
ECOLOGIA

JOANA DANIELA MANTOVANI

**ASSOCIAÇÃO ENTRE *Mesoplasma* sp E
FORMIGAS DA TRIBO ATTINI
(HYMENOPTERA, FORMICIDAE)**



Rio Claro
2010

JOANA DANIELA MANTOVANI

ASSOCIAÇÃO ENTRE *Mesoplasma* sp E FORMIGAS DA TRIBO
ATTINI (HYMENOPTERA, FORMICIDAE)

Orientador: Prof^o. Dr. Maurício B. Júnior

Co-orientadora: Prof^a. Msc. Cynara M. Rodovalho

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Biociências da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro,
para obtenção do grau de Ecóloga.

Rio Claro
2010

574.88 Mantovani, Joana Daniela
M293a Associação entre Mesoplasma sp e formigas da tribo
Attini (Hymenoptera, Formicidae) / Joana Daniela Mantovani.
- Rio Claro : [s.n.], 2010
53 f. : il.

Trabalho de conclusão de curso (Ecologia) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de
Rio Claro

Orientador: Maurício Bacci Júnior

Co-Orientador: Cynara de Melo Rodovalho

1. Biologia molecular. 2. Simbiose. 3. 16S. 4. Mollicutes.
5. Bactérias intracelulares. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

Dedico esse trabalho aos meus orientadores, sem os quais eu não teria sequer aprendido a extrair DNA, nem entendido que um bom cientista não é o que tem os melhores resultados, mas o que faz as melhores perguntas.

“[...] por isso Joana, eu te questiono: qual é a sua pergunta?”

(Maurício Bacci Júnior, orientador e mentor)

“[...] Jô, quer uma bolacha?”

(Cy, co-orientadora e psicóloga, depois de me ouvir chorar por quase meia hora na salinha dos pesquisadores)

AGRADECIMENTOS

Quando você alcança uma meta em sua vida, uma sensação fantástica percorre seu corpo. Acredito que seja equivalente a sensação que se tem quando se aprende a andar, embora eu não me lembre. Parece que algo que era impossível e que não chegava nunca ao fim, termina. É impossível não pensar no clichê “dever cumprido”.

Mas há muita coisa antes dessa sensação maravilhosa. Há muito trabalho duro e suor emanando de cada página impressa da versão final da monografia. Centenas de diálogos trocados, artigos lidos, livros consultados, milhares de *e-mails* enviados, crises de choro, de nervosismo (intensificadas na TPM) que pareciam insuportáveis..., vontade de desistir, algumas dezenas de noites mal dormidas, olheiras estampadas na cara, vários almoços de 5 minutos, algumas rugas de preocupação (meu Deus! Não!), compromissos não cumpridos, tarefas por fazer, duas sessões de acupuntura por mês para superar o desequilíbrio e a estafa...

Tudo isso não teria sido suportado não fossem as pessoas que conheci e redescobri nesse longo, porém compensador caminho entre minha primeira ida ao laboratório e a entrega da versão final da dissertação. Pessoas como minha mãe Vilma e meu pai Daniel, que me legaram sua humildade e inventividade, características essenciais a todo bom cientista (valeu meus velhos!). Meu irmão Jonas, exemplo maior de generosidade, minha irmã Jiane, norteadora de minha vidinha errante. Como a tia Doraci, minha segunda mãe e a Sandra, a pessoa com o humor mais inteligente e sagaz que conheço. Há ainda meus bichinhos, que sempre me recebem com toda euforia quando volto pra casa, uma verdadeira família animal: o Bob, a Charlotte, a Madona, o Kaká, o Rex, a Maia, o Teco e o Crespo (in memoriam). Muito obrigada pelo amor incondicional e fraterno que nutrem por mim e por aguentarem minhas intermináveis crises.

Pessoas como as eternas componentes do G1: Bia, o sarcasmo corre em suas veias e como isso me diverte e me faz bem! Ana, a culpada por esse TCC existir (foi ela que me passou o contato com meu orientador - mais uma vez, obrigada !). Larissa, a primeira pessoa da turma que vi, mas só vi também, pois puxei conversa mesmo foi com seus pais... e Vivi, uma irmã da qual me separaram no berço, mas que a vida deu um jeito de unir novamente. Obrigada por fazer as

coisas mais simples se tornarem inesquecíveis, amiga. Obrigada por me ouvir e me ensinar que desabafar faz muito bem. E como sempre dizemos: “ainda vamos rir muito nos lembrando dos tempos de graduação”...

Gente como a Tice - amiga psicóloga - que me entende e me lê de um jeito que faz todo sentido. Como a Cíntia, uma amiga arretada... Às vezes me pego rindo sozinha de suas histórias. Admiro demais a sua garra, força de vontade e o jeito todo Cíntia de levar a vida, prometo a mim mesma me inspirar nele nos momentos difíceis – e nos fáceis também ! Ainda na parte das amigas psicólogas preciso falar da Cy. Uma das poucas que me viu chorar e dona da frase de consolo mais peculiar que eu já ouvi: “Jô, quer uma bolacha?”. Dona também de um dom de ensinar biologia molecular. Se eu sei alguma coisa dessa matéria, é culpa dela. Outro bom professor de biologia molecular foi o Joaquim. Na verdade ele sabe um pouco de quase tudo, é incrível ! “Jocks, tá aparecendo uma frase estranha no visor da MiliQ”. “Calma Joana, tem que sanificar.” “Jocks, pra diluir solução eu uso água destilada ou MiliQ?” “Em toda solução de biologia molecular se põem MiliQ, dona Joana”. Autoclavada? “Claro !”. Tem ainda o (Prof^o. Dr.) Maurício, que sempre considerei não só meu orientador, mas um verdadeiro mentor intelectual. Se eu aprendi um pouco do “fazer ciência”, foi ele que me mostrou o caminho. Insistentemente ele me fez ver que ser cientista não é meramente achar respostas pra tudo, mas saber fazer as perguntas certas. Muito obrigada ! E tem o pessoal do CEIS também. Impossível não lembrar do jeito Paula de levar a vida “laboratorial”, todo divertido – obrigada por me fazer rir tanto. Do jeito André, sagaz e sarcástico (mas um sarcasmo do bem), do jeito Milene, acelerado e altruísta, do jeito Tássio, engraçado e astuto. Do jeito Shao, simpático e atencioso e do jeito Miagui, disciplinado e sábio.

Pessoas como a Necis e a Lu, sempre dispostas a me ajudar no que fosse preciso. Como os vigias da UNESP, que tantas vezes foram me buscar no CEIS, quando eu passava tempo demais por lá e ficava trancada. Como o pessoal da biblioteca que me mostrou o caminho duro da pesquisa referenciada e o tornou mais fácil de trilhar. Obrigada!

Pessoas como aquelas da XXXII turma de Ecologia: Braqui, Helps, Pakito, Bixano, Guandu, Xena, Terts, Capote, Tereza, Demorô, Zeca, Pantoja, Dudu, Massa, Pê, e os desertores Tofu e Hobit, que fizeram minha graduação ser mais feliz. Como eu ri com esse povo... Depois de tantos campos, festinhas e gargalhadas, descobri em vocês grandes amigos, os quais levarei sempre em minha

memória. Ah e não posso me esquecer dos demais ecólogos... a Flávia, minha companheira de discussões filosóficas e não filosóficas . A Léia, a Roots, a Goiaba e o Sandália... Grandes amigos dos tempos de Sambaqui...

Amigas como a Camila que sempre me fez pensar além, com suas intrigantes conversas na cozinha... ou como as meninas da nossa pensão que era uma república (ou seria da nossa república que era uma pensão?): Raquel, Larissa e Pri, a companhia de vocês, queridas, fez minha estada por lá bem mais animada e aconchegante, obrigada família!!!

Por fim agradeço ao CNPq, pela bolsa de estudos concedida, a Unesp por ceder suas dependências para realização desse trabalho e a todos os professores por me instigarem a busca pelo conhecimento durante todos esses anos.

A Formiga

Vinicius de Moraes

Composição: Vinicius de Moraes / Paulo Soledade

As coisas devem ser bem grandes

Pra formiga pequenina

A rosa, um lindo palácio

E o espinho, uma espada fina

A gota d'água, um manso lago

O pingo de chuva, um mar

Onde um pauzinho boiando

É navio a navegar

O bico de pão, o corcovado

O grilo, um rinoceronte

Uns grãos de sal derramados,

Ovelhinhas pelo monte

RESUMO

As formigas da tribo Attini apresentam reconhecida simbiose com microrganismos: fungos mutualistas basidiomicetos nas famílias Lepiotaceae e Pterulaceae cultivados pelas formigas, bactérias actinomicetas ou no gênero *Burkholderia* produtoras de antibióticos contra fungos entomopatogênicos, fungos ascomicetos do gênero *Escovopsis* micófagos para o mutualista, e comensais como fungos, leveduras e bactérias que degradam celulose. Um novo mutualista é descrito no presente trabalho: uma espécie de bactéria no gênero *Mesoplasma*, detectada via PCR para 16S no DNA genômico de Attini derivadas (gêneros *Acromyrmex*, *Atta*, *Serycomyrmex* e *Cyphomyrmex*), intermediárias (*Trachymyrmex*) e basais (*Apterostigma*, *Mycetarotes*, *Mycocepurus* e *Mycetagroicos*). Uma única linhagem de *Mesoplasma* com baixíssima diversidade 16S esteve presente nas Attini, mas não em formigas de tribos filogeneticamente próximas a Attini, como Dolichoderini (*Tapinoma* sp), Camponotini (*Camponotus* sp), Cephalotini (*Cephalotes* sp), Crematogastrini (*Crematogaster* sp), Pheidolini (*Pheidole* sp) e Ponerini (*Pachycondyla* sp), indicando uma simbiose *Mesoplasma*-Attini recente e específica.

Palavras-chaves: simbiose, Attini, 16S, Mollicutes, bactérias intracelulares

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1 A tribo Attini	13
3.2 Formigas Attini e seus simbiontes	13
3.3 Bactérias e a tribo Attini	14
3.4 A classe de bactérias mollicutes	14
3.4.1 A dificuldade do cultivo <i>in vitro</i> de Mollicutes	15
3.4.2 Comparação entre Mollicutes e outras eubactérias	16
3.4.3 Composição genômica dos Mollicutes	16
3.5. Outros grupos de formigas	17
3.6 Outros casos de simbiose entre formigas e microrganismos	17
3.7 As ferramentas moleculares no estudo de microrganismos	18
3.7.1 Os ácidos desoxirribonucléicos e ribonucléicos	18
3.7.2 Amplificação de regiões do DNA e RNA	18
3.7.3 A técnica de PCR	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1. Material biológico	20
4.2 Coleta do material biológico	20
4.3. Extração de DNA utilizando TNES	21
4.4. Desenho de primers	21
4.5. Amplificação de seqüências nucleotídicas de regiões 16S de bactérias	21
4.6. Purificação dos produtos de PCR	22
4.7. Clonagem	22
4.8. Mini prep	23
4.9. Sequenciamento	23
4.10. Análise de seqüências	23
4.11. Análise de haplótipos	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1 Mapa de localização dos pontos de coleta das formigas attíneas	25
5.2 Desenho de primers	25
5.3 Extração de DNA	27
5.4 Amplificação de seqüências nucleotídicas de regiões 16S de bactérias e	28
5.5. Clonagem dos fragmentos	29
5.6 Sequenciamento das amostras	30
5.7 Análise dos haplótipos das formigas attíneas.	33
5.8 Interações específicas	37
5.9 Análise de <i>pairwise</i>	37
6. CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS	40
GLOSSÁRIO	47
APÊNDICES	49
APÊNDICE A	50
APÊNDICE B	51
APÊNDICE C	51
APÊNDICE D	52
APÊNDICE E	52
APÊNDICE F	52
APÊNDICE G	53

1. INTRODUÇÃO

Entender as relações entre diferentes organismos de um ecossistema é sem sombra de dúvidas uma tarefa complexa e trabalhosa. Para este entendimento, uma clara identificação filogenética de pares simbiotes é essencial para adicionar detalhes sobre interações, transmissões e coevolução entre tais organismos (CLARK et al., 2000).

