (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ & White TJ (Editors) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, San Diego, USA, 315-322.

25. Sambrook J & Russel DW (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, NY, USA.
26. Elwood HJ, Olsen GH & Sogin ML (1985). The small subunit ribosomal RNA gene sequence from the hypotrichus ciliates *Oxytrichia nova* and *Stylonychia pustulata*. *Molecular Biology and Evolution*, 2: 399-410.
27. Thompson JD, Higgins DG & Gibson TJ (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680.
28. Jukes TH & Cantor CR (1969). Evolution of protein molecules. In: Munro HN (Editor), *Mammalian Protein Metabolism III*, Academic Press, New York, USA.
29. Felsenstein J. 1989. PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics*, 5: 164-166.
30. Rozas J & Rozas R (1997). DnaSP version 2.0: a novel software package for extensive molecular populational genetic data analysis. *Computer Applications in the Biosciences*, 13: 307-311.
31. Nei M (1988). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, USA.
32. Swofford, DL 2000. Phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0b4a (Illinois Natural History Survey, Champaign.
33. Bandelt, HJ, Forster, P & Röhl, A (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies *Molecular Biology and Evolution*, 16: 37-48.
34. O'Donnel K (1992). Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Giberella pulicaris*). *Current Genetics*, 22: 213-220.
35. Campbell AJD, Gasser RB & Chilton NB (1995). Differences in a ribosomal DNA sequence of *Strongylus* species allow identification of single eggs. *International Journal of Parasitology*, 25: 359-365.
36. Fisher PJ, Stradling DJ, Sutton BC & Petrini LE (1996). Microfungi in the fungus gardens of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*: a preliminary study. *Mycological Reserch*, 100: 541-546.

37. Wetterer JK (1994). Nourishment and evolution in fungus-growing ants and their fungi In: Hunt JH & Nalepa CA (Editors), *Nourishment and Evolution in Insect Societies*, Westview Press, Bolder, CO, USA.
38. Kermarrec A, Decharme M & Febvay G (1986). Leaf-cutting ant symbiotic fungi: a synthesis of recent research. In: Lofgren CS & Van der Meer RK (Editors), *Fire Ants and Leaf-Cutting Ants*. Westview, Bolder, CO, and London.
39. Sreenivasaprasad S, Mills PR, Meeham BM & Brown AE (1996). Phylogeny and systematics of 18 *Colletotrichum* species based on ribosomal RNA spacer sequence. *Genome*, 39: 499-512.
40. Mueller UG (2002). Ant versus fungus versus mutualism: Ant-cultivar conflict and the deconstruction of the attine ant-fungus symbiosis. *American Naturalist*, 160: S67-S98.

CAPÍTULO IV

Estudos metabólicos de fungos simbiontes de formigas da tribo Attini

Manuscrito

ESTUDOS METABÓLICOS DE FUNGOS SIMBIONTES DE FORMIGAS DA TRIBO ATTINI

Ana Carla O. Silva-Pinhati, Maurício Bacci Jr., Fernando Carlos Pagnocca, Odair C. Bueno e Maria José A. Hebling.

RESUMO

As formigas da Tribo Attini constituem 13 gêneros que cultivam fungos no interior de seus ninhos. Os fungos propiciam notável versatilidade nutricional para as formigas, intermediando a alimentação dos insetos a partir de matéria orgânica sólida, que de outra forma lhes seria pouco acessível. No presente trabalho, foram realizados estudos metabólicos de fungos simbiossiontes de *Atta sexdens*, *Mycetarotes parallelus*, *Acromyrmex laticeps*, *Trachymyrmex fuscus*, *Apterostigma sp* e *Cyphomyrmex sp*, e através destes estudos observamos que a simbiose evoluiu com o aumento da capacidade metabólica do fungo, o que fez aumentar a oferta nutricional e pôde ter sido um fator importante para o aumento da população de formigas nos ninhos. Assim, os fungos cultivados por formigas derivadas dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, que vivem em colônias com milhares de indivíduos, apresentam maior capacidade de secretar polissacaridases do que os fungos cultivados por formigas primitivas que vivem em pequenos ninhos, sugerindo que a alta capacidade de produzir enzimas por fungos simbiossiontes pode ser um comportamento derivado podendo estar relacionado ao aumento de tamanho e estrutura dos ninhos, de acordo com a derivação da espécie.

INTRODUÇÃO

A existência de um mecanismo complexo de integração, caracterizada por codependência nutricional, fisiológica e antibiótica, indica uma longa história co-evolucionária entre fungos e formigas da tribo Attini (Mueller, 2002). Nestas condições, esperam-se encontrar integrações metabólicas entre os simbioss, desenvolvidas durante estes anos de co-evolução. No entanto, pouco se sabe sobre o processo evolutivo e das consequências do comportamento de cultivar fungos, pois a maior parte dos estudos sobre esta tribo enfoca os gêneros que são economicamente importantes, como *Acromyrmex* e *Atta*, faltando estudos sobre os gêneros primitivos. De certo sabe-se que a complexidade dos ninhos aumentou no decorrer da evolução (Hölldobler, Wilson, 1990).

Tradicionalmente a tribo Attini é subdividida em um derivado grupo monofilético, denominado atíneos superiores, no qual estão incluídas as formigas cortadeiras de folhas do gênero *Atta* e *Acromyrmex*, o parasita social *Pseudoatta* e também as não cortadeiras *Trachymyrmex* e *Sericomyrmex*; e um grupo parafilético, chamado de atíneos primitivos, incluindo as formigas *Mycetarotes*, *Myrmicocrypta*, *Mycocepurus*, *Apterostigma*, *Cyphomyrmex*, *Mycetosoritis*, *Mycetophylax* (Schultz, Meier, 1995; Mueller et al., 2001).

As formigas pertencentes aos gêneros considerados basais são caracterizadas por apresentarem colônias de tamanho muito pequeno, com exceção somente do gênero *Myrmicocrypta*, que apresenta colônias maiores. Em contraste, os atíneos derivados apresentam grandes colônias, sendo o gênero *Atta* o que apresenta os maiores ninhos dentro da tribo (Hölldobler, Wilson, 1990).

Existe uma tendência para o aumento do tamanho das colônias, da estrutura dos ninhos e do corpo das operárias, de acordo com a derivação dos gêneros dentro da tribo Attini (Hölldobler, Wilson, 1990). O tamanho das colônias, a complexidade dos ninhos e o tamanho das operárias, são relativamente semelhantes entre as formigas da tribo Attini primitivas e bem menores que aqueles apresentados pelas formigas cortadeiras *Acromyrmex* e *Atta* (Leal, 1998).

A oferta de nutrientes também teve que se adaptar para sustentar o aumento da população. Assim, a quantidade de substrato coletada para o cultivo dos fungos, pelos atíneos primitivos, são similares entre si, mas muito inferiores à coletada por formigas cortadeiras (Leal, Oliveira, 1998). Além disso, há uma dependência nutricional das formigas com relação aos fungos simbioss, uma vez que eles fornecem enzimas que degradam polissacarídeos

vegetais (Bacci, et al. 1995). Dessa forma, é de se esperar que o fungo simbiote destas formigas assimile estes polissacarídeos. De fato, a estratégia para acessar, e utilizar estes nutrientes dos vegetais foi estudada para os simbioss das formigas *Atta sexdens*, uma espécie derivada (Siqueira et al., 1998) e *Mycetarotes parallelus*, uma espécie primitiva (Silva, 2000). Foi constatado que os fungos podem servir de intermediários para a assimilação de polissacarídeos pelas formigas, suportando a utilização destes pelas mesmas.

Resultados obtidos em nosso laboratório indicaram que há diferenças metabólicas entre os simbioss de *Atta sexdens* e de *Mycetarotes parallelus*. Por esse motivo, no presente trabalho, nós averiguamos a validade desta hipótese, estudando fungos representantes de diferentes grupos determinados por Chapela, et al., (1994) e Muller (2002): os simbioss de *Acromyrmex laticeps* e o simbiote de *Atta sexdens* pertencente ao grupo 1, que compreende todos os fungos simbioss de formigas derivadas; o simbiote de *Trachymyrmex sp*, que tem algumas espécies definidas como grupo 1 e outras definidas como pertencentes ao grupo 3; os fungos simbioss de *Cyphomyrmex sp* e o fungo simbiote de *Mycetarotes parallelus*, pertencente ao grupo 3; e o fungo simbiote de *Apterostigma sp*, que pode representar o grupo 2 ou o grupo 4, formado somente por este gênero.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta, isolamento e manutenção dos simbioss. Os formigueiros foram escavados até as câmaras de cultivo, de onde foram coletadas amostras da esponja de fungos. As amostras foram transportadas para o laboratório, onde imediatamente foi realizado o isolamento dos fungos em meio YNB (Yest Nitrogen Base, Difco 100697) contendo 0,5 g . 100 mL⁻¹ de glicose e 0,1 g . 100 mL⁻¹ de pentabiótico veterinário. A manutenção dos simbioss foi realizada em meio de cultivo B que contém em cada litro, 10 g de glicose (Labsynth G1008.01.AH), 2 g de NaCl (Labsynth C1060.01.AH), 2 g de peptona (Sigma P-0556), 10 g de extrato de malte (Difco 0186-01), 2 g de amicase (Sigma A-2427), 2 g de flocos de soja, 2 g de flocos de aveia, 17 g de agar-ágar (Acumedia 7178A), 3,8 g de fosfato de sódio dibásico (Synth F1.033.01.AG) e 2,5 g de ácido cítrico (Mainckrodt 0627), tamponado em pH 5 (Pinhati-Silva, et al. 2004 no prelo). As culturas fúngicas mantidas em meio B, a 25° C, são renovadas a cada 40 dias. Os isolados estudados estão descritos na tabela 1.

Determinação da temperatura ótima de cultivo do fungo. Os fungos foram inoculados em meio YNB acrescido de $0,5 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ de glicose, e incubados em diferentes temperaturas. Após 30 dias, a massa celular foi determinada.

Determinação de pH ótimo de cultivo do fungo. O meio YNB contendo $0,5 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ de glicose foi tamponado com citrato e fosfato, em valores de pH entre 3,0 e 7,0, conforme descrito por McIlvaine (Stoll, 1990). Após 30 dias, foi determinada a massa celular produzida nos diferentes valores de pH.

Preparação do inóculo. Porções de fungos, correspondentes a $2,5 \pm 0,4 \text{ mg}$ ($n = 9$) de peso seco foram adicionadas a 30 mL de água Milli-Q esterilizada. O frasco contendo a mistura foi agitado em Vortex e em seguida os fungos foram triturados com um pistilo, até a mistura se tornar homogênea. Duzentos μL desta mistura foram inoculados em 50 mL de meio de cultivo YNB acrescido de $0,5 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ de amido solúvel (SIGMA S9765). Os meios de cultivo foram incubados por 30 dias, a 25°C , de acordo com o pH ótimo de cada fungo. Adotamos 30 dias de cultivo para realização dos experimentos, pois neste período o fungo está em fase logarítmica de crescimento (Silva, 2000; Siqueira, 1998).

Produção de despolimerases. Após os 30 dias de cultivo, o micélio fúngico foi separado em papel de filtro Whatman número 1 e seco em estufa a 60°C , por 24 horas, tendo, em seguida, a biomassa determinada através do peso seco. Os filtrados foram armazenados a -20°C e em seguida submetidos a determinações de atividade enzimática e dosagem de proteínas pelo método de Bradford (1976). Para dosagem de atividade enzimática, primeiramente foi preparada $2 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ de solução de cada substrato a ser analisado (celulose, amido, pectina e xilana) em tampão de McIlvaine 50 mM pH 5,0. Um mL desta solução foi adicionado a 1 mL da solução de enzima, sendo essa mistura incubada a 30°C (temperatura definida pela Internacional Union of Biochemistry and Molecular Biology, para dosagem enzimática). Nos tempos indicados, 0,2 mL da mistura reacional foi coletado em tubos de ensaio, que foram imediatamente imersos em água fervente por dois minutos, para interromper a reação. Estas amostras foram, então, analisadas quanto à concentração de açúcares redutores dos polissacarídeos pelo método de ADNS (Miller, 1959). As concentrações de açúcares redutores foram calculadas com base em curvas-padrões de xilose,

glicose e ácido galacturônico (anexo 1), e as atividades enzimáticas foram expressas em $\mu\text{mol/mg/h}$.

Estatística. Cada um dos cultivos foi realizado entre 6 e 10 vezes. Os pesos secos, as atividades enzimáticas e as concentrações de proteínas foram expressos em média $\pm$ desvio padrão, e submetidos ao teste de Tuckey para comparação de múltiplas colunas (Zar, 1980).