A caracterização da diversidade microbiana em vários ambientes, tais como comunidades de plânctons, instalações de esgoto, fontes geotérmicas e, conseqüentemente, de associações simbióticas, entre estes organismos (HERRE, 1999), foi extremamente facilitada pela utilização de sequências da subunidade menor (16S) do RNA ribossômico com uma gama de hospedeiros (BORM; BILLEN; BOOMSMA, 2002). Além disso, as ferramentas moleculares são também importantes para identificar complexas e até então inesperadas associações com parasitas ou mutualistas (BORM; BILLEN; BOOMSMA, 2002).

As formigas cortadeiras (Hymenoptera, Formicidae, tribo Attini) estão envolvidas numa antiga e obrigatória relação mutualista com fungos basidiomicetos que são por elas cultivados como fonte de alimento (MUELLER; RABELING, 2008). Ademais, bactérias filamentosas do gênero *Pseudonocardia* também se associam com formigas Attini (CURRIE; MUELLER; MALLOCH, 1999) às quais fornecem antibióticos capazes de suprimir o crescimento do fungo parasita micofágico do gênero *Escovopsis* que infecta jardins de diversas espécies destas formigas (CURRIE *et al.*, 1999). Há ainda uma relação existente entre formigas da espécie *Atta laevigata* e bactérias do gênero *Mesoplasma* (KIEVITSBOSH *et al.*, 2007). Este gênero é formado por parasitas intracelulares de insetos e pertence ao grupo dos Mollicutes, que são bactérias que se caracterizam por não apresentarem parede celular, sendo altamente dependente de seu hospedeiro pra sobreviver (THACHTENBERG, 2005). Além de parasitarem insetos os Mollicutes o fazem também com plantas, para as quais causam patologias diversas. Geralmente os Mollicutes fitopatógenos são vetorizados para as plantas por insetos, para os quais não causam doenças, o que se pensa ser fruto de uma longa co-evolução entre essas bactérias e os insetos (NAULT et al, 1980).

No presente trabalho será analisada a possível associação de bactérias pertencentes ao grupo dos *Mollicutes* com formigas da tribo Attini pertencentes aos gêneros *Acromyrmex*, *Atta*, *Serycomyrmex*, *Cyphomyrmex*, *Trachymyrmex*, *Apterostigma*, *Mycetarotes*, *Mycocephurus*, e *Mycetagroicos*. Além disso, outros gêneros filogeneticamente próximos a tribo Attini como *Camponotus*, *Crematogaster*, *Pachycondyla*, *Tapinoma*, *Wasmannia*, *Pheidole* *Cephalotes*, serão investigados para confirmação de tal associação.

A hipótese inicial do trabalho é estabelecer se há associação entre bactérias do gênero *Mesoplasma* sp e formigas attíneas e como hipótese secundária propõem-se que essa associação seja exclusiva.

2. OBJETIVOS

- Amplificar e determinar a sequência 16S de espécimes de *Mesoplasma* sp associados a formigas Attini.
- Aplicar métodos analíticos para a inferência das relações filogenéticas entre os espécimes bacterianos identificados.
- Comparar a filogenia das bactérias com a já descrita filogenia das formigas para inferir sobre a simbiose entre Attini e *Mesoplasma* sp.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A tribo Attini

As formigas attíneas estão situadas dentro do Reino Animal, Filo Arthropoda, pertencem à Classe Insecta, Ordem Hymenoptera e Família Formicidae, Subfamília Myrmicinae, Tribo Attini. Elas são divididas nos gêneros *Acromyrmex*, *Atta*, *Apterostigma*, *Cyphomyrmex*, *Mycocepurus*, *Myrmecocrypta*, *Pseudoatta*, *Sericomyrmex*, *Trachymyrmex*, *Mycetarotes*, *Mycetasoritis*, *Mycetophylax* e *Mycetagroicus* (TREE OF LIFE WEB PROJECT, 2004). Todas essas formigas são exclusivamente pertencentes ao Novo Mundo (da Argentina ao sul dos Estados Unidos), sendo que sua maior diversidade se dá nas florestas equatoriais da América do Sul, região de sua provável origem evolutiva (MUELLER et al., 2001).

3.2 Formigas Attini e seus simbioses

As formigas attini são obrigatoriamente agricultoras. Seus cultivares de fungos são a única fonte de alimento para suas larvas e uma fonte de tal forma importante para os adultos, que mesmo se esses não suplementarem sua dieta com seiva de plantas (BASS; CHERRETT, 1995; MURAKAMI; HIGASHI, 1997) os jardins de fungos são capazes de fornecer todos os nutrientes necessários (MUELLER; GERARDO, 2002). Os fungos são transmitidos verticalmente através das gerações pelas rainhas jovens que os transportam em pequenos *pellets* dentro de suas cavidades infrabucais (FERNÁNDEZ-MARÍN; ZIMMERMAN; WCISLO, 2004).

Diferentes linhagens de attíneas cultivam seus fungos em diferentes substratos, entretanto todos os ninhos dessas formigas apresentarão, pelo menos, quatro simbioses: os fungos que crescem no formigueiro, os fungos cultivados (basidiomicetos das famílias Lepiotaceae e Pterulaceae (MUELLER; REHNER; SCHULTZ, 1998; MUNKACSI et al., 2004), as bactérias actinomicetas produtoras de antibióticos contra fungos patogênicos (CURRIE et al. 1999) e os parasitas de jardins de fungos ascomicetos do gênero *Escovopsis* (CURRIE; MUELLER; MALLOCH, 1999).

3.3 Bactérias e a tribo Attini

Além da associação de bactérias actinomicetas, produtoras de antibióticos (CURRIE; MUELLER; MALLOCH, 1999), ainda é possível encontrar outros tipos de microrganismos em simbiose com as formigas atíneas, tais como bactérias do gênero *Burkholderia*, (SANTOS et al., 2004), leveduras (CARREIRO et al. 1997), bactérias que degradam celulose (BACCI et al., 1995) e mais recentemente bactérias do gênero *Mesoplasma*, classe dos Mollicutes (MANTOVANI et al., 2009).

3.4 A classe de bactérias mollicutes

A primeira evidência relatada de bactérias da classe dos Mollicutes (do latim, *molis*, macio; *cútis*, pele) presentes na flora microbiana de insetos e outro artrópodes ocorreu em 1967, quando se notou a presença desses organismos como agentes de infecções em plantas (DOI, 1967 apud TULLY, 1989). Essa classe de microrganismos mostrou-se como o estágio final na evolução das bactérias Gram-positivas. Enquanto os termos “micoplasma” e “mollicutes” têm sido genericamente usados para designar os organismos desse grupo, nomes como ureaplasmas, entomoplasmas, mesoplasmas, spiroplasmas, acholeplasmas, asteroleplasmas e anaeroplasmas são rotineiramente usados para se referir aos gêneros dessas bactérias (RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998). A Tabela 1 mostra a classificação taxonômica desses organismos.

Essas bactérias têm habitats generalizados na natureza, parasitando mamíferos, répteis, peixes, artrópodos e plantas (MANILOFF et al., 1992). A localização intracelular dos mollicutes em tecidos de insetos é bem estabelecida (TULLY et al., 1994; GASPARICH, et al., 2004). Sua morfologia celular é das mais variadas, apresentando células em formato de pêra, células em forma de balão com estruturas terminais pontiagudas, células filamentosas e helicoidais (RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998).

O modo de divisão celular que apresentam é essencialmente o mesmo dos outros procariotos, a fissão binária (RAZIN, 1978), porém o mecanismo de separação cromossomal ainda não foi examinado em nenhuma espécie de mollicute, o que deixa a compreensão dos fatores que coordenam sua divisão celular ainda bem distante de nosso conhecimento (RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998).

TABELA 1. Taxonomia e características da classe *Mollicutes*

Classificação	Número de espécies reconhecidas	Tamanho do genoma (kb)	Habitat
Ordem I			
<i>Mycoplasmatales</i>			
Família I			
<i>Mycoplasmataceae</i>			
Gênero I <i>Mycoplasma</i>	102	580–1.350	Humanos, animais
Gênero II <i>Ureaplasma</i>	6	760–1.170	
Ordem II			
<i>Entomoplasmatales</i>			
Família I			
<i>Entomoplasmataceae</i>			
Gênero I <i>Entomoplasma</i>	5	790–1.140	Insetos, plantas
Gênero II <i>Mesoplasma</i>	12	870–1.100	Insetos, plantas
Família II			
<i>Spiroplasmataceae</i>			
Gênero I <i>Spiroplasma</i>	33	780–2.220	Insetos, plantas
Ordem III			
<i>Acholeplasmatales</i>			
Família I			
<i>Acholeplasmataceae</i>			
Gênero <i>Acholeplasma</i>	13	1.500–1.650	Animais, algumas plantas, insetos
Ordem IV			
<i>Anaeroplasmatales</i>			
Família			
<i>Anaeroplasmataceae</i>			
Gênero I <i>Anaeroplasma</i>	4	1.500–1.600	Rúmen bovino/ovino
Gênero II <i>Asteroleplasma</i>	1	1.500	Rúmen bovino/ovino
<i>Status</i> taxonômico não definido		640–1.185	Insetos, plantas
Phytoplasma			

Fonte adaptada: RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y., 1998, (tradução nossa).

3.4.1 A dificuldade do cultivo *in vitro* de *Mollicutes*

Um dos maiores entraves no estudo de bactérias da classe *Mollicutes* é a dificuldade de seu cultivo *in vitro*. Parece consenso que apenas uma minoria das

espécies desses organismos que habitam a natureza tem efetivamente sido cultivada até agora. Exemplo disso são os fitoplasmas, causadores de mais de 1000 doenças em plantas (KONČAR, 2010), que ainda não foram realmente cultivados em laboratório (KIRKPATRICK; SMART, 1995). Dessa forma, as portas ficam abertas para a aplicação de técnicas moleculares, como a reação da polimerase em cadeia (PCR) no estudo dessas bactérias.

3.4.2 Comparação entre Mollicutes e outras eubactérias

A Tabela 2 mostra uma comparação entre bactérias da classe dos Mollicutes e as demais eubactérias:

TABELA 2. Comparação entre Mollicutes e outras eubactérias

Característica	Mollicutes	Outras eubactérias
Parede celular	Ausente	Presente
Membrana plasmática	Colesterol presente em muitas espécies	Colesterol ausente
Tamanho do genoma	580-2.220 kb	1.050 - > 10.000 kb
Conteúdo de G + C do genoma	23 – 40 mol %	25 – 75 mol %
Códon UGA usado	Triptofano em <i>Mesoplasma</i> , <i>Ureaplasma</i> , <i>Spiroplasma</i> ,	Stop codon

Fonte adaptada: RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998, (tradução nossa).

3.4.3 Composição genômica dos Mollicutes

O tamanho do genoma em mollicutes é um diferencial dessas bactérias. Ele vai de menos de 600 até 2.200 kb (CARLE et al., 1995), como foi mostrado na Tabela 2. Porém essa informação não pode ser tomada como critério definitivo para distinguir *taxas* em Mollicutes (RAZIN, 1991). Apesar disso, espécies de *Acholeplasma* e *Spiroplasma*, considerados filogeneticamente como os primeiros mollicutes, têm genomas maiores do que espécies de *Mycoplasma* e *Ureaplasma*, considerados filogeneticamente como os mais recentes mollicutes (MANILOFF, 1992), isso está de acordo com a noção de que essas bactérias estão envolvidas numa evolução degenerativa, na qual há perdas significantes de sequências genômicas (WOESE, 1987).

3.5. Outros grupos de formigas

As formigas da subfamília Formicinae tem como característica soltarem ácido fórmico para se defenderem de possíveis predadores (CAETANO; JAFFÉ; ZARA, 2002). São predominantes das regiões neoártica e paleártica (WILSON; HÖLLDOBLER, 2005), sendo que na região neotropical estão representadas por cerca de 400 espécies. O gênero *Camponotus* é encontrado nos mais diversos habitats (HÖLLDOBLER; WILSON, 1995).

A subfamília Ponerinae, comportamental e morfológicamente falando, é a mais primitiva da região neotropical (WHEELER, 1900). São exímias predadoras, possuindo um ferrão funcional, com o qual dominam suas presas. Os ninhos dessas formigas podem ser bem simples e ficar em locais inusitados, como no caso da espécie *Pachycondyla villosa*, que nidifica no interior da bromélia *Aechmea bromeliifolia* (CAETANO; JAFFÉ; ZARA, 2002).

Dentro de *Myrmicinae* (subfamília mais numerosa em espécies), o gênero *Crematogaster* apresenta muitas espécies tropicais com características arborícolas e algumas que irradiaram para zonas temperadas fazendo ninhos no solo e debaixo de pedras (WHEELER, 1906).

A subfamília Dolichoderinae apresenta formigas dominantes de vários ecossistemas. Possui vários gêneros arborícolas e outros com ninho no solo. Apresentam morfologia semelhante à de Formicinae, entretanto com história filogenética diferente (CAETANO; JAFFÉ; ZARA, 2002)

3.6 Outros casos de simbiose entre formigas e microrganismos.

Bactérias endossimbiontes foram primeiro relatadas em várias espécies de formigas do gênero *Camponotus* por Blochmann em 1887. Elas se localizam em bacteriocistos (células especializadas presentes tanto em operárias quanto em rainhas) que ficam intercalados entre células epiteliais do intestino médio dessas formigas (SCHRÖDER et al., 1996).

A tribo Cephalotini mantém bactérias em seu trato digestivo, tais como *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Sphingobacterium*, *Ochrobactrum*, *Myroides*, *Brevundimonas*, *Alcaligenes*, *Stenotrophomonas*, *Moraxella*, e *Pseudomonas*, que

são responsáveis pela ajuda na síntese de aminoácidos de carboidratos e nitratos (JAFFE et al., 2001).

3.7 As ferramentas moleculares no estudo de microrganismos

3.7.1 Os ácidos desoxirribonucléicos e ribonucléicos

O DNA e o RNA são polímeros de nucleotídeos formados por um açúcar e cinco carbonos (desoxirribose no DNA e ribose no RNA), uma base nitrogenada (que pode ser adenina, timina, citosina, guanina ou uracila) e uma molécula de fosfato. O DNA contém a informação genética de células procariontes, eucariontes e dos adenovírus. O RNA está envolvido na síntese de proteínas e constitui o material genético dos retrovírus (MADIGAN et al., 2000).

A expressão dos genes é a base do metabolismo celular. Ela acontece quando o DNA é transcrito em RNA, que por sua vez se traduz em proteínas. Esta sequência DNA-RNA-proteínas é o dogma central da biologia molecular. Existem três tipos de RNA:

- O RNA mensageiro (mRNA), que é sintetizado durante a transcrição por meio da RNA polimerase. Sua conformação apresenta códon que codificam aminoácidos específicos.
- O RNA de transferência (tRNA), que em uma extremidade apresenta um aminoácido e na outra um anticódon que se une ao códon do mRNA.
- O RNA ribossomal (rRNA), constituindo a maior parte do RNA das células, esse ácido facilita o acoplamento específico entre o mRNA e os tRNA para que haja tradução. Os ribossomos são compostos por três subunidades de rRNA de diferentes tamanhos nos eucariotos (23S, 18S e 5S) e procariotos (23S, 16S e 5S) (FALCON; VALERA, 2007).

3.7.2 Amplificação de regiões do DNA e RNA

Estudos contemporâneos de ecologia molecular têm buscado entender as funções metabólicas dos diferentes componentes biológicos presentes no ambiente e conhecer a diversidade biológica por meio de técnicas moleculares baseadas na amplificação de diversas regiões do DNA e RNA dos organismos. Isso torna possível

o entendimento dos diferentes componentes físico-químico-biológicos ambientais expressos pelo DNA, da regulação metabólica das enzimas essenciais no papel ecológico dos organismos dentro de seu ecossistema (ciclos biogeoquímicos, biorremediação, reciclagem de nutrientes, etc) (FALCON; VALERA, 2007) e por fim o estudo de espécies até então não cultiváveis em laboratório (HUGENHOLTZ; TYSON, 2008)

3.7.3 A técnica de PCR

A ideia básica da reação da polimerase em cadeia (PCR em inglês) é sintetizar muitas vezes um pedaço ou fragmento de DNA utilizando uma polimerase capaz de trabalhar a temperaturas muito elevadas, proveniente da bactéria *Thermus aquaticus*, habitante de locais com altas temperaturas (79 °C a 85 ° C). A reação de PCR simula o mecanismo de síntese de DNA de uma célula. No tubo mesclam-se todos os ingredientes necessários para que isso ocorra: polimerase, DNA do organismo a ser estudado (onde há o fragmento a ser amplificado), oligonucleotídeos (*primers*, iniciadores, oligos, etc) para que se inicie a transcrição, dinucleotídeos (dNTPs) e as condições necessárias para o trabalho adequado da enzima (pH correto, quantidades suficientes de magnésio e outras conforme a polimerase utilizada). Essa técnica permite as mais variadas aplicações, desde genética probabilística, passando por evolução molecular e genômica até medicina forense (ASUAR, 2007).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material biológico

Foi analisado um indivíduo em cada um dos seguintes gêneros de formigas: *Acromyrmex*, *Atta*, *Serycomyrmex*, *Cyphomyrmex* (derivados), *Trachymyrmex* (intermediário), *Apterostigma*, *Mycetarotes*, *Mycocepurus*, e *Mycetagroicus* (basais) (MUELLER; REHNER; SCHULTZ, 1998; SCHULTZ; BRADY, 2008) além de um indivíduo de cada um dos gêneros *Camponotus*, *Crematogaster*, *Pachycondyla*, *Tapinoma*, *Pheidole* e indivíduos das espécies *Cephalotes clypeatus* e *C. pusillus*.

4.2 Coleta do material biológico

As formigas attíneas utilizadas encontravam-se alocadas no freezer – 20 °C do Laboratório de Evolução Molecular do Centro de Estudos de Insetos Sociais – Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro e seus locais de coleta são mostrados na Tabela 3.

TABELA 3. Relação do material biológico utilizado com respectivos códigos de armazenagem, gênero e localização geográfica da coleta.

Código de identificação	Gênero da formiga	Local da coleta	Coordenada geográfica
AOMB040904-02	<i>Acromyrmex</i>	Registro - SP	S24°28'48" O47°50'40"
E529	<i>Apterostigma</i>	Rio de Janeiro - RJ	S22°53'60" O43°12'32"
E530	<i>Cyphomyrmex</i>	Rio Claro - SP	S22°24'24" O47°33'44"
GV150805-32	<i>Mycetarotes</i>	Cabrália Paulista - SP	S22°27'04" O49°20'32"
JM061011-05	<i>Mycocepurus</i>	Júlio de Castilho - RS	S29°13'20" O53°41'04"
SES040125-04	<i>Sericomyrmex</i>	Alcobaça - BA	S17°30'40" O39°12'00"
SES040207-08	<i>Trachymyrmex</i>	Ferreira Gomes - AP	N00°51'52" O51°10'48"
sem código	<i>Mycetagroicus</i>	Uberlândia - MG	S18°54'48" O48°16'32"

As formigas não attíneas foram coletadas no próprio *campus* da Universidade Estadual Paulista – Rio Claro.

4.3. Extração de DNA utilizando TNES

As formigas foram trituradas utilizando-se 50 µL de solução TNES (250 mM Tris pH 7,5, 2 M NaCl, 100 mM EDTA, 2.5% SDS) em tubos de 1,5 mL. Após trituração adicionou-se mais 500 µL de TNES. Agitou-se então em vortex e após isso foram adicionados 5 µL de *proteinase K* (20 mg/mL). O material foi incubado em banho térmico de 55°C pelo período de 3 horas. Após isso foram adicionados 3 µL de *RNAse A* (4 mg/mL) e procedeu-se com incubação a 37 °C por 30 minutos. Foram adicionados 200 µL de solução de precipitação de proteína (NaCl 5 M) e após agitação em vortex os materiais foram centrifugados por 6 minutos a 15.000 G. Os sobrenadantes formados foram então transferidos para tubos novos. Adicionou-se 600 µL de isopropanol a concentração de 100 %, agitando suavemente. Procedeu-se então com centrifugação por 5 minutos a 15.000 G. Descartou-se o sobrenadante. Após adição de 600 µL de etanol 70 % o material foi centrifugado a 15.000 G por 6 minutos. As amostras foram então centrifugadas à vácuo por 10 minutos e hidratadas com 30 µL de TE (10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA pH 8)

A confirmação da extração foi feita em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídio.

4.4. Desenho de primers

A fim de detectar-se a presença de *Mesoplasma* nas amostras de DNA dos gêneros das formigas já citados, procedeu-se ao desenho de primers específicos (Molli F e Molli R) a partir de seqüências de bactérias Mollicutes e de outros grupos, com intuito de que só as primeiras fossem amplificadas, garantindo a especificidade do produto. Para tanto as seqüências bacterianas de genes 16S foram recuperadas do GenBank (BENSON et al., 2000) e alinhadas utilizando-se o programa BioEdit 7.0.5 (HALL, 1999). A qualidade dos *primers* foi testada pelo programa GeneRunner 1.00 (SPRUYT; BUQUICCHIO, 1996).

4.5. Amplificação de seqüências nucleotídicas de regiões 16S de bactérias

Para reação de amplificação (PCR) de regiões 16S do rDNA de bactérias foi utilizado o *kit* PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare n. catalog. 27-

9557-01) ou Taq DNA Polimerase (Cenbiot). Respectivamente, a montagem das reações partiu de 100-200 ng de DNA e 10 pmol de cada *primer* Molli F e Molli R (Tabela 4) num volume final de 25 µL para as formigas não attíneas ou a partir de 100-200 ng de DNA, 10 pmol de cada *primer* (Molli F e Molli R), 2 mM MgCl₂, 200 µM de dNTP e 1U Taq, em volume final de 30 µL, para as formigas attíneas.

TABELA 4. Sequência dos *primers* utilizados.

<i>Primers</i>	Seqüência 5'-3'	Tamanho amplicon
MolliF	TGGCGAACGGGTGAGTAACACGTATCT	500 pb
MolliR	ATGTATTACCGCGGCTGCTGGCACAT	

As amplificações iniciaram-se com um passo de desnaturação a 95 °C, por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95 °C, por 1 minuto, anelamento a 55 °C, por 1 minuto e extensão a 72 °C por 3 minutos.