RESULTADOS

Estudos metabólicos de fungos simbios

Antes de dar início aos estudos metabólicos dos fungos, foram determinados o pH ótimo e a temperatura ótima de cultivo dos simbios (tabela 2 e 3). De maneira geral, os fungos apresentaram pH ótimo em torno de 4,8, conforme já observado anteriormente para o fungo simbiote de *Mycetarotes parallelus* (Silva, 2000) e *Atta sexdens* (Siqueira, 1998), e a temperatura ótima igual a 25° C, conforme já observado em outros fungos simbios de atíneos (Powell, Stradling, 1986; Siqueira, 1998; Silva, 2000). Os experimentos seguintes foram realizados em meios de cultivo com valores ótimos de pH para cada um dos fungos simbios e a 25° C.

Os estudos metabólicos dos fungos simbios de *Atta sexdens*, *Mycetarotes parallelus*, *Acromyrmex laticeps*, *Trachymyrmex fuscus*, *Apterostigma sp* e *Cyphomyrmex sp*, foram realizados em meio YNB contendo como única fonte de carbono o amido. Após 30 dias de cultivo foi determinada a produção de biomassa dos fungos em meios de cultivo contendo amido como substrato (tabela 4). O amido foi o substrato escolhido para este teste por ser um indutor de todas as enzimas analisadas (celulase, amilase, pectinase e xilanase) (Silva, 2000).

Nós separamos os fungos em dois grupos com relação à produção de biomassa (tabela 4). O grupo 1, formado pelo simbiote de *Mycetarotes parallelus* e *Cyphomyrmex sp*, que apresentou maior velocidade de crescimento; e o grupo 2, formado pelos simbios de *Acromyrmex laticeps* e *Atta sexdens*. Os fungos simbios de *Trachymyrmex fuscus* e *Apterostigma sp* não puderam ser exclusivamente classificados em um dos dois grupos. Esta diferença no crescimento dos fungos simbios de *Mycetarotes parallelus* e no simbiote de *Atta sexdens* já tinha sido observada anteriormente (Silva, 2000).

Observamos que a secreção de proteína com relação à produção de biomassa durante o cultivo separa claramente os fungos em 2 grupos: o grupo 1, formado pelos simbiote de

Acromyrmex laticeps e *Atta sexdens*, e o grupo 2, formado pelos outros 4 simbiontes. A produção de biomassa pelos fungos simbiontes de *Acromyrmex laticeps* e *Atta sexdens* é menor em relação aos outros fungos, mas quando calculamos proteína por biomassa, notamos que os simbiontes de *Acromyrmex laticeps* e *Atta sexdens* secretam muito mais para o meio do que os demais simbiontes, mesmo produzindo menor quantidade de biomassa (tabela 4).

Foram determinadas as atividades de despolimerases dos fungos simbiontes em meios de cultivo contendo amido como substrato, no qual determinamos atividade de celulase, xilanase, amilase e pectinas (tabela 4).

Com relação à produção de amilase, os fungos foram separados em 3 grupos: grupo 1, formado pelo simbionte de *Acromyrmex laticeps* e *Atta sexdens*; grupo 2, formado pelos simbiontes de *Trachymyrmex fuscus* e *Apterostigma sp*, e grupo 3, formado pelos simbiontes de *Cyphomyrmex sp* e *Mycetarotes parallelus*.

Os fungos foram separados em 2 grupos, com relação à produção de celulase: o primeiro formado por simbiontes de *Acromyrmex laticeps* e *Atta sexdens*; e o segundo formado por *Trachymyrmex fuscus*, *Apterostigma sp* e *Mycetarotes parallelus*. O fungo simbionte de *Cyphomyrmex sp*, não pode ser exclusivamente classificado em um dos dois grupos.

A determinação da atividade de xilanase nos permitiu separarmos os fungos em dois grupos, sendo o grupo 1 formado pelos fungos simbiontes de *Atta sexdens*, *Acromyrmex laticeps* e *Trachymyrmex fuscus* e o grupo 2 por simbiontes de *Cyphomyrmex sp*, *Apterostigma sp* e *Mycetarotes parallelus*.

Com relação à produção de pectinase, os fungos também foram separados em 3 grupos: grupo 1 formado pelos fungos de *Atta sexdens* e *Acromyrmex laticeps*, grupo 2 formado pelos simbiontes de *Trachymyrmex fuscus* e *Cyphomyrmex sp*, e grupo 3 formado pelos simbiontes de *Apterostigma sp* e *Mycetarotes parallelus*.

DISCUSSÃO

Na tabela 4 podemos comparar a produção de cada despolimerase por biomassa pelos seis simbiontes estudados. Para cada enzima foi realizada uma análise estatística separadamente para comparação das colunas. Podemos notar que os simbiontes de *Acromyrmex laticeps* e *Atta sexdens*, com relação à produção de biomassa, são os maiores

produtores de todas as enzimas. Observamos também que a produção de pectinase pelo 6 fungos foi maior com relação às outras enzimas.

É interessante notar que a produção de pectinase pelo simbionte de *Apterostigma sp* e pelo fungo simbionte de *Mycetarotes parallelus* foi bem menor com relação aos outros fungos. Se o comportamento do fungo no formigueiro puder ser representado pelo que foi observado em laboratório, esta baixa produção de pectinase pode ser devido ao tipo de substrato que formigas primitivas levam para os ninhos, que pode ser principalmente carcaças de insetos, fezes de animais e matéria vegetal em decomposição (Wilson, 1970, Hölldobler, Wilson, 1990, Mayhé-Nunes, 1995). O mesmo não ocorre com os simbiontes de *Acromyrmex laticeps*, *Atta sexdens* e *Trachymyrmex fuscus*, pois as formigas normalmente levam para os ninhos folhas frescas e no caso de *Trachymyrmex* principalmente sementes. Neste caso, para o fungo acessar os outros componentes vegetais necessita degradar primeiramente a pectinase, então é de se esperar que a atividade desta enzima seja maior nestes fungos, mas não no fungo simbionte de *Cyphomyrmex sp*, que não utiliza folhas frescas como substrato, e que, além de produzir alta atividade de pectinase, produz também celulase, em grande quantidade.

Observamos também um comportamento diferenciado na produção de amilase pelo fungo simbionte de *Cyphomyrmex sp*, que foi o fungo que produziu uma menor concentração desta enzima juntamente com o simbionte de *Mycetarotes parallelus*.

De modo geral, com relação à biomassa, proteína/biomassa e despolimerases, os simbiontes de *Atta sexdens* e *Acromyrmex laticeps* formam um grupo isolado dos demais simbiontes estudados. Estes simbiontes apresentam menor velocidade de crescimento com relação aos demais, mas que é compensada pela alta capacidade de produção de enzimas. Estes resultados estão de acordo com os já observados anteriormente, quando o fungo simbionte de *Mycetarotes parallelus* apresentou um crescimento mais rápido do que *L. gongylophorus*, o fungo simbionte de *Atta sexdens*. Portanto, era de se esperar que as colônias de *M. parallelus* fossem maiores do que as de *A. sexdens*, mas ocorre justamente o contrário. Colônias de *Atta sexdens* podem atingir em torno de 10^6 indivíduos (Stradling, Powell, 1985), enquanto que em ninhos de *M. parallelus* existem apenas algumas dezenas de indivíduos (Leal, 1998).

No entanto, o crescimento lento de *L. gongylophorus* pode ser compensado por sua alta capacidade de produzir enzimas. Portanto, além da biomassa fúngica, a quantidade de enzimas produzidas pelo fungo pode influenciar diretamente na alimentação das formigas, e

conseqüentemente no tamanho dos ninhos. Assim, o desenvolvimento de uma alta capacidade de produzir despolimerases pelo fungo simbiote parece ser uma característica importante na evolução das formigas da tribo Attini.

A simbiose entre fungos e formigas parece existir há vários milhões de anos, havendo uma co-evolução dos dois organismos, de modo que alguns ramos do cladograma de filogenia dos fungos, baseado em marcadores moleculares, são congruentes com a filogenia das formigas, com base na morfologia larval (Hinkle et al., 1994; Chapela et al., 1994). Nestas condições, esperam-se encontrar integrações metabólicas entre os simbios, desenvolvidas durante estes anos de co-evolução.

Se considerarmos a alta capacidade de produzir enzimas um comportamento derivado entre os simbios, os fungos cultivados por *Atta* e *Acromyrmex* são, sem dúvida, mais derivados, pertencentes ao grupo 1, assim como definiu Chapela et al. (1994), baseado em marcadores moleculares. Com relação aos demais isolados, podemos observar que, o simbiote de *Trachymyrmex fuscus* aparece algumas vezes formando um segundo grupo, que poderia ser um grupo formado por simbios intermediários. Seguindo esta mesma linha, podemos classificar os demais fungos em um terceiro grupo considerado, assim como as formigas, pertencentes a um grupo basal.

Assim como a adaptação da co-evolução entre fungos e formigas originou na formação de gogilídeos, que são estruturas ricas em nutrientes localizadas nas hifas (Quilan, Cherrett, 1979), e são produzidos geralmente por simbios de formigas derivadas (Mueller et al., 2001), embora já tenha sido observado, em fungos simbios de formigas primitivas (A.C.O. Silva-Pinhati, não publicado), também a alta capacidade de produzir enzimas pode ser uma inovação evolucionária, já que os fungos simbios de formigas derivadas (*Atta* e *Acromyrmex*) têm maior capacidade de produzir enzimas do que fungos simbios de formigas primitivas podendo assim suportar o tamanho e estrutura dos ninhos que aumentam de acordo com a derivação da espécie.

Tabela 1. Fungos simbiossantes de formigas da tribo Attini.

Fungo Simbionte	Localização dos ninhos	Isolamento
<i>Atta sexdens</i>	Rio Claro – SP	01/2001
<i>Acromyrmex laticeps</i>	Almeirim - PA	08/1998
<i>Trachymyrmex fuscus</i>	Rio Claro – SP	07/1997
<i>Mycetarotes parallelus</i>	Rio Claro – SP	07/1997
<i>Cyphomyrmex sp</i>	Rio Claro - SP	10/2002
<i>Apterostigma sp</i>	Rio Claro - SP	10/2002

Tabela 2. Determinação de pH ótimo de cultivo dos fungos simbiossantes de formigas Attini (n=6).

Simbiossantes	pH								
	3,0	4,0	4,6	4,8	5,0	5,2	5,4	7,0	Controle
<i>Atta sexdens</i>	22 ± 1	31 ± 7	51 ± 9	68 ± 1	71 ± 1	40 ± 10	30 ± 2	20 ± 0,9	25 ± 4
<i>Acromyrmex laticeps</i>	19 ± 0,9	22 ± 1	49 ± 2	66 ± 3	63 ± 2	39 ± 0,9	36 ± 2	15 ± 2	22 ± 3
<i>Trachymyrmex fuscus</i>	28 ± 2	36 ± 3	54 ± 5	85 ± 3	92 ± 1	86 ± 3	66 ± 3	17 ± 1	38 ± 5
<i>Cyphomyrmex sp</i>	23 ± 3	34 ± 1	52 ± 2	83 ± 2	73 ± 3	65 ± 3	43 ± 7	20 ± 1	31 ± 1
<i>Mycetarotes parallelus</i>	17 ± 1	35 ± 10	89 ± 11	105 ± 10	87 ± 13	74 ± 15	66 ± 5	18 ± 2	49 ± 9
<i>Apterostigma sp</i>	52 ± 2	51 ± 10	81 ± 2	128 ± 2	98 ± 0,9	100 ± 1	97 ± 1	33 ± 6	55 ± 4

Tabela 3. Determinação de temperatura ótima de cultivo dos fungos simbiossantes de formigas Attini (n=6).

Simbiossantes	Temperatura (° C)			
	20	25	30	35
<i>Atta sexdens</i>	50 ± 7	67 ± 3	47 ± 2	30 ± 6
<i>Acromyrmex laticeps</i>	48 ± 5	72 ± 4	42 ± 4	36 ± 4
<i>Trachymyrmex fuscus</i>	83 ± 2	88 ± 1	71 ± 4	55 ± 3
<i>Cyphomyrmex sp</i>	60 ± 6	70 ± 5	48 ± 4	35 ± 2
<i>Mycetarotes parallelus</i>	46 ± 7	82 ± 2	50 ± 1	20 ± 1
<i>Apterostigma sp</i>	71 ± 4	95 ± 3	95 ± 2	40 ± 6

Tabela 4. Produção de biomassa, proteínas e enzimas após 30 dias de cultivo em meio contendo amido como única fonte de carbono pelos fungos simbiontes de *Atta sexdens*, *Mycetarotes parallelus*, *Acromyrmex laticeps*, *Trachymyrmex fuscus*, *Apterostigma sp* e *Cyphomyrmex sp*. Valores significativamente diferentes (teste de Tukey) estão sobrescritos por números distintos (n = 6).