Os resultados das amplificações foram visualizados em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídio.

4.6. Purificação dos produtos de PCR

Para purificação foi utilizado GFX PCR DNA and Gel Band Purification *Kit* (GE Healthcare), seguindo-se as recomendações do fabricante.

4.7. Clonagem

Após amplificação e purificação dos produtos de PCR, realizamos a clonagem, utilizando-se o Clone JET PCR Cloning *Kit*, (Fermentas). O protocolo de clonagem “Sticky-End” também foi utilizado, conforme recomendações do fabricante. Foram utilizados 25 ng do produto de PCR purificado, de acordo com a razão molar 3 inserto: 1 vetor.

Após ligação, foi realizada transformação de *Escherichia coli* DH10B adicionando-se 10 µL da ligação a 100 µL de célula competente. Após 20 minutos no gelo foi dado choque térmico a 42 °C por 1 minuto. As amostras foram então

resfriadas em gelo por 2 minutos. Foram adicionados 300 μL de meio CG sem antibiótico e as amostras incubadas a 37 °C por 15 minutos, semeando-se 200 μL em meio CG ágar com ampicilina (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). As placas permaneceram em estufa a 37 °C, por 16 horas.

No final do próximo dia, foram selecionados 10 clones para “*single colony prep*”, ou seja, confirmação de quais clones receberam o inserto. Um pouco de material (bactérias) foi coletado com palito de ponta e colocado em microtubos de 1,5 μL . Foram adicionados 80 μL de “single colony buffer” (1% de SDS, 5 % de glicerol, 0,01 % de bromophenol blue, RNase 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). As células foram dissolvidas no *vórtex* e centrifugadas por 10 min, 12000 rpm. Foram carregados 20 μL por canaleta do gel e a migração comparada com o vetor intacto (PUC 18) em gel de agarose 0,7 % (90 V por 1 h e 20 min), corado com brometo de etídio.

4.8. Mini prep

Feita de acordo com Zhou, Yang e Jong (1990) e confirmada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

4.9. Sequenciamento

Utilizou-se DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing *Kit* (GE Healthcare), seguindo recomendações do fabricante. Os produtos da reação de sequenciamento foram purificados e aplicados em sequenciador automático ABI 377 (Applied Biosystems).

4.10. Análise de sequências

As sequências foram editadas com o programa BioEdit 7.0.5 (HALL, 1999) e comparadas com sequências depositadas no banco de dados GenBank (BENSON et al., 2000) utilizando-se a ferramenta BLAST (CAMACHO, 2009).

4.11. Análise de haplótipos

As sequências obtidas foram analisadas utilizando-se o programa *Network* 4.5.1.6 (FLUXUS TECHNOLOGY LTDA, 2009) utilizando o algoritmo *Median Joining* e os parâmetros $r = 2$ e $\epsilon = 0$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Mapa de localização dos pontos de coleta das formigas attíneas



Figura 1. Localização dos pontos de coleta dos representantes dos oito gêneros de Attini analisados nesse trabalho.

Nesse mapa é possível ter uma ideia da distribuição geográfica abrangida nesse estudo. Os diferentes representantes dos gêneros attíneos foram coletados nas regiões Sul (*Mycocepurus*), Sudeste (*Acromyrmex*, *Apterostigma*, *Cyphomyrmex*, *Mycetarotes* e *Mycetagroicus*), Norte (*Trachymyrmex*) e Nordeste (*Sericomyrmex*) do país.

5.2 Desenho de primers

Para o desenho dos *primers* específicos para região 16S do DNA de bactérias *Mesoplasma* sp. foram utilizadas 23 sequências recuperadas do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (BENSON et al., 2000) e uma sequência obtida

anteriormente em nosso laboratório (KIEVITSBOSCH, 2008) cujas informações são mostradas na Tabela 5.

TABELA 5. Códigos de acesso e números de pares de base das sequências utilizadas para o desenho dos *primers* Molli F e Molli R

Sequência	Código de acesso	Número de pares de base (pb)	Organismo
1	AB272358.1	1272	<i>Escherichia coli</i>
2	AM421982.1	1498	<i>Pseudomonas</i> sp
3	EU794727.1	1460	<i>Bacillus cereus</i>
4	AY999900.1	1340	<i>Streptomyces aculeolatus</i>
5	AY538169.1	1431	<i>Acholeplasma multilocale</i>
6	AY168929.2	1485	<i>Mesoplasma corruscae</i>
7	AY189130.1	1516	<i>Spiroplasma diminutum</i>
8	AY231458.1	1496	<i>M. syrphidae</i>
9	AY345990.1	1494	<i>Entomoplasma melaleucae</i>
10	DQ861915.1	2276	<i>S. cantharicola</i>
11	AY189316.1	1516	<i>Spiroplasma</i> sp.
12	M24292.1	1475	<i>E. ellychniae</i>
13	AY189125.1	1516	<i>S. alleghenense</i>
14	AY166704.1	1500	<i>M. chauliocola</i>
15	AY189128.1	1516	<i>S. corruscae</i>
16	DQ514605.1	2205	<i>M. coleopterae</i>
17	DQ514606.1	2205	<i>M. coleopterae</i>
18	AY174170.1	1489	<i>M. grammopterae</i>
19	AY187288.1	1506	<i>M. tabanidae</i>
20	AY189306.1	1516	<i>S. litorale</i>
21	DQ514607.1	1572	<i>E. melaleucae</i>
22	AY189134.1	1515	<i>S. lampyridicola</i>
23	DQ163951.1	1484	Uncultured bacterium clone
24	-	507	<i>M. lactucae</i>

Foi realizado um alinhamento múltiplo das sequências já citadas, por meio do aplicativo Clustal (HIGGINS et al., 1992), a fim de se definir a região ideal para geração dos *primers* Molli F e Molli R. Na Figura 2 é mostrado o alinhamento das sequências já citadas, a região escolhida para os *primers* e os *primers* desenhados para amplificarem um fragmento em torno de 500 pb do DNA ribossomal 16S de *Mesoplasma* sp.

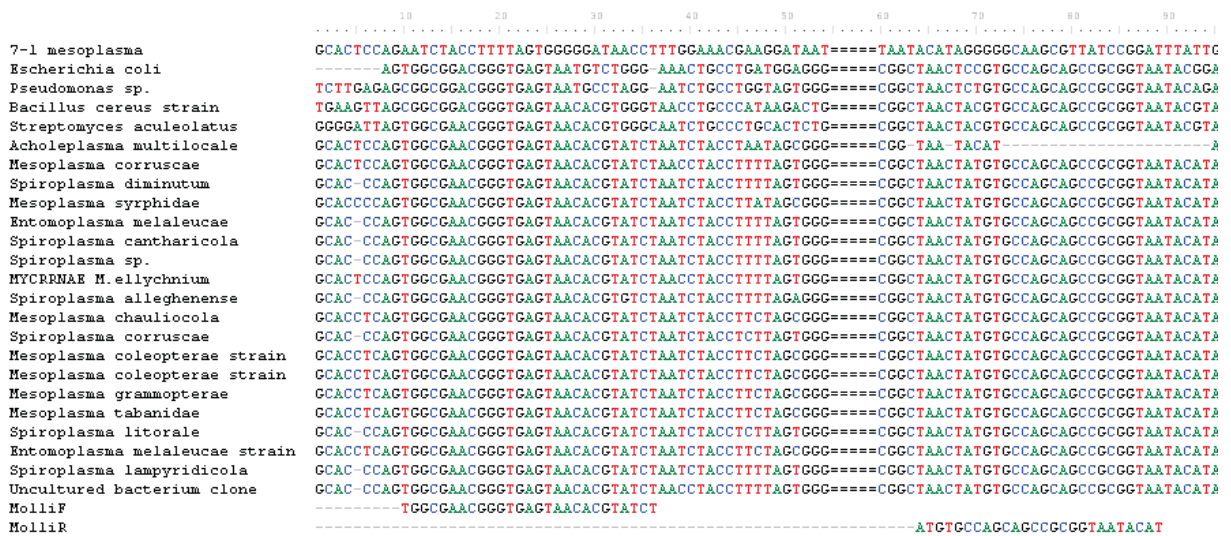


FIGURA 2. Alinhamento das seqüências de bactérias obtidas a partir do GenBank para desenho dos *primers* específicos para *Mesoplasma* sp (Molli F e Molli R). O sinal “=” significa que essa parte da seqüência foi suprimida para que fosse possível evidenciar as regiões utilizadas nos *primers*.

5.3 Extração de DNA

Foram realizadas extrações de DNA para os oito indivíduos dos gêneros da tribo Attini e para os demais gêneros de não Attini em questão. As extrações foram confirmadas em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídio (SAMBROOK; RUSSEL, 2001), como é mostrado nas Figuras 3 e 4.

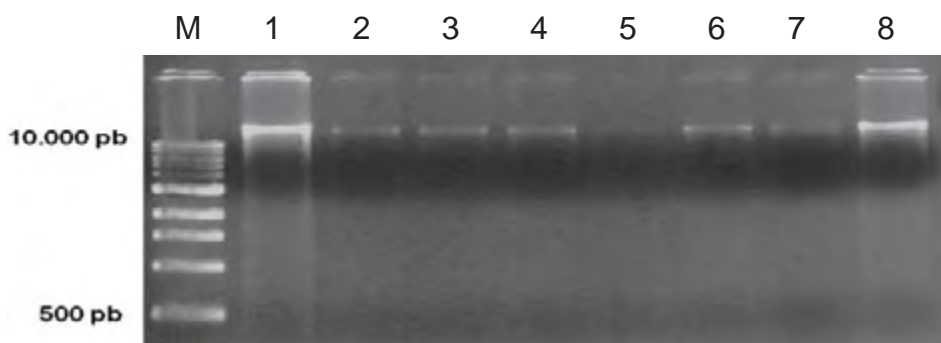


Figura 3. Gel de agarose 1 % confirmando extração do DNA genômico das formigas attíneas. M – marcador de peso molecular. 1 – *Acromyrmex* sp, 2 – *Apterostigma* sp, 3 – *Cyphomyrmex* sp, 4 – *Mycetarotes* sp, 5 – *Mycocephurus* sp, 6 – *Serycomyrmex* sp, 7 - *Trachymyrmex* sp e 8 – *Mycetagroicos* sp..

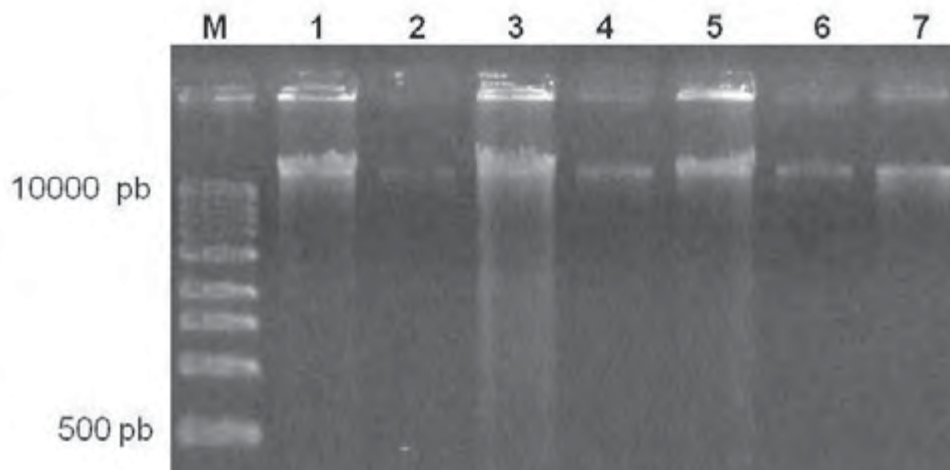


Figura 4: Gel de agarose 1 % mostrando a extração de DNA genômico das formigas não atíneas M – marcador de peso molecular, 1 – *Cephalotes clypeatus*, 2 – *Camponotus* sp, 3 – *Pachycondila* sp, 4 – *Crematogaster* sp, 5 – *Pheidole* sp, 6 – *Tapinoma* sp, 7 – *Cephalotes pusillus*.

5.4 Amplificação de seqüências nucleotídicas de regiões 16S de bactérias e purificação das amostras obtidas.

Procedeu-se então a reação de PCR com o DNA obtido utilizando-se a Taq DNA Polimerase (Cenbiot). As Figuras 5 e 6 mostram as bandas obtidas após purificação das amostras.

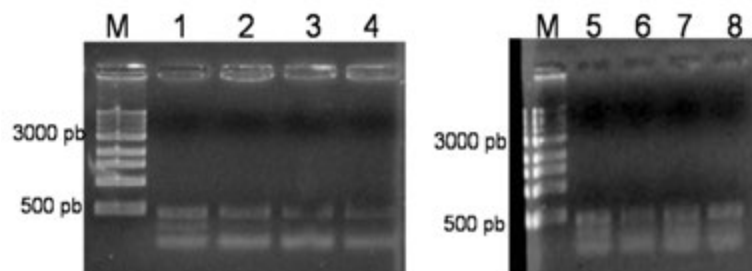


FIGURA 5. Gel de agarose 1 % mostrando os produtos de amplificação (após a purificação) para as formigas: 1 – *Acromyrmex* sp, 2 – *Apterostigma* sp, 3 – *Cyphomyrmex* sp, 4 – *Mycetarotes* sp, 5 – *Mycocepurus* sp, 6 – *Serycomyrmex* sp, 7 – *Trachymyrmex* sp e 8 – *Mycetagroicos* sp. M – marcador de peso molecular.

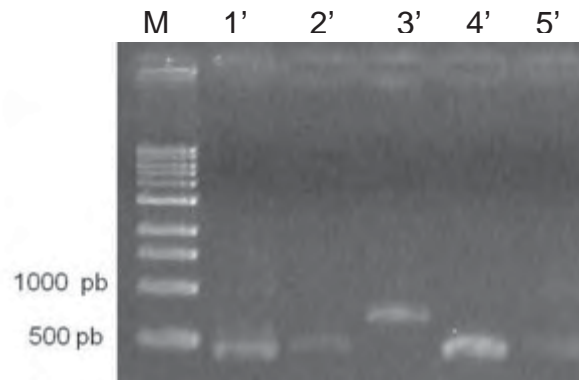


Figura 6: Gel de agarose 1% mostrando a purificação dos produtos de amplificação das formigas não attíneas. M – marcador de peso molecular, 1' – *Cephalotes clypeatus*, 2' – *Camponotus* sp, 3' – *Tapinoma* sp, 4' – *Pheidole* sp, 5' – *Cephalotes pusillus*.

5.5. Clonagem dos fragmentos

Realizou-se então o procedimento de clonagem, a partir dos produtos obtidos de representantes dos gêneros *Acromyrmex* sp, *Cyphomyrmex* sp (derivados), *Apterostigma* sp, *Mycetarotes* sp (basais), *Mycocepurus* sp, *Mycetagroicos* sp, (ambos basais), *Sericomyrmex* sp (derivado) e *Trachymyrmex* sp (intermediário) respectivamente dois derivados e dois basais (MUELLER; REHNER; SCHULTZ, 1998; SCHULTZ; BRADY, 2008) (Figuras 6 e 7), bem como para os produtos de amplificação obtidos de representantes dos gêneros, *Camponotus* sp, *Tapinoma* sp e da espécie *C. pusillus* (Figuras 8 e 9).



Figura 6: Gel de agarose 1 % para confirmação da extração do plasmídeo por “mini prep”. P – PUC 18; 1.1 a 1.6 - clones das bactérias referentes ao gênero *Acromyrmex*, 2.1 a 2.4 - clones das bactérias referentes ao gênero *Apterostigma*, 3.1 a 3.6 - clones das bactérias referentes ao gênero *Cyphomyrmex*, e 4.1 a 4.6 – clones das bactérias referentes ao gênero *Mycetarotes*.

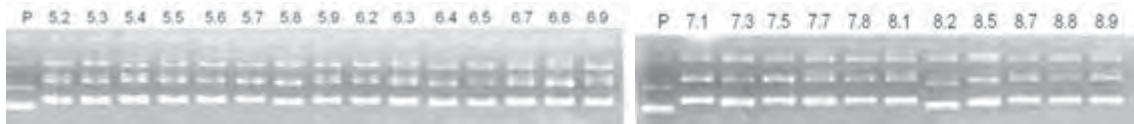


Figura 7: Gel de agarose 1 % para confirmação da extração do plasmídeo por *mini prep*. P – pUC 18; 5.2 a 5.9 – clones das bactérias referentes ao gênero *Mycocephurus*; 6.2 a 6.9 – clones das bactérias referentes ao gênero *Serycomymex*, 7.1 a 7.8 – clones das bactérias referentes ao gênero *Trachymymex* e 8.1 a 8.9 – clones das bactérias referentes ao gênero *Mycetagroicus*.

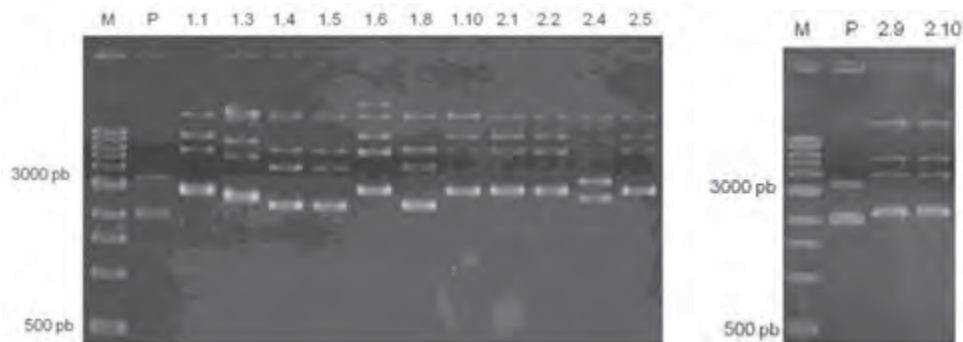


Figura 8: Gel de agarose 1 % para confirmação da extração do plasmídeo por *mini prep*. M – marcador de peso molecular; P – pUC 18; 1.1 a 1.10 – clones das bactérias referentes ao gênero *Camponotus* sp.; 2.1 a 2.10 - clones das bactérias referentes ao gênero *Tapinoma* sp.

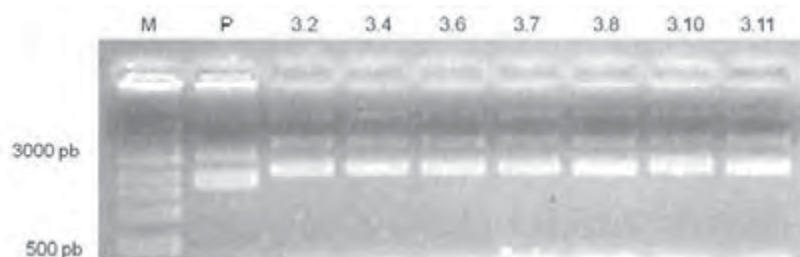


Figura 9: Gel de agarose 1 % para confirmação da extração do plasmídeo por “mini prep”. M – marcador de peso molecular; P – pUC 18; 3.2 a 3.11 – clones das bactérias referentes à espécie *C. pusillus*.

5.6 Sequenciamento das amostras

Foram sequenciadas as amostras referentes às bactérias presentes nas formigas atíneas *Acromymex* sp, *Cyphomyrmex* sp, *Apterostigma* sp, *Mycetarotes* sp, *Mycocephurus* sp, *Mycetagroicos* sp, *Sericomyrmex* sp e *Trachymymex* sp (escolhidas com base no padrão de migração em gel de agarose, indicando a presença de inserto). Além disso, foram também sequenciados, a partir dos produtos de amplificação, a amostra referente ao gênero não atíneo *Pheidole* sp e à espécie *Cephalotes clypeatus*, bem como os gêneros *Camponotus* sp, *Tapinoma* sp e a

espécie e *C. pusillus*, sendo que essas amostras foram escolhidas com base no padrão de migração em gel de agarose, indicando a presença de inserto

As sequências obtidas foram editadas no BioEdit (buscando-se a retirada de vetores e possíveis erros de seqüenciamento). As formigas da Tribo Attini apresentaram sequências com 395 pares de base e similaridade de 94% com sequências depositadas no GenBank, através da análise pela ferramenta BLAST (CAMACHO, 2009) como é exemplificado na Figura 10.

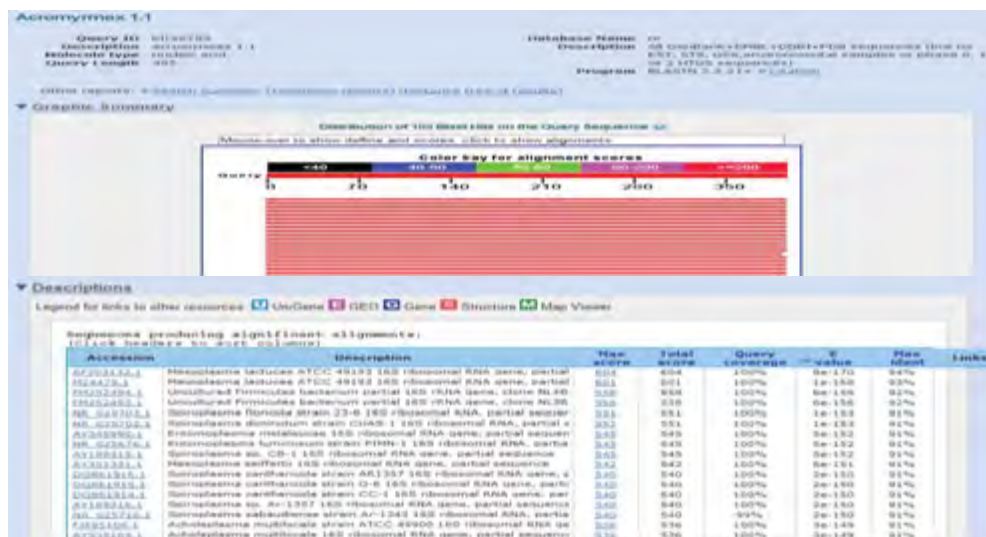


Figura 10: *megablast* da sequência 1.1 mostrando sua similaridade com a espécie *Mesoplasma lactucae* do banco de dados NCBI.