Simbiontes	Biomassa (mg)	Proteínas (µg/ mg de biomassa)	Pectinase (µmol/mg/h)	Xilanase (µmol/mg/h)	Amilase (µmol/mg/h)	Celulase (µmol/mg/h)
<i>Atta sexdens</i>	10,7 ± 3,7 ²	15,0 ± 0,46 ¹	14150±2198 ¹	706 ± 87 ¹	897 ± 153 ¹	422 ± 77 ¹
<i>Acromyrmex laticeps</i>	10,7 ± 1,8 ²	16,0 ± 2,0 ¹	14000±430 ¹	895 ± 65 ¹	1081 ± 70 ¹	499 ± 71 ¹
<i>Trachymyrmex fuscus</i>	19,6 ± 6,0 ^{1,2}	9,0 ± 0,7 ²	9625 ± 900 ²	788 ± 80 ¹	428 ± 61 ²	280 ± 34 ²
<i>Cyphomyrmex sp</i>	24,0 ± 4,1 ¹	6,0 ± 0,7 ²	7127±785 ^{2,3}	431 ± 63 ²	107 ± 19 ³	400 ± 50 ^{1,2}
<i>M. parallelus</i>	24,0 ± 3,6 ¹	6,9 ± 1,5 ²	4742 ± 495 ³	521 ± 46 ²	198 ± 45 ³	209 ± 14 ²
<i>Apterostigma sp</i>	19,2 ± 2,4 ^{1,2}	6,0 ± 0,8 ²	5051 ± 332 ³	561 ± 50 ²	497 ± 35 ²	293 ± 27 ²

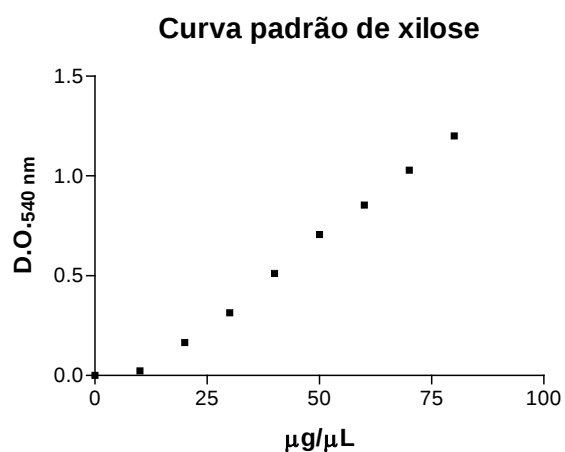
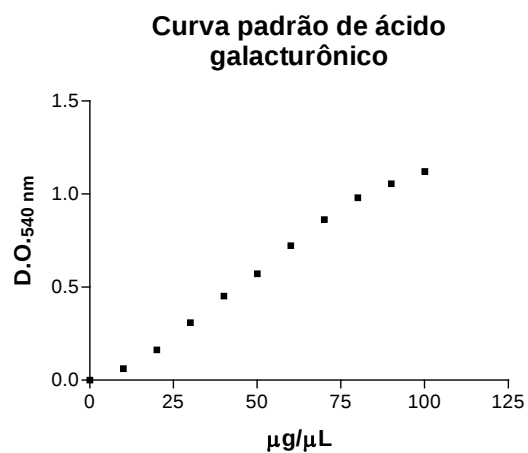
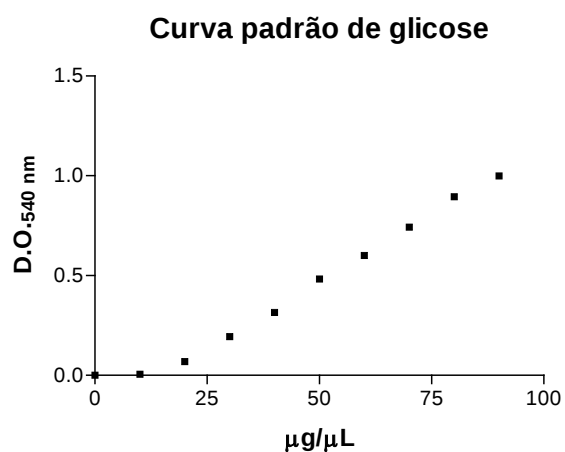
REFERÊNCIAS

- 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*. *Antonie van Leeuwenhoek Amsterdam*, v. 67, n. 4, p. 385-386, 1995.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.
- Brandão, C. R. F.; Mahyé-Nunes, A. J. A New Fungus-Growing Ant Genus, *Mycetagroicus* gen. n., with the Description of Three New Species and Comments on the Monophyly of the Attini (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, 38: 639-665, 2002.
- Chapela, I. H.; Rehner S. A.; Schultz T. R.; Muller U. G. Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi. *Science*, 266: 1691-1694, 1994.
- Hinkle, G.; Wetterer J. K.; Schultz T.; Sogin M. L. Phylogeny of the attine fungi based on analysis of small subunit ribosomal RNA gene sequences. *Science*, 226: 1695-1697, 1994.
- Hölldobler, B.; Wilson E. O. *The Ants*. The Belknap Press of Harvard University Press. Cambridge, MA, USA, 1990.
- Mayhé-Nunes, A. J. *Filogenia de los Attini (Hym., Formicidae): un aporte al conocimiento de las hormigas fungívoras*. Caracas, 1995. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidad Simón Bolívar.
- Leal, I. R. *Ecologia e história natural de formigas Attini em vegetação de cerrado*. Campinas, 1998. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas (Ecologia) – Instituto de Biologia) - Universidade Estadual de Campinas.
- Leal, I. R., Oliveira, P. S. Interaction between fungus-growing ants (Attini), fruits and seeds in cerrado vegetation of southeast of Brazil. *Biotropica*, v. 30, p. 170-178, 1998.
- Miller, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, v. 31, p. 426-428, 1959.
- Mueller, U. G. Ant versus fungus versus mutualism: Ant-cultivar conflict and the deconstruction of the attine ant-fungus symbiosis. *American Naturalist*, 160: S67-S98, 2002.

- 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 of Biology* , New York, v. 76, n. 2, p. 169-197, 2001.
- Powell, R. J.; Stradling, D. J. Factors influencing the growth of *Attamyces bromatificus*, a symbiont of Attini ants. *Trans. Br. Mycol.*, v. 87, p. 205-213, 1986.
- Quinlan, R. J.; Cherrett, J. M. The role of fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.). *Ecological Entomology London*, v. 4, n. 2, p. 151-160, 1979.
- Silva, A.C.O. *Isolamento do fungo simbiote da formiga *Mycetarotes parallelus* e avaliação de suas habilidades metabólicas*. Rio Claro, SP, 1999 (Tese de Mestrado. Instituto de Biociências, UNESP).
- Silva-Pinhati, A. C. O.; Siqueira C. G; Bacci Jr., M; Pagnocca, F. C.; Bueno O. C.; Hebling, M. J. A. Isolation and maintenance of symbiotic fungi of ants in the tribe Attini. *Neotropical Entomology* (no prelo)
- 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 the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 4820-4822, 1998.
- Schultz, T. R.; Meier, R. A phylogenetic analysis of the fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini) based on morphological characters of the larvae. *Systematic Entomology Oxford*, v. 20, n. 4, p. 337-370, 1995.
- Stradling D. J.; Powel, R. J. The cloning of more highly productive fungal strains: a factor in the speciation of fungus growing ants. *Experientia*, 42: 962-964, 1986.
- Stoll, V. S.; Blancard, J. S. Buffers: Principles e Practice. In: Deutscher, M. P. *Guide to Protein Purification*. Pasadena: Academic Press, v. 182. cap. 4, p. 31-32, 1990.
- Wilson, E. O. *The insect societies*. Cabridge: Belknap Press of Havard University Press, 548 p., 1971.
- Zar, J. R. *Bioestatistical Analysis*. 3 ed. Upper Saddle River, Prentice Holl, 1996.

ANEXO 1

Abaixo estão as curvas-padrões de glicose, xilose e ácido galacturônico pelo método de ADNS. As curvas estão em $\mu\text{g} / \mu\text{L}$. O fator de absorvidade não foi calculado, pois as curvas não partem do zero.



CAPÍTULO V

Morfologia e evolução de alguns fungos simbiontes de atíneos

Manuscrito

MORFOLOGIA E EVOLUÇÃO DE ALGUNS FUNGOS SIMBIONTES DE ATÍNEOS

Ana Carla O. Silva-Pinhati, Maurício Bacci Jr., Alexandra Cardim Di Chiacchio, Fernando Carlos Pagnocca, Odair C. Bueno e Maria José A. Hebling.

RESUMO

Os gongilídeos são estruturas ricas em nutrientes e estão localizados nas extremidades das hifas de fungos simbiontes de formigas da tribo Attini. É possível que a presença e o tamanho dos gongilídeos estejam relacionados a quantidade de reserva de nutrientes disponíveis para as formigas, e que estes sejam fatores importantes no desenvolvimento dos ninhos. Em nossos resultados observamos que os fungos simbiontes de *Atta* e *Acromyrmex*, que são os gêneros mais derivados dentro da tribo Attini, produzem gongilídeos de tamanho maior que os simbiontes de *Trachymyrmex* por isso o tamanho dos gongilídeos pode ser um fator importante na evolução destes simbiontes, que passaram a produzi-los de acordo com a derivação da tribo. Em estudos filogenéticos, nós observamos que há uma similaridade muito grande entre os espaçadores ribossomais ITS1 e ITS2 (ITS = “*internal transcribed spacer*”) dos fungos cultivados por *Atta* e *Acromyrmex*, indicando que eles são muito próximos evolutivamente, estes mesmos resultados foram observados com relação ao tamanho dos gongilídeos que também não separa em um grupo os simbiontes de *Atta* e em outro grupo os simbiontes de *Acromyrmex*. Observamos também que o simbiote de *Trachymyrmex*, utilizado em nossos estudos, pertence ao grupo cultivado por formigas primitivas e, portanto, além do tamanho dos gongilídeos, a presença destas estruturas neste simbiote, se torna muito interessante, uma vez que gongilídeos foram observados, até o momento, somente em fungos simbiontes de formigas dos gêneros derivados.

INTRODUÇÃO

As formigas da tribo Attini nos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* são herbívoros dominantes das Américas (Hölldobler, Wilson, 1990; Weber, 1972a). Tal dominância resulta da integração metabólica entre os simbioss (Bass, Cherret, 1995; Bass, Cherret, 1996; Martin, 1970; North et al., 1997; Siqueira et al., 1998), que foi aprimorada durante cerca de 60 milhões de anos de co-evolução (Chapela et al., 1994; Hinkle et al., 1994).

Fungos e formigas se beneficiam com a relação simbiótica, uma vez que os fungos são utilizados na dieta destes insetos e provêm enzimas e nutrientes às larvas e às formigas adultas (Boyd, Martin, 1975; Quinlan, Cherrett, 1979; Bass, Cherrett, 1995); as formigas, em retribuição, neste mutualismo obrigatório, fornecem aos fungos substratos para crescimento e proteção contra parasitas e competidores (Quilan, Cherrett, 1977; Currie, 2001b).

Os fungos simbioss das formigas da tribo Attini estão divididos, segundo Chapela et al. (1994) e Mueller (2002), em 4 grupos gênicos: G1 formado por simbioss de formigas derivadas, G3 por simbioss de formigas primitivas, G2 formado por simbioss de formigas do gênero *Apterostigma* e G4 formado também por simbioss de *Apterostigma*. Fungos G2 e G4 podem pertencer às famílias Tricholomataceae ou Pterulaceae, que são distantes dos fungos cultivados pelas demais representantes da tribo (Chapela et al., 1994; Villesen et al., 2004; Munkacsi et al., 2004) e fungos G1 e G3 que são pertencetes a família Lepiotaceae. Os fungos simbioss de *Trachymyrmex* apresentam algumas espécies definidas como grupo 1 (cultivados por formigas derivadas) e outras definidas como pertencentes ao grupo 3 (cultivados por formigas primitivas) (Chapela, et al. 1994; Muller, 2002).

A co-evolução entre formigas e fungos resulta na grande eficiência da formigas na exploração da vegetação em seus ambientes naturais (Wint, 1983) e faz delas importantes pragas agrícolas responsáveis por prejuízos anuais de milhares de dólares (Cherrett, Peregrine, 1976; Fowler et al., 1986). A adaptação da co-evolução entre estes organismos está presente em alguns fungos simbioss, que se especializaram durante os milhões de anos de co-evolução. Um exemplo disso são os gongilídeos, que são estruturas ricas em nutrientes localizadas nas hifas (Quilan, Cherrett, 1979), e são produzidos geralmente por simbioss de formigas derivadas (Mueller et al., 2001), indicando que esta estrutura pode ser uma inovação evolucionária, derivada de estruturas homólogas de simbioss de aténeos primitivos (Mueller et al., 2001).