Para as formigas das demais tribos analisadas os resultados foram variados. A partir do indivíduo do gênero *Pheidole* sp foi obtida um sequência com 379 pares de base (Apêndice B) que apresentou 96 % de similaridade com a bactéria *Spiroplasma platyhelix* (Bacteria; Tenericutes; Mollicutes; Entomoplasmatales; Spiroplasmataceae; Spiroplasma) do GenBank. Na formiga do gênero *Camponotus* (Apêndice C) também ocorreu a presença dessa bactéria cuja sequência com 237 pares de base apresentou 97 % de identidade com a do GenBank. Bactérias desse grupo foram primeiro isoladas em 1997 por Williamson et al., da libélula *Pachydiplax longipennis* (ordem Odonata). Da formiga da espécie *Cephalotes clypeatus* (Apêndice D) foi identificada uma sequência com 388 pares de base, com 93 % de similaridade com uma bactéria pertencente à família Comamonadaceae (Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Comamonadaceae) já relatada como simbionte residente do estômago de formigas da tribo Cephalotini (RUSSELL et al., 2009). Entre as sequências obtidas para a formiga da espécie *C. pusillus*

(Apêndice E) foi notada a presença de bactérias do gênero *Bordetella* (Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Alcaligenaceae; *Bordetella*) através da sequência com 393 pares de base que apresentou 96 % de similaridade com essa bactéria no GenBank. A associação desse organismo com tal formiga já é conhecida (RUSSELL et al, 2009). Para a formiga do gênero *Tapinoma* sp (Apêndices F e G) foram obtidas duas sequências, uma com 280 pares de base e outra com 430. Ambas não apresentaram semelhança com nenhuma outra bactéria do banco de dados.

A Tabela 6 sintetiza os resultados obtidos com relação à presença ou ausência de bactérias do gênero *Mesoplasma* sp em formigas da tribo Attini e em tribos filogeneticamente próximas (SCHULTZ, T. R.; BRADY, S. G., 2008).

Tabela 6¹: Gêneros de formigas analisados quanto à presença de bactérias *Mesoplasma* sp.

Subfamília	Tribo	Gênero	Espécie	Casta	Presença de <i>Mesoplasma</i> sp	Outras bactérias encontradas	
Dolechiderinae	<i>Dolichoderini</i>	<i>Tapinoma</i>	-	operária	não	<i>sim, mas não presente no GenBank</i>	
Formicinae	<i>Camponotini</i>	<i>Camponotus</i>	-	operária	não	<i>Spiroplasma platyhelix</i>	
		<i>Acromyrmex</i>	-	operária	sim	-	
		<i>Apterostigma</i>	-	operária	sim	-	
		<i>Atta</i>	-	operária	sim	-	
		<i>Attini</i>	<i>Cyphomyrmex</i>	-	operária	sim	-
			<i>Mycetagroicus</i>	-	operária	sim	-
			<i>Mycetarotes</i>	-	operária	sim	-
			<i>Mycocepurus</i>	-	operária	sim	-
			<i>Sericomyrmex</i>	-	operária	sim	-
			<i>Trachymyrmex</i>	-	operária	sim	-
Myrmicinae	<i>Cephalotini</i>	<i>Cephalotes</i>	<i>C. clypeatus</i>	operária	não	Uncultured Comamonadaceae bacterium	
			<i>C. pusillus</i>	operária	não	<i>Bordetella</i>	
	<i>Creumatogastrini</i>	<i>Creumatogaster</i>	-	operária	não	sem amplificação	
	<i>Pheidolini</i>	<i>Pheidole</i>	-	operária	não	<i>S. platyhelix</i>	
Ponerinae	<i>Ponerini</i>	<i>Pachycondyla</i>	-	operária	não	sem amplificação	

¹ Classificação das formigas baseada em BOLTON, 1995.

Diante desses resultados foi possível concluir que a bactéria *Mesoplasma* sp não esteve presente em formigas de tribos filogeneticamente próximas da tribo Attini, o que significa que provavelmente a tribo Attini e as bactérias *Mesoplasma* sp estabelecem uma possível simbiose exclusiva.

5.7 Análise dos haplótipos das formigas attíneas.

A fim de confirmar a primeira hipótese desse trabalho (possibilidade de relação simbiótica entre attíneas e bactérias do gênero *Mesoplasma* sp), todas as sequências obtidas para a tribo Attini, após edição, foram alinhadas de forma a obter uma matriz (utilizando o programa BioEdit) (Anexo A) que, depois de submetida à análise de *MJ Network*, resultou na rede de haplótipos descrita na Figura 11.

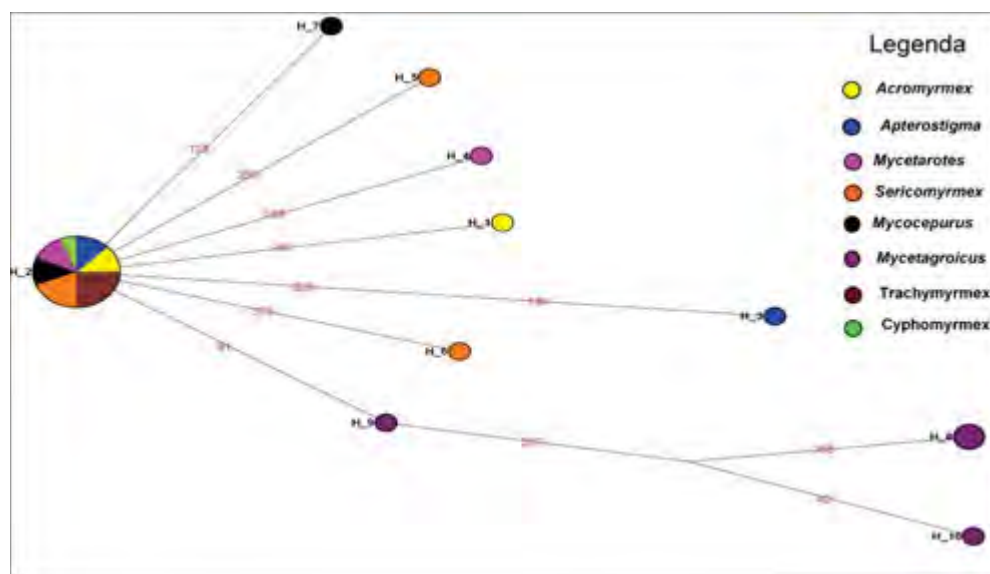


FIGURA 11. Rede de haplótipos 16S, representados por círculos de tamanhos e áreas coloridas proporcionais às frequências haplotípicas encontradas em diferentes gêneros de formigas Attini. Note uma linhagem de haplótipos 16S presente em todos os gêneros de Attini e uma segunda linhagem de haplótipos exclusiva do gênero *Mycetagroicus*.

Uma baixa variação nas seqüências 16S foi encontrada em espécimes de *Mesoplasma* associadas às formigas Attini estudadas. Estas seqüências estão distribuídas em duas linhagens: uma associada a espécimes de todos os gêneros investigados e outra associada somente ao gênero *Mycetagroicus*. A baixa diversidade bacteriana associada a diferentes gêneros de formigas Attini pode ser

indicativo de uma recente associação dos parasitas com as formigas, seguida de uma rápida distribuição da bactéria entre membros dos diversos gêneros attíneos.

No intuito de validar a hipótese de associação exclusiva entre as bactérias do gênero *Mesoplasma* sp e as formigas attíneas foi realizada uma nova análise de haplótipos utilizando as sequências de *Mesoplasma* sp obtidas no trabalho e sequências pertencentes a esse gênero e/ou filogeneticamente próximas a ele, do Centro Nacional de Informação Biotecnológica - NCBI (BENSON, D. A. et al., 2000). A Figura 12 mostra a rede de haplótipos gerada e a Tabela 6 os números de acesso das bactérias utilizadas.

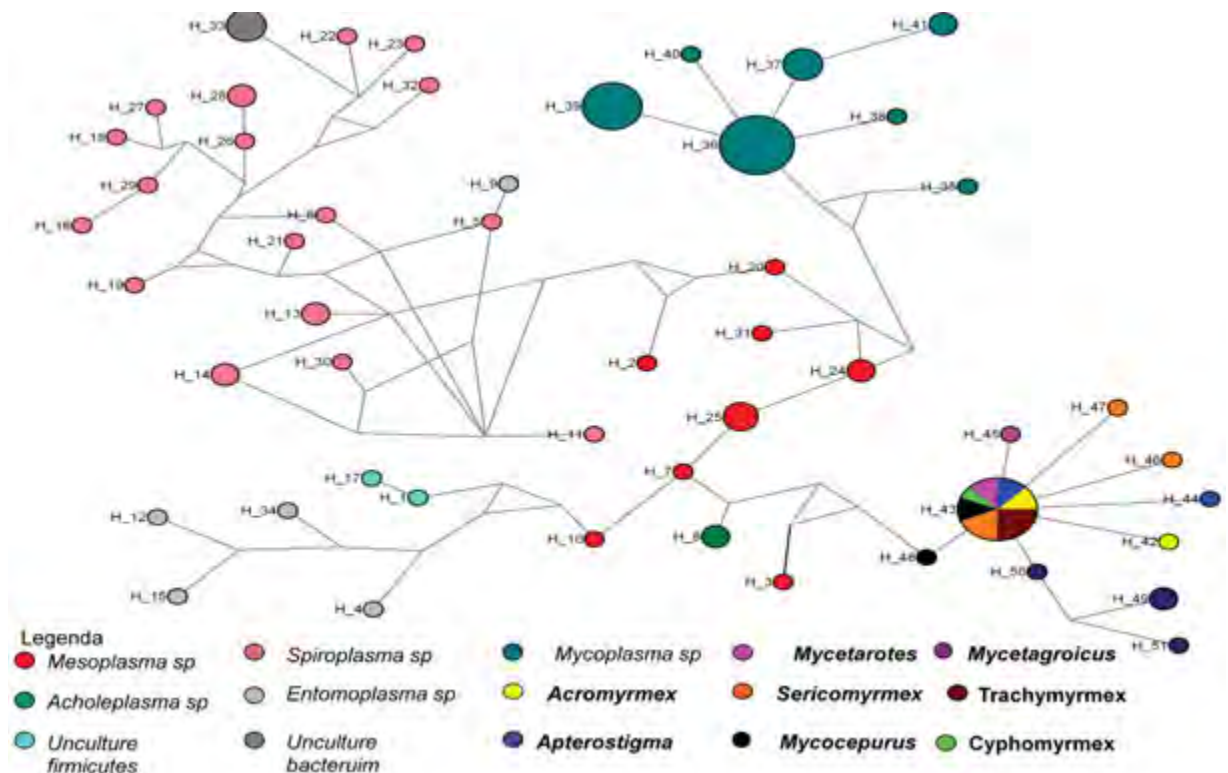




































Figura 12: rede de haplótipos gerada a partir das sequências de *Mesoplasma* sp obtidas nesse estudo e de sequências recuperadas do banco de dados NCBI. Os círculos coloridos têm áreas proporcionais às frequências haplotípicas encontradas nos diferentes grupos analisados. Note que os haplótipos correspondentes às bactérias encontradas nos diferentes gêneros de formigas Attini formam um grupo separado dos demais.

Tabela 6. Números de acesso no banco NCBI das sequências correspondentes a cada haplótipo, a espécie a qual pertencem e sua cor correspondente na rede de haplótipos.

HAPLÓTIPO	CÓDIGO NCBI	ESPÉCIE	SÍMBOLO
H_1	FM252494.1	<i>Uncultured Firmicutes bacterium</i>	
H_2	NR_025683.1	<i>Mesoplasma corruscae</i>	
H_3	AY177627.1	<i>M. photuris</i>	

				continuação...
HAPLÓTIPO	CÓDIGO NCBI	ESPÉCIE	SÍMBOLO	
H_4	NR_025676.1	<i>Entomoplasma luminosum</i>		
H_5	NR_025703.1	<i>Spiroplasma floricola</i>		
H_6	NR_025702.1	<i>S. diminutum</i>		
H_7	AY351331.1	<i>M. seiffertii</i>		
H_8	FJ595100.1	<i>Acholeplasma multilocale</i>		
	AY538169.1	<i>A. multilocale</i>		
H_9	AY345990.1	<i>E. melaleucae</i>		
H_10	NR_025728.1	<i>M. syrphidae</i>		
H_11	AY189315.1	<i>Spiroplasma sp</i>		
H_12	AF036954	<i>E. freundtii</i>		
H_13	DQ861916.1	<i>S. cantharicola</i>		
	AY189316.1	<i>Spiroplasma sp</i>		
H_14	DQ861915.1	<i>S. cantharicola</i>		
	DQ861914.1	<i>S. cantharicola</i>		
H_15	AF547212.1	<i>E. lucivorax</i>		
H_16	NR_025710.1	<i>S. sabaudiense</i>		
H_17	FM253028.1	<i>Uncultured Firmicutes bacterium</i>		
H_18	NR_025712.1	<i>S. turonicum</i>		
H_19	NR_025701.1	<i>S. culicicola</i>		
H_20	NR_025682.1	<i>M. chauliocola</i>		
H_21	AY189317.1	<i>Spiroplasma sp.</i>		
H_22	NR_025713.1	<i>S. velocicrescens</i>		
H_23	NR_025698.1	<i>S. chinense</i>		
H_24	DQ514606.1	<i>M. coleopterae</i>		
	DQ514605.1	<i>M. coleopterae</i>		
H_25	AE017263.1	<i>M. florum</i>		
	AF305693.1	<i>M. entomophilum</i>		
	NR_025128.1	<i>M. florum</i>		
H_26	NR_025704.1	<i>S. helicoides</i>		
H_27	NR_025700.1	<i>S. corruscae</i>		
H_28	DQ860100.1	<i>S. lineolae</i>		
	AY189320.1	<i>Spiroplasma sp</i>		
H_29	NR_025708.1	<i>S. litorale</i>		
H_30	NR_025706.1	<i>S. lampyridicola</i>		
H_31	AF042194	<i>M. monodon</i>		
H_32	EF151267.1	<i>Spiroplasma sp</i>		
H_33	DQ163951.1	<i>U. bacterium</i>		
	DQ163950.1	<i>U. bacterium</i>		
	DQ163945.1	<i>U. bacterium</i>		
	DQ163948.1	<i>U. bacterium</i>		
H_34	NR_025677.1	<i>E. somnilux</i>		

continuação...

HAPLÓTIPO	CÓDIGO NCBI	ESPÉCIE	SÍMBOLO
H_35	NR_025971.1	<i>Mycoplasma putrefaciens</i>	●
H_36	GQ409970.1	<i>M. mycoides</i>	●
	EU439609.1	<i>Mycoplasma capricolum</i>	
	AF261730.1	<i>Mycoplasma sp</i>	
	AF261729.1	<i>Mycoplasma sp</i>	
	AF261728.1	<i>Mycoplasma sp</i>	
	AF261725.1	<i>Mycoplasma sp</i>	
	AF085350.1	<i>M. mycoides mycoides</i>	
	AF009840.1	<i>M. capricolum capripneumoniae</i>	
	U26054.1	<i>Mycoplasma sp</i>	
	U26053.1	<i>Mycoplasma sp</i>	
	U26039.1	<i>M. mycoides mycoides</i>	
	U26047.1	<i>M. capricolum capricolum</i>	
	U26045.1	<i>M. capricolum</i>	
	U26040.1	<i>M. capricolum capricolum</i>	
H_37	AF202925.1	<i>M. capricolum capripneumoniae</i>	●
	AF009837.1	<i>M. capricolum capripneumoniae</i>	
	AF009835.1	<i>M. capricolum capripneumoniae</i>	
H_38	AF009831.1	<i>M. capricolum capricolum</i>	●
	U26041.1		
H_39	GQ409972.1	<i>M. mycoides</i>	●
	FJ655560.1	<i>M. mycoides</i>	
	FJ655559.1	<i>M. mycoides</i>	
	FJ655558.1	<i>M. mycoides</i>	
	FJ655557.1	<i>M. mycoides</i>	
	FJ655556.1	<i>M. mycoides</i>	
	FJ655555.1	<i>M. mycoides</i>	
H_40	EU293847.1	<i>Mycoplasma sp</i>	●
	EU293846.1	<i>Mycoplasma sp</i>	
H_41	EU439611.1	<i>M. capricolum</i>	●
H_41	EU439610.1	<i>M. capricolum</i>	●
	EU439608.1	<i>M. capricolum</i>	

A análise de haplótipos elucidada na Figura 12 permite inferir que os haplótipos das bactérias presentes nas formigas attíneas estudadas formam um grupo separado dos demais. Isso equivale a dizer que essas bactérias são peculiares a essas formigas.

5.8 Interações específicas

A especificidade nas interações simbióticas tem duas vias, o hospedeiro e o simbionte (AANEN et al., 2007). Há dois modos fundamentais de transmissão dos simbiontes para os hospedeiros: horizontal (a partir de um ambiente, simbionte de vida livre) e vertical (o simbionte é herdado da geração anterior). No entanto podem ocorrer casos envolvendo tanto uma quanto outra transmissão (BRIGHT; BULGHERESI, 2010).

Na transmissão horizontal de bactérias a população simbionte de vida-livre serve como inóculo para o estabelecimento da relação simbiótica (BRIGHT; BULGHERESI, 2010). No caso das bactérias *Mesoplasma* (que podem habitar tanto insetos quanto plantas), parece ser esse o modo de transmissão entre as formigas da tribo Attini.

5.9 Análise de *pairwise*

Com o intuito de checar quão diferentes entre si sequências de bactérias *Mesoplasma* sp devem ser a fim de configurarem novas espécies, foi aplicada a análise *pairwise* em doze sequências recuperadas do banco de dados do NCBI (ver Apêndice C) e duas sequências representativas daquelas obtidas nesse estudo (*Acromyrmex* 1.1 e *Micetagroicos* 8.9).

As sequências recuperadas do banco de dados NCBI se mostraram muito semelhantes entre si. *M. grammopterae* e *M. florum* apresentaram apenas 0,73 % de diferença entre si. No outro extremo *M. coleóptera* e *M. lactucae* apresentaram 37,8 % de diferença (Tabela 7). Isso mostra que a distinção entre um espécie e outra de bactérias *Mesoplasma* sp, a partir das sequências, é bem pequena.

Tendo isso em vista, pode-se dizer, ainda, que as sequências de *Mesoplasma* sp parecem configurar espécies diferentes daquelas depositadas no banco de dados, uma vez que apresentaram, entre 9,77 e 1,01 % de diferença dessas sequências.

Tabela 7: Análise de pairwise mostrando a porcentagem de semelhança entre as sequências de *Mesoplasma* sp recuperadas do NCBI.

	<i>M. lactucae</i>	<i>M. seiffertii</i>	<i>M. corruscae</i>	<i>M. syrphidae</i>	<i>M. photuris</i>	<i>M. chauliocola</i>	<i>M. coleoptera</i>
<i>Mesoplasma lactucae</i>	100,00%						
<i>M. seiffertii</i>	92,16%	100,00%					
<i>M. corruscae</i>	91,87%	94,24%	100,00%				
<i>M. syrphidae</i>	92,43%	99,40%	94,12%	100,00%			
<i>M. photuris</i>	92,40%	96,09%	92,57%	96,29%	100,00%		
<i>M. chauliocola</i>	92,49%	95,07%	96,14%	95,21%	93,13%	100,00%	
<i>M. coleoptera</i>	62,20%	64,51%	65,58%	64,50%	64,00%	66,65%	100,00%

	<i>M. lactucae</i>	<i>M. seiffertii</i>	<i>M. corruscae</i>	<i>M. syrphidae</i>	<i>M. photuris</i>	<i>M. chauliocola</i>	<i>M. coleoptera</i>
<i>M. grammopterae</i>	91,75%	95,12%	95,99%	95,19%	93,11%	98,60%	66,94%
<i>M. entomophilum</i>	91,57%	94,14%	95,25%	94,27%	93,55%	98,15%	67,37%
<i>M. florum</i>	92,35%	95,21%	96,33%	95,34%	93,58%	98,87%	67,28%
<i>M. tabanidae</i>	91,47%	94,56%	95,75%	94,96%	93,97%	98,08%	67,57%
<i>M. pleciae</i>	79,43%	79,56%	80,83%	79,48%	78,99%	80,21%	54,75%
<i>Acromyrmex 1.1</i>	94,19%	91,44%	91,16%	91,18%	91,16%	91,23%	90,98%
<i>Micetagroicos 8.9</i>	93,94 %	90,93%	90,91%	90,68%	90,66%	90,73%	90,48%

	<i>M. grammopterae</i>	<i>M. entomophilum</i>	<i>M. florum</i>	<i>M. tabanidae</i>	<i>M. pleciae</i>	<i>Acromyrmex 1.1</i>	<i>Micetagroicos 8.9</i>
<i>M. grammopterae</i>	100,00%						
<i>M. entomophilum</i>	98,15%	100,00%					
<i>M. florum</i>	99,27%	98,88%	100,00%				
<i>M. tabanidae</i>	98,67%	99,01%	99,07%	100,00%			
<i>M. pleciae</i>	80,80%	79,32%	80,21%	79,89%	100%		
<i>Acromyrmex 1.1</i>	90,98%	90,98%	90,98%	90,73%	74,24%	100%	
<i>Micetagroicos 8.9</i>	90,48%	90,48%	90,48%	90,23%	73,74%	98,99%	100%

6. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos podemos inferir que as bactérias encontradas nas formigas atíneas fazem parte de uma linhagem específica, separada das demais. Tal fato é comprovado pela análise de haplótipos. Além disso, as sequências de *Mesoplasma* sp geradas são provavelmente de uma mesma espécie de bactéria, devido a alta semelhança apresentada entre elas.

Assim comprova-se a primeira hipótese desse estudo na qual bactérias *Mesoplasma* sp e formigas atíneas estabelecem uma associação entre si. É comprovada ainda, a segunda hipótese pela associação específica entre essa bactéria e esse grupo de formigas. A baixa diversidade das cepas de *Mesoplasma* simbiotes de Attini sugere uma associação recente entre as formigas e as bactérias.

REFERÊNCIAS

- AANEN, D. K.; ROS, V. I. D.; LICHT, H. H. F.; MITCHELL, J.; BEER, Z. W.; SLIPPERS, B.; ROULAND-LEFÈVRE, C.; BOOMSMA, J. J. Patterns of interaction specificity of fungus-growing termites and *Termitomyces* symbionts in South Africa. *BMC Evolutionary Biology*, Londres, v. 7, p. 115-125. 2007.
- ASUAR, L. E. Guia practica sobre la tecnica de PCR. : EGUIARTE, L. E.; SOUZA, V.; AGUIRRE X. (Ed.). *Ecología Molecular*. México: Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2007. Cap. 17, p. 499-516.
- BACCI, M. Jr.; RIBEIRO, S. B.; CASAROTTO, M. E. F.; PAGNOCCA, F.C. Biopolymer-degrading bacteria from nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Ribeirao Preto, v. 28, p. 79–82. 1995.
- BASS, M.; CHERRETT, J. M. Fungal hyphae as a source of nutrients for the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. *Physiological Entomology*, Oxford, v. 20, n. 1, p. 1–6. 1995.
- BENSON, D. A.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D. J.; OSTELL, J.; WHEELER, D. L. GenBank. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v. 28, n. 1, p. 15-18. 2000.
- BLOCHMANN, F. Über das Vorkommen bakterienähnlicher Gebilde in den Geweben und Eiern verschiedener Insekten, *Zentralbl Bakteriol*, v.11, p. 234–240. 1887.
- BOLTON, B. *A New General Catalogue of the Ants of the World*. Londres: Havard University Press, 1995. 504 p.
- BORM, S.V.; BILLEN, J.; BOOMSMA, J. J. The diversity of microorganisms associated with *Acromyrmex* leafcutter ants. *BMC Evolutionary Biology*, Londres v. 2, n. 9, p. 1-11. 2002.
- BRIGHT, M.; BULGHERESI, S. A complex journey: transmission of microbial symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, Londres, v. 8, p. 218-230. 2010.
- CAETANO, F. H.; JAFFÉ, K.; ZARA, F. J. *Formigas: biologia e anatomia*. 1. ed. Rio Claro: Flávio Henrique Caetano, 2002. 131 p.
- CAMACHO, C. et al. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, Londres, v. 10, p. 421-429. 2009.