Os gongilídeos são estruturas esféricas localizadas nas extremidades das hifas dos fungos e cujo único propósito aparente é servir de alimento para as formigas cortadeiras (Weber, 1972a). Estas estruturas, que jamais foram descritas para basidiomicetos de vida livre, são ricas em nutrientes (Quilan, Cherrett, 1979) e contêm quantidades de trealose e glicogênio (Martin *et al.*, 1969), que são supostamente assimiladas quando as formigas ingerem o conteúdo celular das hifas fúngicas.

A quantidade de gongilídeo parece estar relacionada com a quantidade de alimento disponível para as formigas, influenciando diretamente no número de indivíduos que um determinado ninho é capaz de produzir (Stradling, Powell, 1986). Portanto, é possível que o tamanho dos gongilídeos esteja relacionado à quantidade de reserva de nutrientes disponíveis para as formigas, e que este seja um fator importante no desenvolvimento dos ninhos. Para determinar se o tamanho dos gongilídeos dos simbioses, e provavelmente a quantidade de nutrientes disponíveis dentro deles para formigas, varia nos isolados fúngicos de algumas espécies de cortadeiras, no presente trabalho foi realizada uma caracterização morfológica dos simbioses de *Acromyrmex hispidus fallax*, *Acromyrmex rugosus*, *Acromyrmex subterraneus subterraneus*, *Acromyrmex disciger*, *Atta bisphaerica*, *Acromyrmex laticeps*, *Atta laevigata* 1, *Atta laevigata* 2, *Atta sexdens rubropilosa*, *Acromyrmex subterraneus bruneus*, *Trachymyrmex fuscus*. Nós observamos que estes fungos podem ser divididos em três grupos, com base no tamanho dos gongilídeos. Em seguida, foram realizados estudos filogenéticos dos simbioses para determinar os grupos gênicos a que cada um deles pertence.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolamento e manutenção dos fungos simbioses. O procedimento de alta eficiência para o isolamento de fungos simbioses de atíneos é aquele descrito por Silva-Pinhati, et al. 2004 (no prelo). Os ninhos de formigas foram localizados e, após escavação do solo, porções da esponja fúngica, uma mistura de fungo simbiote e fragmentos de vegetação coletada pelas formigas, foi coletada, juntamente com as formigas, e mantidas em laboratório a 25° C e 80 % de umidade, por aproximadamente 10 dias. Neste período, as formigas procederam à limpeza das esponjas estimulando o crescimento do fungo, que foi então coletado e, assepticamente, transferido para meio YNB (Yest Nitrogen Base, Difco 100697), contendo 0,5 g . 100 mL⁻¹ de glicose e 0,1 g . 100 mL⁻¹ de pentabiótico veterinário (Wyeth). Após 30 a 60 dias de cultivo, a 25° C, culturas puras dos fungos simbioses foram transferidas para meio de cultivo B que

contém em cada litro, 10 g de glicose (Labsynth G1008.01.AH), 2 g de NaCl (Labsynth C1060.01.AH), 2 g de peptona (Sigma P-0556), 10 g de extrato de malte (Difco 0186-01), 2 g de amicase (Sigma A-2427), 2 g de flocos de soja, 2 g de flocos de aveia, 17 g de agar-ágar (Acumedia 7178A) (Pinhati-Silva, et al. 2004 no prelo). As culturas foram incubadas a 25° C e renovadas a cada 40 dias.

Extração de DNA. Porções de fungos foram congeladas em nitrogênio líquido dentro de um micro-tubo, trituradas com pistilo plástico e incubadas com 0,55 mL de solução de lise (Tris - 250 mM pH 7,5; NaCl - 2M; EDTA - 100 mM; SDS - 2 %), a 55° C, por 3 horas. Após este tempo, as proteínas foram precipitadas com 0,25 mL de NaCl 5M, o DNA foi precipitado com isopropanol 100 %, lavado com etanol 70 %, ressuspendido com TE e verificado em gel de agarose 1 %.

Amplificação. O segmento de DNA nuclear foi amplificado com os iniciadores ITS 1 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) e ITS 2 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) (White, et al. 1990). Cada reação continha em torno de 100 ng de DNA genômico, 6 pmol de cada iniciador, 1 porção de reagente PCR Ready-to-Go (Amersham 27-9555-01) e incluía uma desnaturação (94° C, 3 min), seguida de 30 ciclos de PCR (94° C-10 seg, 50° C-1 min, 72° C-3 min) e uma extensão final (70° C-15 minutos), resultando em um fragmento de DNA com aproximadamente 600 pares de bases.

Clonagem e Seqüenciamento. Os produtos de PCR foram purificados com o kit Wizard PCR Preps (Promega A7170) e clonados com o kit pGemT Vector System I (Promega A3600). Os fragmentos ligados foram transfectados por choque térmico (Sambrook et al., 2001) em células de *E. coli* DH5 α , XL1 Blue ou DH10B, que foram transferidas para placas de petri com meio LB acrescido de 0,1mg/mL de ampicilina, 1,8 % de X-gal e 76 mM de IPTG. As placas foram, então, incubadas a 37° C, por 24h, e as colônias selecionadas foram transferidas para meio LB líquido com 0,1 mg/mL de ampicilina e incubadas a 37° C, por 22 h. Os plasmídeos recombinantes foram purificados por miniprep (Sambrook et al., 2001) e seqüenciados. A reação de seqüenciamento continha 100 ng de produtos de PCR ou 500 ng de DNA plasmidial, 6 pmol de iniciadores (os mesmos utilizados para a amplificação de um determinado produto ou os iniciadores vetoriais T7 e SP6 para os plasmídeos recombinantes),

4 µL de Big Dye (PE Applied Biosystems 4303153) e foi conduzida com uma desnaturação inicial (96° C-90 seg), seguida de 25 ciclos de PCR (96° C-12 seg, 50° C-6 seg, 60° C-4 min). Após a reação, os produtos de seqüenciamento foram purificados conforme recomendado pelo fabricante e separados em gel de poliacrilamida em um seqüenciador ABI 377 (PE Applied Biosystems).

Estudos filogenéticos. As seqüências geradas foram comparadas às já depositadas no GenBank, através do aplicativo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). As seqüências geradas e suas homólogas do GenBank foram alinhadas pelos aplicativos ClustalW (Thompson et al., 1994), e o alinhamento foi refinado manualmente. Regiões ambíguas quanto ao alinhamento foram excluídas das análises filogenéticas, que foram feitas por parcimônia máxima, utilizando o aplicativo PAUP* 4.0b4a (Swofford, 2000).

Caracterização morfológica. Porções de micélio fúngico ($6,0 \pm 0,5$ mg), mantidas em culturas de 30 dias em meio B foram retiradas e homogeneizadas em 10 mL de água deionizada estéril. Quatrocentos µL desta suspensão foram transferidos e espalhados sobre a superfície de meio B inclinado em tubo de ensaio, totalizando 20 réplicas para cada isolado fúngico. As culturas foram então mantidas a 25° C, por 40 dias e, a cada dois dias, amostras de micélio fúngico foram retiradas dos meios e fotografadas sob microscópio óptico Leica, modelo DMLB. As dimensões dos gongilídeos foram determinadas medindo-se, através do aplicativo Leica EWS 2100, o diâmetro de 4 a 72 estruturas de cada uma das amostras.

Estatística. O diâmetro médio, o desvio padrão e a significância das diferenças encontradas entre os gongilídeos em cada uma das amostras foram determinados através do teste de Tuckey (Zar, 1996).

RESULTADOS

Foram isolados 13 fungos simbioss de formigas dos gêneros *Acromyrmex*, *Atta*, *Trachymyrmex* e *Mycetarotes* (tabela 1).

Análises morfológicas

Análises morfológicas preliminares foram realizadas com dois dos isolados fúngicos cultivados em meio B e mostraram que o diâmetro médio dos gongilídeos do fungo simbiote de *Acromyrmex hispidus fallax* aumenta nos vinte primeiros dias de cultivo e permanece constante até o trigésimo nono dia. Para o fungo simbiote de *Trachymyrmex fuscus* não foi determinada variação significativa no diâmetro médio dos gongilídeos durante a incubação, embora os valores observados tenham sido sempre menores do que aqueles observados para simbiote de *Acromyrmex hispidus fallax* (figura 1).

Para caracterizar os diâmetros dos gongilídeos dos demais isolados, culturas fúngicas em meio B foram preparadas e incubadas por 20 a 30 dias. Os resultados para cada um dos isolados foram submetidos ao teste ANOVA (IC = 95%, $F = 221$, $p < 0,001$, $r^2 = 0,94$), seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey, que apontaram para a existência de três grupos morfológicos distintos (figura 2): grupo 1: simbioss de *Acromyrmex hispidus fallax* ($42 \pm 6,7 \mu\text{m}$, $n = 71$), *Acromyrmex rugosus* ($45 \pm 15,9 \mu\text{m}$, $n = 4$), *Acromyrmex subterraneus subterraneus* ($44 \pm 6,9 \mu\text{m}$, $n = 16$), *Acromyrmex disciger* ($44 \pm 8,4 \mu\text{m}$, $n = 36$) e *Atta bispherica* ($40 \pm 7,2 \mu\text{m}$, $n = 33$); grupo 2: simbioss de *Acromyrmex laticeps* ($11 \pm 3,9 \mu\text{m}$, $n = 4$), *Atta laevigata* 1 ($28 \pm 5,6 \mu\text{m}$, $n = 6$), *Atta laevigata* 2 ($33 \pm 58,7 \mu\text{m}$, $n = 21$), *Atta sexdens rubropilosa* ($33 \pm 5,7 \mu\text{m}$, $n = 52$) e *Acromyrmex subterraneus bruneus* ($28 \pm 5,0 \mu\text{m}$, $n = 10$); grupo 3: simbioss *Trachymyrmex fuscus* ($10 \pm 1,7 \mu\text{m}$, $n = 72$).

Análises filogenéticas

Foram seqüenciados genes de 13 fungos simbioss de formigas representativas de quatro gêneros: *Atta*, *Acromyrmex*, *Trachymyrmex* e *Mycetarotes*, resultando em dois grupos distintos, um contendo os fungos simbioss de *Atta* e *Acromyrmex*, e outro contendo representantes simbioss de *Trachymyrmex* e *Mycetarotes* (figura 4). Observamos que os fungos simbioss de *Atta* e de *Acromyrmex* formam um grupo extremamente coeso e revelam uma similaridade muito grande entre as regiões espaçadores ribossomais ITS1 e ITS2 (ITS =, “internal transcribed spacer”), as seqüências obtidas apresentando acima de 97% (programa

DNADIST versão 3.5c) de identidade, o mesmo foi observado para outros simbioses de atíneos derivados em recente trabalho de Silva-Pinhati et al., 2004. É interessante ressaltar que a sequência destes fungos não pôde sequer ser alinhada com aquelas dos simbioses de *Trachymyrmex* e *Mycetarotes*.

Na figura 4 está a análise dos simbioses de *Trachymyrmex* e *Mycetarotes*, que aparecem mais próximo a outros simbioses de atíneos primitivos. O fungo simbiote de *Mycetarotes parallelus* isolado em nosso laboratório pertence a uma clade distinta daquela que contém o fungo simbiote de *M. parallelus*, já sequenciado por Mueller et al. (1998) e depositado no GenBank. O mesmo acontece com o fungo simbiote de *Trachymyrmex fuscus*, isolado e sequenciado no presente trabalho, e o simbiote de *Trachymyrmex papulatus*, cuja sequência foi obtida por Mueller et al. (1998) e está depositada no GenBank.

DISCUSSÃO

Os gongilídeos são produzidos geramente por fungos cultivados por formigas derivadas (Quinlan, Cherrett, 1979) e até o momento não foram observados em fungos cultivados por formigas primitivas (Mueller et al., 2001). Estas estruturas parecem ser uma modificação evolucionária que ocorreu nos simbioses de formigas derivadas para facilitar a coleta, consumo e transporte dos nutrientes pelas formigas (Mueller, 2002).

Podemos separar então os fungos simbioses em dois grupos, os que produzem e os que não produzem gongilídeos. No entanto, o que observamos na figura 2 é que o fungo simbiote de *Trachymyrmex* que tem algumas espécies definidas como grupo 1 (cultivados por formigas derivadas) e outras definidas como pertencentes ao grupo 3 (cultivados por formigas primitivas) (Chapela, et al. 1994; Mueller et al, 1998; Mueller, 2002), produz gongilídeos de tamanho menor com relação aos demais fungos. Portanto não só a presença, mas o tamanho dos gongilídeos, e provavelmente a quantidade de nutrientes disponíveis dentro deles, pode ser um fator importante na evolução destes simbioses, que passaram a produzi-los de acordo com a derivação da tribo.

Através de estudos filogenéticos, (figura 4) observamos que o simbiote de *Trachymyrmex* utilizado em nossos estudos pertence ao grupo 3, ou seja, o grupo formado por fungos cultivados por formigas primitivas e, portanto, além do tamanho dos gongilídeos produzidos pelo simbiote de *Trachymyrmex*, a presença destas estruturas nestes simbioses se torna muito interessante uma vez que gongilídeos foram observadas até o momento

somente em fungos simbiossiontes de formigas derivadas, classificados no grupo 1. Estes resultados sugerem que os demais fungos pertencentes a clade, na qual estão localizados os simbiossiontes de *Trachymyrmex*, podem apresentar gongilídeos. De fato, estas estruturas já foram observadas uma vez em fungo simbiossionte de *Mycetarotes parallelus*, que também pertence ao grupo 3 (figura 4) (A.C.O. Silva-Pinhati, não publicado).

Com relação ao estudo filogenético dos demais fungos, nós observamos que há uma similaridade muito grande entre as regiões espaçadores ribossomais ITS1 e ITS2 (ITS = “*internal transcribed spacer*”) dos simbiossiontes de *Atta* e *Acromyrmex*, indicando que eles são muito próximos evolutivamente, como observado com relação ao tamanho dos gongilídeos, que também não separa em um grupo os simbiossiontes de *Atta* e em outro grupo os simbiossiontes de *Acromyrmex*.

Nossos resultados sugerem que os fungos simbiossiontes de atíneos derivados (gêneros *Atta* e *Acromyrmex*) e os fungos simbiossiontes de *Trachymyrmex* têm um ancestral comum e que a produção de gongilídeos foi aperfeiçoada durante a evolução dos atíneos, indicando que os gongilídeos podem ser uma inovação evolucionária derivada, de estruturas homólogas de fungos de atíneos primitivos, conforme citado por Mueller et al. (2001), sendo estas estruturas homólogas, os gongilídeos de tamanho menor encontrados nos simbiossiontes de *Trachymyrmex*; ou então, que os gongilídeos, mesmo de tamanho menor, já estavam presentes em fungos simbiossiontes de alguns atíneos primitivos e foram aumentando de tamanho de acordo com a derivação dentro da tribo e a conseqüente necessidade de nutrientes devido ao aumento do número de indivíduos e tamanho dos ninhos. Alternativamente, os mesmos resultados podem indicar que a origem dos gongilídeos ocorreu por duas vezes independentemente, uma vez entre os fungos simbiossiontes de *Atta* e *Acromyrmex* e outra entre os fungos simbiossiontes de *Trachymyrmex*.

Tabela 1. Fungos simbiontes de Attini mantidos em culturas em laboratório.

Isolado fúngico	Formiga	Localização do ninho	Data do isolamento
1	<i>Trachymyrmex fuscus</i>	Rio Claro – SP	07/97
2	<i>Acromyrmex hispidus fallax</i>	Rio Claro – SP	03/98
3	<i>Acromyrmex rugosus rugosus</i>	Botucatu – SP	05/00
4	<i>Acromyrmex laticeps</i>	Almeirim - PA	08/98
5	<i>Atta sexdens rubropilosa</i>	Corumbataí - SP	01/01
6	<i>Atta laevigata</i> (isolado 1)	Anhembi – SP	03/00
7	<i>Atta bisphaerica</i>	Botucatu – SP	05/01
8	<i>Atta laevigata</i> (isolado 2)	Anhembi – SP	05/01
9	<i>Acromyrmex subterraneus bruneus</i>	Eldorado – SP	05/01
10	<i>Acromyrmex subterraneus subterraneus</i>	Viçosa – MG	05/01
11	<i>Acromyrmex disciger</i>	Ubatuba – SP	05/01
12	<i>Atta cephalotes</i>	Almeirim- Pará	02/00
13	<i>Mycetarotes parallelus</i>	Rio Claro – SP	07/97

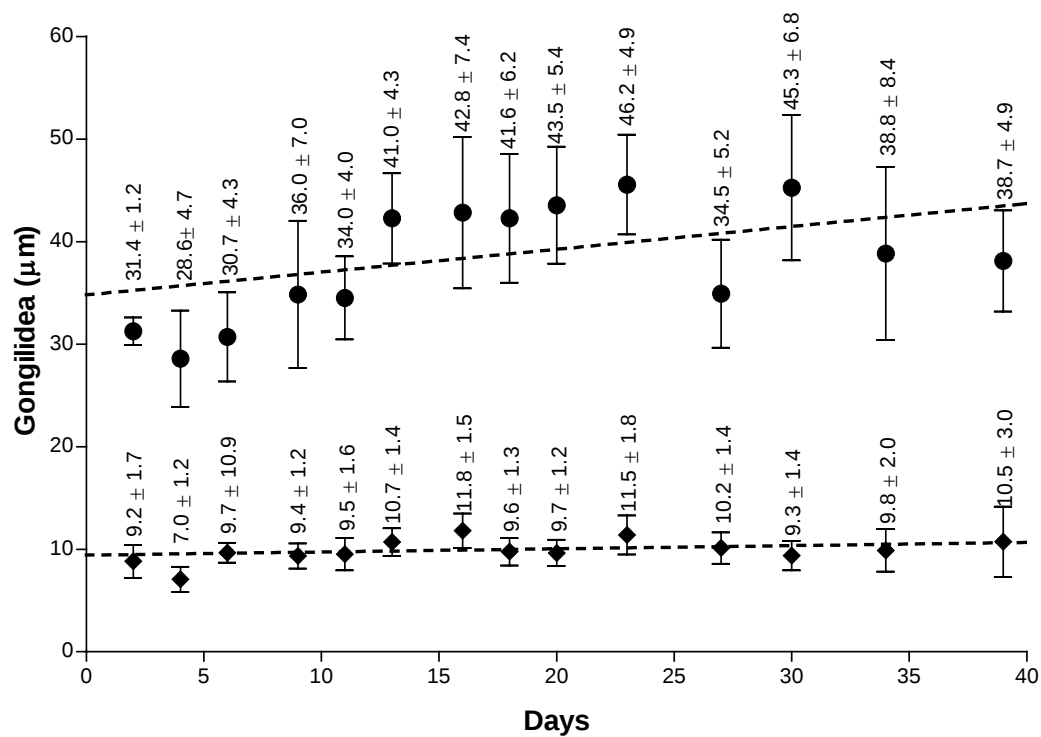


Figura 1. Diâmetro médio do gongilídio em função do tempo de cultivo dos fungos isolados de *Trachymyrmex fuscus* (♦) ou de *Acromyrmex hispidus fallax* (●).

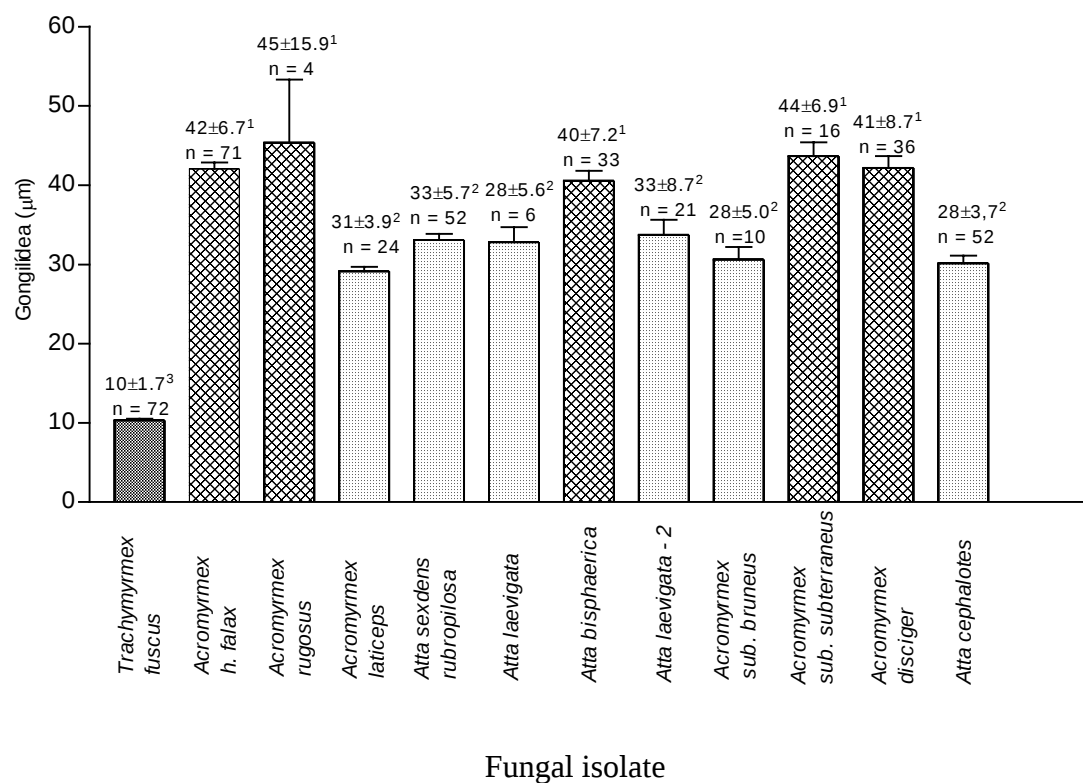


Figura 2. Diâmetro de gongilídeos produzidos por fungos simbiotes de formigas derivadas na tribo Attini. Valores significativamente diferentes (teste de Tukey) estão sobrescritos por números distintos.

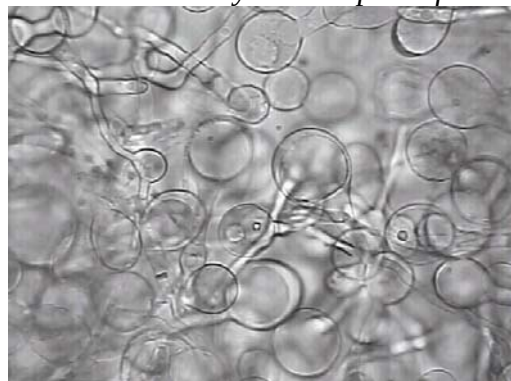
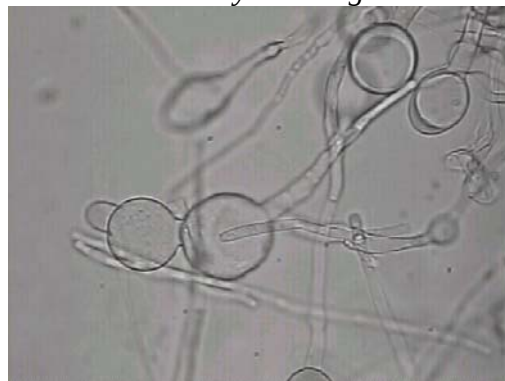
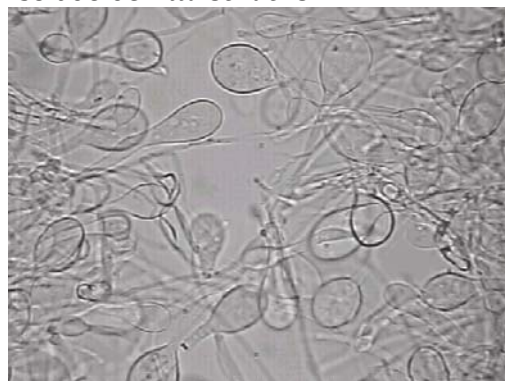
Grupo 1Isolado de *Acromyrmex hispidus fallax*Isolado de *Acromyrmex rugosus***Grupo 2**Isolado de *Atta laevigata*Isolado de *Atta sexdens***Grupo 3**Isolado de *Trachymyrmex fuscus*

Figura 3. Fungos isolados de diferentes atíneos (aumento: 400 x), mostrando representantes dos três grupos morfológicos caracterizados.

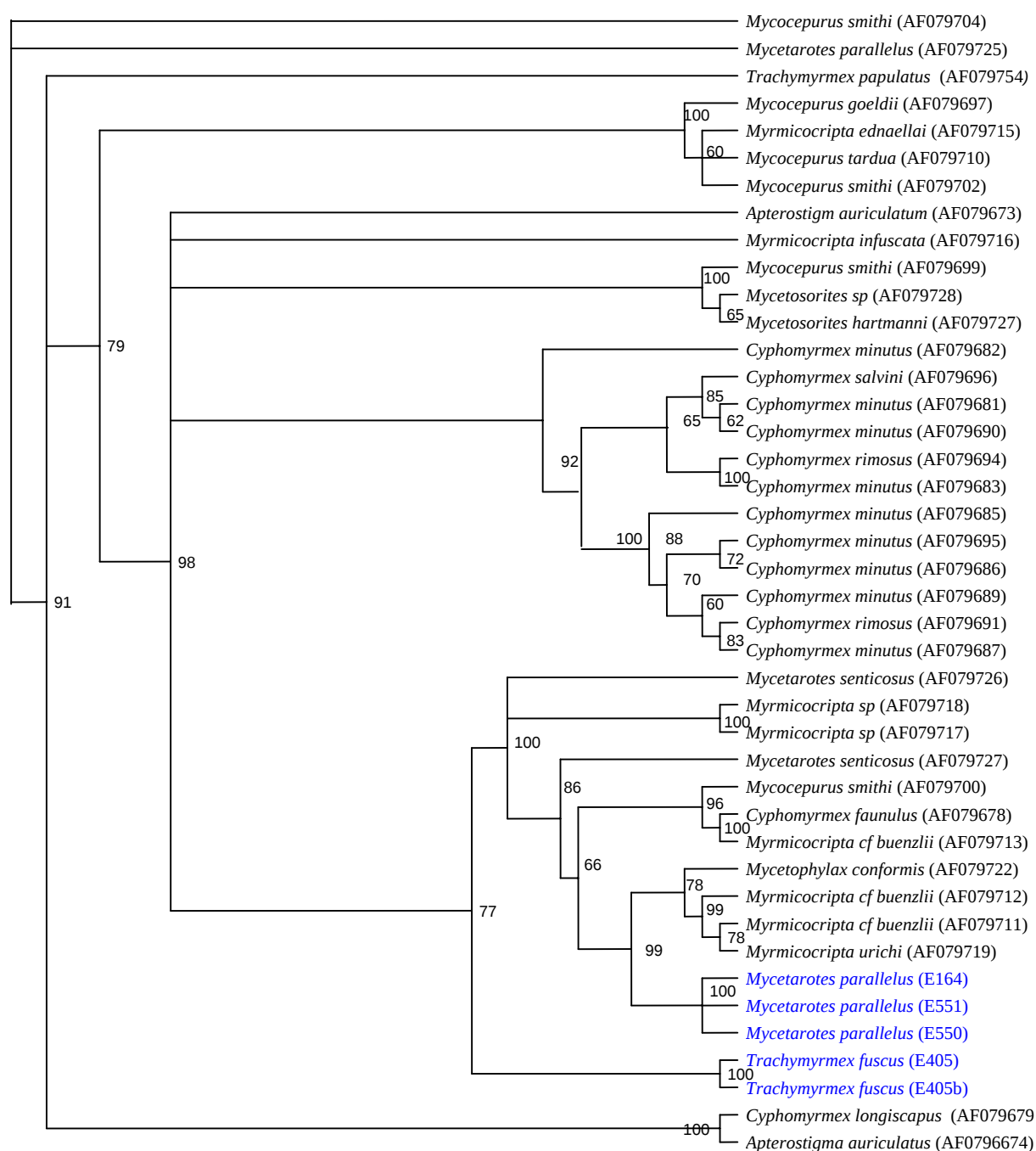


Figura 4. Consenso estrito entre as 6 árvores mais parcimoniosas obtidas a partir da análise de parcimônia de 314 caracteres informativos da região ITS1, 5.8S e ITS2 de fungos simbiotes de atíneos, incluindo os isolados de *Trachymyrmex* e *Mycetarotes* (em azul). Passos = 684, CI = 0,7087 , RI = 0,9107. Os códigos à frente de algumas espécies indicam o número de acesso das seqüências nucleotídicas depositadas no GenBank. Os números à frente da clades são valores de bootstrap, que foram omitidos quando menores do que 50 %.

REFERÊNCIAS

- 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.
- Bass, M.; Cherret J. M. Leaf-cutting ants (Formicidae, Attini) prune their fungus to increase and direct its productivity. *Functional Ecology* 10: 55-61, 1996.
- Boyd, N. D.; Martin, M. M. Faecal proteinases of the fungus growing ant *Atta texana*: properties, significance and possible origin. *Journal of Insect Physiology*, v. 21, p. 1815-1821, 1975.
- Chapela, I. H.; Rehner, S. A.; Schultz, T. R.; Muller, U. G. Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi. *Science*, v. 266, p. 1691-1694, 1994.
- Cherrett, J. M.; Peregrini, D. J. Review of status of leaf-cutting ants and their control. *Annals of Applied Biology Warwick*, v. 84, n. 1, p. 124-128, 1976.
- Currie, C. R. A community of ants, fungi, and bacteria: A multilateral approach to studying symbiosis. *Annual Review of Microbiology Palo Alto*, v. 55, p. 357-380, 2001b.
- Fowler, H. G.; Forti, L. C.; Silva, V. P.; Saes, M. B. Economic of grass-cutting ants *In*: Lofgren, C.S.; Vandermeer, R.K. (eds). *Fire ants and leaf-cutting ants. Biology and management*. Westview Press, Bolder, Colorado and London. p.18-35, 1986.
- Hinkle, G.; Wetterer, J. K.; Schultz, T. R.; Sogin, M. L. Phylogeny of the attine fungi based on analysis of small subunit ribosomal RNA gene sequences. *Science*, v. 226, p. 1695-1697, 1994.
- Hölldobler, B.; Wilson, E. O. *The Ants*. The Belknap Press of Harvard University Press. Cambridge, MA, USA, 1990.
- Martin, J.S.; Martin, M. M. The biochemical basis for the symbiosis between the ant, *Atta colombica tonsipes*, and its food fungus. *J. Insect. Physiol.*, 16: 109-119, 1970.
- Mueller, U. G.; Rehner, S. T.; Schultz, T. R. The Evolution of Agruculture in Ants. *Science*, v. 281, pp. 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 of Biology* , New York, v. 76, n. 2, p. 169-197, 2001.

- Mueller, U. G. Ant versus fungus versus mutualism: Ant-cultivar conflict and the deconstruction of the attine ant-fungus symbiosis. *American Naturalist*, 160: S67-S98, 2002.
- Munkacsi, A. B.; Pan, J. J.; Villesen, P.; Mueller, U. G.; Blackwell, M.; McLaughlin, D. J. Convergent coevolution in the domestication of coral mushrooms by fungus-growing ant. *Proc. Roy. Soc.*, in press.
- North, R. D.; Jackson, C. W.; Howse, P. E.. Evolutionary aspects of ant-fungus interactions in leaf-cutting ants. *Tree.*, v. 12 p. 386-389, 1997.
- Quinlan, R. J., Cherrett, J. M. Role of substrate preparation in symbiosis between leaf-cutting ant *Acromyrmex-Octospinosus*(Reich)and its food fungus. *Ecological Entomology* 2 (2): 161-170, 1977.
- Quinlan, R. J.; Cherret, J. M.. The role of the fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L). *Ecol. Entomol.*, v. 4, p. 151-160, 1979.
- Sambrook, J.; Russel, D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, NY, USA, 2001.
- 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 the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. *Appl. Environm. Microbiol.*, v. 64, p. 4820-4822, 1998.
- Silva-Pinhati, A. C. O.; Siqueira C. G; Bacci Jr., M; Pagnocca, F. C.; Bueno O. C.; Hebling, M. J. A. Isolation and maintenance of symbiotic fungi of ants in the tribe Attini. *Neotropical Entomology* (no prelo).
- Silva-Pinhati, A. C. O.; Bacci Jr, M.; Hinkle, G.; 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 symbiotic fungi of leaf-cutting ants (Attini: Formicidae). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 37, p. 1463-1472, 2004.
- Stradling D. J.; Powel, R. J. The cloning of more highly productive fungal strains: a factor in the speciation of fungus growing ants. *Experientia*, 42: 962-964, 1986.
- Swofford, D. L. Phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0b4a (Ilinois Natural History Survey, Champaign, 2000.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weigh matrix choice. *Nuc. Ac. Res.*, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

- Villesen, P.; Mueller, U. G.; Schutz, T. R.; Adans, R. M. M.; Bouck, A. C. Evolution of ant-cultivar specialization and cultivar switching in *Aperostigma* fungus-growing ants. *Evolution*, in press.
- Weber, N. A. Gardening ants, the Attines. American Philosophical Society, Philadelphia, 1972a.
- Wint, G. R. W.. Leaf damage in tropical rain forest canopies. In: Sutton, S.L.; Whitmore, T.C.; Chadwick, A.C. (eds). *Tropical rain forest: ecology and management*. British Ecological Society, Blackwell Scientific, Oxford, p. 229-239, 1983.
- Zar, J. R. *Bioestatistical Analysis*. 3 ed. Upper Saddle River, Prentice Hall, 1996.

CAPÍTULO VI

**Molecular systematics of ants in the genus *Atta*
(Hymenoptera: Formicidae) based on
mitochondrial DNA sequences.**

Manuscrito

MOLECULAR SYSTEMATICS OF ANTS IN THE GENUS *ATTA* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) BASED ON MITOCHONDRIAL DNA SEQUENCES.

Ana Carla O. Silva-Pinhati, Maurício Bacci Jr., Vanderlei G. Martins, Alfredo O. R. Carvalho, Luiz G. E. Vieira

ABSTRACT

Leaf-cutting ants in the genus *Atta* include species which are major crop pests in the Neotropical Region, this genus sometimes being proposed as polyphyletic, sometimes monophyletic, or divided in three, four or five subgenera, this controversy originating from the limited resolution of the morphologic features which have been used to characterize the *Atta* species, which are the most polymorphic ones within the tribe Attini. To circumvent problems derived from this polymorphism, we have generated mitochondrial DNA sequences corresponding to the Cytochrome Oxidase I, an intergenic spacer (IGS), Leucine tRNA and Cytochrome Oxidase II *loci*, in order to estimate the phylogenetic relationship between 13 of the 14 *Atta* species which are currently recognized, our results indicating that the *Atta* genus is monophyletic and divided at least in four natural groups: group I was composed by *A. insularis*, *A. texana* and *A. mexicana*, which inhabit the North Hemisphere; group II was formed by *A. cephalotes* and *A. colombica*, which are frequent in the Equatorial Region. These are basal groups, from which the remaining *Atta* species originated as two derivate groups: *A. opaciceps*, *A. laevigata*, *A. vollenweideri*, *A. saltensis*, *A. capiguara* e *A. bisphaerica*, called group III; and group IV encompassing the three *A. sexdens* subspecies, among which *A. sexdens piriventris* could be considered as a separated species. Groups I and II corresponded to the already described subgenera *Archeatta* and *Atta* s. str., respectively, as described by Gonçalves in 1942, as the groups III and IV are most similar to those groups described by Borgmeier in 1950 as the subgenera *Epiata* and *Neoatta*, respectively, except that group III contained *Atta bisphaerica* and did not contain *A. robusta*. No evidence was found for the subgenera *Palaeatta*, which was described by Borgmeier (1950).

The genus *Atta* Fabricius 1805 (Hymenoptera; Formicidae; Myrmicinae; Attini) has probably originated in the Amazon region (Weber, 1972a) and currently encompasses fourteen species, some of which are agricultural pests in the Americas and most of which live in Brazil (Bolton, 1995; Bolton, 2003; Della Lucia, 1993).

The systematic of this genus is currently based on morphologic characters, so that it has faced several difficulties due to the high polymorphism between castes in a single nest, as well as within workers in a single species (Borgmeier, 1950). A possible solution to this problem was proposed by Emery (1913), who successfully distinguished several *Atta* species based on the male genitalia, the utilization of this procedure however requiring the collection of males, which are produced only once a year in periods of the year which vary in distinct *Atta* species as well as according to the latitude in which the ants are found, i.e. from South of the United States from the South of Argentina.

Emery's analyses of male genitalia resulted in the division of the *Atta* genus in three groups (Emery, 1913 and 1922) called *Archeatta*, *Atta* s.str. and *Neoatta*, which were further added of new species and elevated to subgenera (Gonçalves 1942, 1944; 1982). *Archeatta* and *Atta* s.str. subgenera were kept in every further classifications, but *Neoatta* subgenus was subdivided in the subgenera *Neoatta*, *Epiatta* and *Palaeatta* (Borgmeier, 1950), re-arranged in *Neoatta* and *Palaeatta* (Borgmeier, 1959) and finally grouped again as *Neoatta* (Gonçalves, 1986).

Phylogenetic studies have proposed some species as the first radiation of the *Atta* genus, such as *A. mexicana* (Gonçalves, 1942), *A. bisphaerica* or *A. goiana* (Borgmeier, 1950) and *A. colombica* (Gonçalves, 1986). This latter species, as well as *A. insularis* and *A. mexicana*, has a male genital apparatus which is highly distinct from those found in the remaining *Atta* species, a fact which led Borgmeier (1950) to question the genus monophyly.

In the present investigation, in order to determine whether the *Atta* genus is mono or polyphyletic, as well as to find out which of the already proposed subgenera are natural groups within the *Atta* genus, we have utilized a method for the study of *Atta* systematics which is independent on the polymorphism within species and consisted in the sequencing of the mitochondrial genes cytochrome-oxidase I and II (COI and COII) and Leucin transporter RNA (tRNA-Leu), as well an intergenic spacer (IGS) which is located between COI and tRNA-Leu. The determined DNA sequences, as well as those retrieved from the GenBank and

belonging to other attine and one non-attine species were utilized to infer the phylogenetic relationships within 13 of the 14 *Atta* species that are currently recognized.

Our results allowed us to establish the monophyly of the *Atta* genus, to infer the phylogenetic relationships between the species of this genus, and to characterize four natural groups within the genus, these groups being confronted to the different subgeneric divisions already proposed.

MATERIAL AND METHODS

Organism: Forty-six attine specimens have been studied, of which 39 belonging to 13 *Atta* species, as described in Table 1. Specimens were deposited in the Laboratory of Molecular Evolution Collection.

DNA extraction: Single entire ant specimens were frozen in liquid nitrogen inside a microtube, disrupted with a pestle and incubated with 0.55 ml lysis buffer (250 mM Tris, pH 5.0, 2 M NaCl, 100 mM EDTA, 2 % SDS) at 55° C for 3 h, after which proteins were precipitated by the addition 0.25 ml 5 M NaCl followed by centrifugation, the supernatant being collected and added of 250 ml of isopropanol, the mixture being centrifuged for precipitation of DNA, which was washed with 70 % ethanol and solubilized in TE buffer.

PCR reaction: A single ~ 600 kb mitochondrial DNA segment containing the target genes and spacer was amplified in a 25 µl PCR reaction containing the Ready-to-Go kit (Amersham 27-9555-01), ~100 ng genomic DNA and 6 pmol primers iniciadores C1-J-2828 (5`-TATAAATCCTTTTTTCTTGAATTTC-3`) and C2-N-3386 (5`-TATCATGTGTGTTCACTATAGTGA-3`), these primers being designed in our laboratory based on GenBank sequences of other attine and non-attine ants and named accordingly to Simon (1994). PCR protocol included a 94° C, 3 min denaturing followed by 30 cycles (94° C-10 seg, 50° C-1 min, 72° C-3 min) and a 70° C-15 min final extension.

Cloning and sequencing: PCR products were purified using the Wizard PCR Preps kit (Promega A7170) and sequenced. *Atta cephalotes* purified PCR products needed to be cloned using the pGemT Vector System I kit (Promega A3600), due to unspecific amplification, the clones being transfected by heat shock (Sambrook et al., 2001) in DH5α *E. coli* cells, the

positive clones being selected and submitted to a mini-prep procedure (Sambrook et al., 2001). Sequencing reactions contained 100 ng amplicon or 500 ng plasmids, 6 pmol primer (the same as for the amplification of a given amplicon to direct sequencing or the vector primers T7 or SP6 for sequencing recombinant plasmids), 4 µl Big Dye (PE Applied Biosystems 4303153) and was carried out with an initial denaturation (96° C-90 seg) followed by 25 PCR cycles (96° C-12 seg, 50° C-6 seg, 60° C-4 min). Sequencing products were purified according to factory's recommendation and resolved in a polyacrylamide gel in an ABI377 automated sequencer (PE Applied Biosystems).

Phylogenetic studies. DNA sequences generated in our study and their homologues retrieved from the GenBank were aligned to each other using the program ClustalW (Thompson et al., 1994), the alignment of COI and COII being refined manually, based on aminoacid codons. When necessary, DNA sequences were compared to each other using the distance values generated according to Jukes and Cantor's substitution model (Jukes, Cantor, 1969) as implemented by the DNADIST program, version 3.5c, contained in the Phylip package (Felsenstein, 1989). Regions containing ambiguous alignment were excluded from the phylogenetic analyses, which were done using parsimony and the program PAUP* 4.0b4a (Swofford, 2000).

RESULTS

Among the 46 specimens studied in our work (table 1), those corresponding to castes within a single nest or populations within a single species had DNA sequences that were identical or nearly identical to each other. Sequences within species differed less than 2 %, so that one representative sequence per species was submitted to the phylogenetic analyses, a procedure which avoided a great number of polytomies in the phylogenetic trees, and thus rendered tractable the computational data.

In addition, because of the high variation of IGS region and the small portion of the 3' end of tRNA-Leu gene, this latter corresponding to 3 to 7 nucleotides in the different studied specimens, it was not possible to unambiguously align the IGS or 3' end of tRNA-Leu gene belonging to *Atta* species and those corresponding sequence segments from specimens in the other ant genera, so that these two fast evolving sequence segments were excluded from the phylogenetic analyses.

These analyses resulted in two most parsimonious trees (MPTs) differing from each other regarding the position of the *Atta insularis*, *A. texana* e *A. mexicana* clade which arose as the first radiation of the genus or as represented in Figure 1. Character re-weighting utilizing the consistency index (Farris, 1969; Carpenter, 1998) resulted in a single MPT whose topology was identical to that shown in Figure 1. For *Atta* species, within which IGS and the 3' end of tRNA-Leu gene were unambiguously aligned, a third analysis was carried out utilizing the full sequence of the amplified fragments, this analysis resulting in a single MPT that, excepted for a inversion in the positions of *Atta bisphaerica* and *A. laevigata*, had identical topology of that shown in Figure 1 and bootstrap values which were higher than those obtained in the first analysis.

Tree represented in figure 1 was rooted with *Tapinoma sp* as the outgroup and shows the *Cyphomyrmex rimosus* as the first radiation within the tribe Attini, followed by a clade composed by attine species within the genera *Trachymyrmex* and *Acromyrmex* and then by the *Atta* genus, which is monophyletic, and divided in two major clades, each of them being divided in two natural groups, the four groups being utilized to test for the validity of the already proposed subgenera for the *Atta* genus (see Discussion section).

It is interesting to note that sequences obtained from *A. sexdens piriventris* differed 12% (DNADIST program) regarding the other *A. sexdens* subspecies, a percentage value which is higher than the 10% difference found between the sequences of *A. saltensis* and *A. vollenweideri* or *A. capiguara* and *A. bisphaerica* or *A. laevigata*, this finding suggesting that *A. sexdens piriventris* should be considered as a separated species.

DISCUSSION

Table 2 shows the 14 *Atta* species which are currently valid (Bolton, 1995 and 2003), the existing conflicts between the different *Atta* subgenera propositions as well as the subgenera division proposed by us in the current work.

Among the four *Atta* groups that we found in our analyses, groups I and II corresponded, respectively, to the subgenera *Archeatta* and *Atta s. str.*, which had been proposed for all the authors who studied this genus to date (Table 2) and as the basal group within the genus. Thus, our results indicated that the subgenera *Archeatta* and *Atta s. str.* are natural groups.

The disagreement between former propositions on *Atta* subdivisions was the grouping of the so-called more derived species, i.e., those not classified as *Archeatta* or *Atta* s. str. subgenera, these species being proposed to belong to a single subgenus, which was called *Neoatta* (Gonçalves, 1942 e 1986), to be split in two subgenera, called *Neoatta* and *Palaeatta* (Borgmeier, 1959) or in three subgenera, called *Neoatta*, *Palaeatta* and *Epiatta* (Borgmeier, 1950).

Our phylogenetic analyses indicated that species not belonging to *Archeatta* or *Atta* s.str. subgenera comprise a monophyletic group within the genus *Atta*, which can be divided in two natural groups, one of which we called Group III and encompassed six species, four of which are classified as *Epiatta* and two as *Palaeatta* by Borgmeier (1950), which was the first author to propose the so-called more derived *Atta* group to be divided in subgenera. We did not find any evidence for the existence of the *Palaeatta* subgenus, which was proposed by Borgmeier (1950, 1959) to include *A. bisphaerica*, *A. saltensis* and *A. goiana* (table 2), since our phylogenetic studies (figure 1) showed that *A. bisphaerica* and *A. saltensis* are not closely related to each other than to the other species belonging to the Group III. Taken together, these results suggest that the *Palaeatta* subgenus should be disregarded and that the *Epiatta* subgenus, which was proposed by Borgmeier (1950) should be kept, but with the species composition shown in the natural group that we called Group III.

Our results also showed that *A. opaciceps* is first radiation within the group III. *A. opaciceps* currently lives in Northwest Brazil, suggesting this region as the origin of the Group III, the remaining species belonging to Group III being invented during a radiation of the ants to the Southwest and South of the South America, where other species within the group III are currently found.

The first radiation within Group IV is *Atta robusta*, which lives in East Brazil, so that it is reasonable to assume that this region is the center for the radiation of species within Group IV, which has *Atta sexdens* subspecies as derivatives, these subspecies spreading from the Southwest Brazil to areas in the South and Central America. At least one of these subspecies, *A. sexdens piriventris*, accumulated genetic differences regarding the other *Atta sexdens* subspecies, these differences being higher than those found between other species of

Atta, so that we propose that *A. sexdens pirventris* should be considered as a separated species and called *Atta piriventris*.

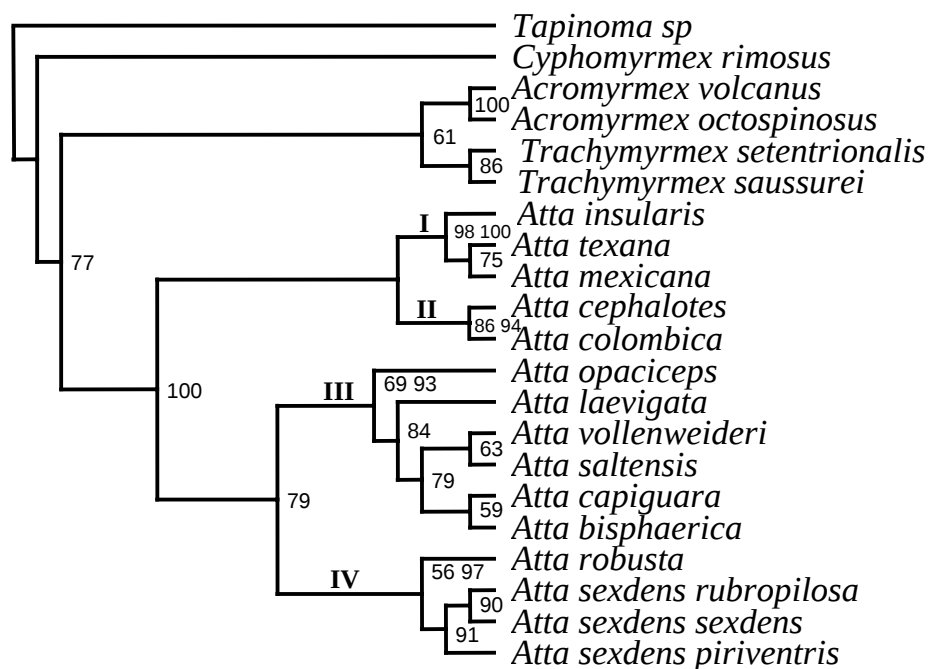


Figure 1. One of the two most parsimonious trees (MPTs) resulted from the analysis of 121 informative-characters of COI, tRNA-Leu and COII of 19 attines and one *Tapinoma sp.* as the outgroup. (Analysis 1: Length = 371; Consistent Index = CI = 0.5714; Retention Index = RI = 0.485). The second MPT was nearly identical to the tree shown in this figure, the difference being the clade formed by *Atta colombica* and *Atta cephalotes* appearing as the first radiation of the genus *Atta*. Identical topology regarding that represented in this figure was obtained after re-weighting the characters utilizing the consistency index (Farris, 1969; Carpenter, 1998), which resulted in a single MPT (Analysis 2: Length = 164.89196, CI = 0.7248, RI = 0.8496), as well as analyzing only the 15 *Atta* species and subspecies utilizing character re-weight and the 186 parsimony-informative characters COI, IGS, tRNA-Leu and COII, which also resulted in a single MPT (Analysis 3: Length = 164.89196, CI = 0.7248, RI = 0.8496). Numbers ahead each clade are bootstrap values (1,000 heuristic searches with 100 pseudo-replicates per search) obtained in the analysis 1 and which were omitted when lower than 50 %. The second numbers ahead the clades are also bootstrap values (1,000 heuristic searches with 100 pseudo-replicates per search) that were obtained in the analysis 3. Ant groups corresponding to *Atta* putative subgenera are numbered I to IV.

Table 1. Attini ants and nest location.

Ants	Nest location
<i>Atta sexdens piriventris</i>	Porto Alegre-RS
<i>Atta sexdens piriventris</i>	São Mateus do Sul-PR
<i>Atta sexdens piriventris</i>	Pato Branco-PR
<i>Atta sexdens rubropilosa</i>	Assis-SP
<i>Atta sexdens rubropilosa</i>	Dourados-MS
<i>Atta sexdens rubropilosa</i>	Inajá-PR
<i>Atta sexdens rubropilosa</i>	Botucatu-SP
<i>Atta sexdens sexdens</i>	Cruz das Almas-BA
<i>Atta sexdens sexdens</i>	Mundo Novo-BA
<i>Atta sexdens sexdens</i>	Bananeiras-PB
<i>Atta opaciceps</i>	Solânea-PB
<i>Atta robusta</i>	Guarapari-ES
<i>Atta robusta</i>	Ilha de Guriri-ES
<i>Atta robusta</i>	São João da Barra-RJ
<i>Atta capiguara</i>	Guairaçá-PR
<i>Atta capiguara</i>	Cafeara-PR
<i>Atta capiguara</i>	Presidente Epitácio-SP
<i>Atta capiguara</i>	Colorado-PR
<i>Atta capiguara</i>	Nova Olímpia-PR
<i>Atta bisphaerica</i>	Lavras-MG
<i>Atta bisphaerica</i>	Botucatu-SP
<i>Atta laevigata</i>	Lavras-MG
<i>Atta laevigata</i>	Jardim-MS
<i>Atta laevigata</i>	Farol-PR
<i>Atta laevigata</i>	Manaus-AM
<i>Atta laevigata</i>	Caracas-Ven.
<i>Atta laevigata</i>	Brasília –DF
<i>Atta laevigata</i>	Brasília –DF
<i>Atta laevigata</i>	Serranópolis - GO
<i>Atta laevigata</i>	Brasília –DF
<i>Atta laevigata</i>	Araguainha - MT
<i>Atta laevigata</i>	Uberaba - MG
<i>Atta vollenweideri</i>	Monte Caceros-Arg.

Ants	Nest location
<i>Atta insularis</i>	Pinar Del Rio - Cuba
<i>Atta texana</i>	Austin – Texas
<i>Atta mexicana</i>	Austin – Texas
<i>Atta colombica</i>	Sonsón - Colômbia
<i>Atta colombica</i>	Gomes Plata- Colombia
<i>Atta saltensis</i>	Buenos Aires - Argentina
<i>Atta cephalotes</i>	Gomes Plata - Colombia
<i>Trachymyrmex septentrionalis</i>	Peniville – Los Angeles – USA
<i>Cyphomyrmex rimosus</i>	AF016021*
<i>Trachymyrmex saussurei</i>	AF016024*
<i>Acromyrmex octospinosus</i>	AF016014*
<i>Acromyrmex volcanus</i>	AF016015*
<i>Atta cephalotes</i>	AF016016*
<i>Tapinoma sp</i>	AF147056*

* Accession numbers of the GenBank.

Table 2. The species currently accepted for the *Atta* genus and their division in subgenera accordingly to different propositions.

Species	Subgenera Propositions					
	Emery (1922)	Gonçalves (1942)	Borgmeier (1950)	Borgmeier (1959)	Gonçalves (1986)	This work
<i>A. sexdens</i>	<i>Neoatta</i>	<i>Neoatta</i>	<i>Neoatta</i>	<i>Neoatta</i>	<i>Neoatta</i>	<i>Neoatta</i>
<i>A. robusta</i>	-	<i>Neoatta</i>	<i>Epiatta</i>	<i>Neoatta</i>	<i>Neoatta</i>	<i>Neoatta</i>
<i>A. bisphaerica</i>	-	<i>Neoatta</i>	<i>Palaeatta</i>	<i>Palaeatta</i>	<i>Neoatta</i>	<i>Epiatta</i>
<i>A. saltensis</i>	-	-	-	<i>Palaeatta</i>	<i>Neoatta</i>	<i>Epiatta</i>
<i>A. goiana</i>	-	<i>Neoatta</i>	<i>Palaeatta</i>	<i>Palaeatta</i>	<i>Neoatta</i>	-
<i>A. capiguara</i>	-	-	<i>Epiatta</i>	<i>Neoatta</i>	<i>Neoatta</i>	<i>Epiatta</i>
<i>A. vollenwiederi</i>	-	<i>Neoatta</i>	<i>Epiatta</i>	<i>Neoatta</i>	<i>Neoatta</i>	<i>Epiatta</i>
<i>A. laevigata</i>	<i>Neoatta</i>	<i>Neoatta</i>	<i>Epiatta</i>	<i>Neoatta</i>	<i>Neoatta</i>	<i>Epiatta</i>
<i>A. opaciceps</i>	-	<i>Neoatta</i>	<i>Epiatta</i>	<i>Neoatta</i>	<i>Neoatta</i>	<i>Epiatta</i>
<i>A. cephalotes</i>	<i>Atta</i>	<i>Atta</i>	<i>Atta</i>	<i>Atta</i>	<i>Atta</i>	<i>Atta</i>
<i>A. colombica</i>	<i>Atta</i>	<i>Atta</i>	<i>Atta</i>	<i>Atta</i>	<i>Atta</i>	<i>Atta</i>
<i>A. mexicana</i>	-	<i>Archeatta</i>	<i>Archeatta</i>	<i>Archeatta</i>	<i>Archeatta</i>	<i>Archeatta</i>
<i>A. insularis</i>	<i>Archeatta</i>	<i>Archeatta</i>	<i>Archeatta</i>	<i>Archeatta</i>	<i>Archeatta</i>	<i>Archeatta</i>
<i>A. texana</i>	-	<i>Archeatta</i>	<i>Archeatta</i>	<i>Archeatta</i>	<i>Archeatta</i>	<i>Archeatta</i>

REFERENCES

- Bolton, B. *A New General Catalogue of the Ants of the World*. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, London, England, 504 pp, 1995.
- Bolton, B. Synopsis and classification of Formicidae. *Mem. Amer. Entomol. Inst.* 71: 1-370, 2003.
- Borgmeier, T. Estudos sobre *Atta* (Hym., Formicidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 48: 239-264, 1950.
- Borgmeier, T. Revision der Gattung *Atta* Fabricius (Hym., Formicidae) *Studia Entomologica.* 2: 321-390, 1959.
- Carpenter, J. M. Choosing among multiple equally parsimonious cladograms. *Cladistics*, v. 4, p. 291-296, 1988.
- Della Lucia, T. M. C. As formigas cortadeiras. Viçosa. *Ed. Folha de Viçosa.* 262 p, 1993.
- Emery, C. Études sur les Myrmicinae: V-VII. *Annales de la Société Entomologique de Belgique.* 57:250-262, 1913.
- Emery, C. Formicidae: Myrmecinae. IN: *Genera Insectorum.* v. 174B, editado por P Wytsman. Brussels: Verteneuil & Desmet. p. 95-206, 1922.
- Farris, J. S. A successive approximations approach to character weighting. *Systemetic Zoology.*, v. 18, p. 374-385, 1969.
- Felsenstein, J. PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics*, 5: 164-166, 1989.
- Gonçalves, C. R. Contribuição para o conhecimento do gênero *Atta* Fabr., das formigas saúvas. *Boletim da Sociedade Brasileira de Agronomia*, v. 5, (3), p. 333-358, 1942.
- Gonçalves, C. R. Descrição de uma nova saúva brasileira. *Revista Brasileira de Biologia*, v. 4 (2), p. 233-2238, 1944.
- Gonçalves, C. R. *Atta silvai*, nova espécie de formiga saúva (Hymenoptera, Formicidae). *Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*, v. 5 (2), p.173-178, 1982.
- Gonçalves, C. R. Filogenia do gênero *Atta* Fabricius (Hymenoptera, Formicidae). *Anais do VI Congresso Brasileiro de Zoologia* In: Publicações Avulsas do Museu Nacional, Rio de Janeiro, 65: 13-17, 1986.
- Gonçalves, C. R. Nota sobre a sistemática de *Atta sexdens* (L, 1758) e de suas sub-espécies (Hym., Formicidae). *Bol. Fitossanitário.* 9: 1-3, 1963.

- Jukes, T. H.; Cantor, C. R. Evolution of protein molecules. In: Munro HN (Editor), *Mammalian Protein Metabolism III*, Academic Press, New York, USA, 1969.
- Swofford, D. L. Phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0b4a (Illinois Natural History Survey, Champaign, 2000.
- Sambrook, J.; Russel, D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, NY, USA, 2001
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weigh matrix choice. *Nuc. Ac. Res.*, v. 22, p. 4673-4680, 1994.
- Weber, N. A.. *Gardening ants, the Attinies*. The American Philosophical Society, Philadelphia, 146 pp, 1972a.

CAPÍTULO VII

Conclusões e Considerações finais

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

As formigas da tribo Attini e seus fungos simbiossantes foram estudados de modo a contribuir para o esclarecimento de alguns aspectos da simbiose, como a transmissão dos fungos, se horizontal ou vertical, o caminho evolutivo e nutricional que estes simbiossantes tomaram e a sistemática do gênero *Atta*.

Um novo meio de cultivo que aumenta a eficiência de isolamento e cultivo de fungos simbiossantes de aténeos foi desenvolvido e aplicado com sucesso para os fungos simbiossantes de aténeos dos gêneros *Atta*, *Acromyrmex*, *Trachymyrmex* e *Mycetarotes*, gerando, assim, um procedimento extremamente útil para a formação e manutenção de uma coleção representativa de diferentes fungos simbiossantes de formigas da tribo Attini.

Utilizando métodos moleculares para estudos sobre a sistemática e a maneira de transmissão dos fungos simbiossantes das formigas cortadeiras, que tem sido foco de muitas discussões, concluímos que há uma semelhança gênica muito grande entre simbiossantes de algumas espécies alopátricas dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, sugerindo uma rápida colonização das Américas pelos fungos simbiossantes, através de transmissões horizontais sucessivas por distintos ninhos de cortadeiras. Esta alta similaridade dos simbiossantes indica também uma recente associação dos fungos com as formigas e propõe a ocorrência de algum mecanismo de homogeneização das linhagens de fungos simbiossantes. Os estudos filogenéticos entre haplotipos sugeriram que existem dois grupos genéticos de fungos, e estes formam duas linhagens distintas. Sendo os fungos cultivados por *Atta laevigata*, *Acromyrmex crassispinus* e *Atta capiguara* mais similares entre si do que eles são para os simbiossantes de cultivados por *Atta sexdens rubropilosa* e *Acromyrmex hispidus fallax*, indicam que a associação dos fungos ocorreu, depois da separação dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, o que deve ter ocorrido através de transmissões horizontais de fungos entre estas formigas.

Foram realizados estudos para caracterização do metabolismo de polissacarídeos pelos fungos simbiossantes de formigas de diversos gêneros da tribo Attini. Postulamos que a simbiose evoluiu com o aumento da capacidade metabólica do fungo, o que fez aumentar a oferta nutricional e conseqüentemente a população de insetos nos ninhos. Assim, fungos cultivados por formigas derivadas, que vivem em colônias com milhares de indivíduos, apresentam maior capacidade de secretar polissacaridases do que outros fungos cultivados por formigas primitivas que vivem em pequenos ninhos.

No estudo morfológico dos gongilídeos, que são estruturas ricas em nutrientes, e estão localizadas nas extremidades das hifas de fungos simbiotes de formigas da tribo Attini, concluímos que os fungos simbiotes de *Atta* e *Acromyrmex*, que são os gêneros mais derivados dentro da tribo Attini, produzem gongilídeos de tamanho maior que os simbiotes de *Trachymyrmex*. Portanto o tamanho dos gongilídeos parece ser um fator importante na evolução destes simbiotes, que passaram a produzi-los de tamanho maior de acordo com a derivação da tribo.

Com realação ao grupo gênico, a qual cada fungo simbionte pertence, observamos uma similaridade muito grande entre as regiões espaçadores ribossomais ITS1 e ITS2 dos simbiotes de *Atta* e *Acromyrmex*, indicando que eles são muito próximos filogeneticamente, como observado com relação ao tamanho dos gongilídeos, que também não separa em um grupo os simbiotes de *Atta* e em outro grupo os simbiotes de *Acromyrmex*. Observamos também que o simbionte de *Trachymyrmex* utilizado em nossos estudos pertence ao grupo cultivado por formigas primitivas e, portanto, além do tamanho dos gongilídeos, a presença destas estruturas neste simbionte se torna muito interessante, uma vez que gongilídeos foram observados, até o momento, somente em fungos simbiotes de formigas derivadas.

Através do estudo da sistemática de formigas do gênero *Atta*, utilizando marcadores moleculares, estimamos as relações filogenéticas entre 12 das 13 espécies atualmente reconhecidas de *Atta*. Em nossos resultados, observamos que o gênero *Atta* é monofilético e apresenta as espécies que hoje vivem no Sul dos Estados Unidos, na América Central e em Cuba (subgênero *Archeatta*) e as espécies que se concentram na Região Equatorial (subgênero *Atta*) como a primeira radiação, da qual descendem todas as demais espécies sul-americanas (subgêneros *Epiatta* e *Neoatta*). Estes resultados apontam para uma única origem do gênero, no Norte, com as demais espécies surgindo à medida que os representantes moviam-se para o Sul, na América do Sul. Nossos resultados sugerem também que a subespécie *A. sexdens piriventris*, que apresentou diferenças genéticas com relação às outras subespécies de *Atta sexdens*, pode ser considerada uma espécie denominada *Atta piriventris*.