CARLE, P. et al. Heterogeneity of Genome Sizes within the Genus *Spiroplasma*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Spencers Wood, v. 45, n. 1, p. 178-181. 1995.

CARREIRO, S. C.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; BACCI, M.; HEBLING, M. J. A., SILVA, O. A. Yeasts associated with the nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908. *Antonie van Leeuwenhoek*, Amsterdam, v. 71, n. 73, p. 243-48. 1997.

CLARK, M. A.; MORAN, N. A.; BAUMANN, P.; WERNEGREN, J. J. Cospeciation between bacterial endosymbionts (*Buchnera*) and a recent radiation of aphids (*Uroleucon*) and pitfalls of testing for phylogenetic congruence. *Evolution*, Lancaster, v. 54, n. 2, p.517-525. 2000.

CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G.; MALLOCH, D. The agricultural pathology of ant fungus gardens. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United of America*, Washington, v. 96, p. 7998-8002. 1999.

CURRIE, C. R.; SCOTT, J. A.; SUMMERBELL, R. C.; MALLOCH, D. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *Nature*, Londres, v. 398, p. 701-704. 1999.

FALCON, L. I.; VALERA, A. Extracción de ácidos nucleicos. In: EGUIARTE, L. E.; SOUZA, V.; AGUIRRE, X. (Ed.). *Ecología Molecular*. México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2007. Cap. 16, p. 499-516.

FERNÁNDEZ-MARÍN, H.; ZIMMERMAN, J. K.; WCISLO, W. T. Ecological traits and evolutionary sequences of nest establishment in fungus-growing ants (Hymenoptera, Formicidae, Attini). *Biological Journal of the Linnean Society*, Londres, v. 81, n. 1, p. 39-48. 2004.

FLUXUS TECHNOLOGY LTDA. Network 4.5.1.6. User Guide 2009. Disponível em: <http://www.fluxus-engineering.com/Network4516_user_guide.pdf> Acesso em: 17 dez. 2010.

GASPARICH, G. E.; WHITCOMB R. F.; DODGE, D.; FRENCH, F. E.; GLASS, J.; WILLIAMSON, D. L. The genus *Spiroplasma* and its non-helical descendants: phylogenetic classification, correlation with phenotype and roots of the *Mycoplasma mycoides* clade. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Reading, v. 54, p. 893-918. 2004.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, Oxford, v. 41, p. 95-98. 1999.

HERRE, E. A. Laws governing species interactions? Encouragement and caution from figs and their associates. In: *Levels of selection in evolution* Princeton, Nova Jersey: Princeton University Press, p. 209-237. 1999.

HIGGENS, D. B.; BLEASBY, A. J.; FUCHS, R. CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *Computer Applications in the Bioscience*, Oxford, v. 8, n. 2, p. 189-191. 1992.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. *Journey to the Ants: a story of scientific exploration*. 3. ed. Cambridge: The Belknap Press, 1995. 228 p.

HUGENHOLTZ, P.; TYSON, G. W. Metagenomics. *Nature*, Londres, v. 455, p. 481-483. 2008.

JAFFE, K.; CAETANO, F. H.; SÁNCHEZ, P.; HERNÁNDEZ, J. V.; CARABALLO, L.; VITELLI-FLORES, J.; MONSALVE, W.; DORTA, B.; LEMOINE, V. R. Sensitivity of ant (*Cephalotes*) colonies and individuals to antibiotics implies feeding symbiosis with gut microorganisms. *Canadian Journal of Zoology*, Ottawa v. 79, n. 6, p. 1120-1124. 2001.

KIEVITSBOSCH, T. J. *Caracterização de comunidades microbianas em ninhos de formigas da tribo Attini através da metagenômica*. 2008. 46 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2008.

KIEVITSBOSCH, T. J., et al. Metagenômica revela primeiros indícios de parasitas bacterianos intracelulares na formiga *Atta laevigata*. *Anais 53º Congresso Brasileiro de Genética*. 2007.

KIRKPATRICK, B. C.; SMART, C. D. *Phytoplasmas: can phylogeny provide the means to understand pathogenicity?* *Advances in Botanical Research*, Londres, v. 21, p. 187–212. 1995. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=PublicationURL&_tockey=%23TOC%2318036%231995%23999789999%23685470%23FLP%23&_cdi=18036&_pubType=BS&view=c&_auth=y&_acct=C000049647&_version=1&_urlVersion=0&_userid=972052&md5=1ef9e80c3e3890288b0fd47904475029>. Acesso em: 2 set. 2010.

KONČAR, H. *Research work on grapevine yellows phytoplasma*. Nacionalni Institut za Biologijo – Projeto do mês. Disponível em: <<http://www.nib.si/eng/index.php/aktualno/project/271-research-work-on-grapevine-yellows-phytoplasma.html>>. Acesso em: 4 set. 2010.

MADIGAN, MT.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. 2000. *Brock biology of microorganisms*. 12. ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2009. 991 pp.

MANILOFF, J.; MCELHANEY, R. N.; FINCH, L. R.; BASEMAN, J. B. (ed.). *Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis*. Washington: American Society for Microbiology, 1992. Disponível em: http://books.google.com/books?id=G3rURFq6u84C&printsec=frontcover&dq=Mycoplasmas:+molecular+biology+and+pathogenesis&hl=en&ei=uT6ATJjXNMH_lgf21p2JDw&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=1&ved=0CCoQ6AEwAA#v=onepage&q&f=false. Acesso em: 2 set. 2010.

MANTOVANI, J. D.; RODOVALHO, C. M.; MARTINS, J. R., J; BACCI JR., M. Ubiquidade de *Mesoplasma* sp em formigas da tribo attini. In: Congresso Brasileiro de Genética, n. 55, 2009, Águas de Lindóia. *Resumos...* Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Genética, 2009. p. 43. Disponível em: <<http://web2.sbg.org.br/congress/sbg2008/pdfs2009/GM043-30062.pdf>>. Acesso em: 1 set. 2010.

MUELLER, U. G.; REHNER S. A.; SCHULTZ, T. R. The Evolution of Agriculture in Ants. *Science*, Washington, v. 281, p. 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 mutualism. *The Quarterly Review of Biology*, Nova York, v. 76, n. 2, p. 169–97. 2001.

MUELLER, U.G.; RABELING, C. A breakthrough innovation in evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v. 105, n.14, p. 5287-5288. 2008.

MUELLER, U.G.; REHNER, S.A.; SCHULTZ, T.R. The evolution of agriculture in ants. *Science*, Washington, v. 281, n. 5385, p. 2034–2038. 1998.

MUELLER, U.G; GERARDO, N. Fungus-farming insects: Multiple origins and diverse evolutionary histories. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United of America*, Washington, v. 99, n. 24, p. 15247–15249. 2002.

MUNKACSI, A. B.; PAN, J. J., VILLESSEN, P.; MUELLER, U. G.; BLACKWELL, M.; MCLAUGHLIN, D. J. Convergent coevolution in the domestication of coral mushrooms by fungus-growing ants. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences*, Londres, v. 271, n. 1550, p. 1777–1782. 2004.

MURAKAMI, T.; HIGASHI, S. Social organization in two primitive attine ants, *Cyphomyrmex rimosus* and *Myrmicocrypta ednaella*, with reference to their fungus substrates and food sources. *Journal of Ethology*, Kyoto, v. 15, n. 1, p.17– 25. 1997.

NAULT, L.R.; DELONG, D.M. Evidence for co-evolution of leafhoppers in the genus *Dalbulus* (Cicadellidae: Homoptera) with maize and its ancestors. *Annals of the Entomological Society of America*, College Park, v. 73, p. 349-353. 1980.

RAZIN, S. The genera *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Acholeplasma*, *Anaeroplasm*, and *Asteroleplasma*,. In BALOWS, A.; TRÜPER, H. G., DWORKIN, M., HARDER, W.; SCHLEIFER, K. H. (ed.). The prokaryotes. 2. ed. Nova York: Ed. Springer-Verlag,. 1991. p. 1937–1959.

RAZIN, S. The Mycoplasmas. *Microbiology Reviews*, Philadelphia, v. 42, n. 2, p. 414-470. 1978.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Jerusalém, v. 62, n. 4, p. 1.094-1156. 1998.

RUSSELL, J. A.; MOREAU, C. S.; GOLDMAN-HUERTASA, B.; FUJIWARA, M.; LOHMANA, D. J.; Pierce, N. E. Bacterial gut symbionts are tightly linked with the evolution of herbivory in ants. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United of America*, Washington, v. 106, n. 50, p. 21236-21241. 2009.

SANTOS, A. V.; DILLON, R. J.; DILLON, V. M.; REYNOLDS, S. E.; SAMUELS, R. I. Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, v. 239, n. 2, p. 319–23. 2004.

SCHRÖDER D.; DEPPISCH, H.; OBERMAYER, M.; KROHNE, G; STACKEBRANDT, E.; HÖLLDOBLER, B.; GOEBEL, W.; GROSS, R. Intracellular endosymbiotic bacteria of *Camponotus* species (carpenter ants): systematics, evolution and ultrastructural characterization. *Molecular Microbiology*, cidade, v. 21, n. 3, p. 479–489. 1996.

SCHULTZ, T. R.; BRADY, S. G. Major evolutionary transitions in ant agriculture. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United of America*, Washington, v. 105, n. 14, p. 5435–5440. 2008.

SPRUYT, M.; BUQUICCHIO, F. Gene Runner for Windows. 1996. Disponível em: <<http://www.generunner.net/>>. Acesso em: 15 jul. 2009.

TRACHTENBERG, S. Mollicutes. *Current Biology*, Londres, v. 15, n. 13, p. R483-R484, julho. 2005.

TREE OF LIFE WEB PROJECT. *Attini. Fungus-growing ants*. Nota: Versão de 22 março de 2004 - temporária. Disponível em: <<http://tolweb.org/Attini/22435/2004.03.22>>. Acesso em: 1 set. 2010.

TULLY, J. G. Taxonomic Descriptions of Eight New Non-Sterol-Requiring Mollicutes Assigned to the Genus *Mesoplasma*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Spencers Wood, v. 44, n. 4, p. 685-693. 1994.

TULLY, J. G.; ROSE, D. L.; HACKETT, K. J.; WHITCOMB, R. F.; CARLE, P.; BOVE, J. M.; COLFLESH, D. E.; WILLIAMSON, D. L. *Mycoplasma ellychniae* sp. nov., a Sterol-Requiring Mollicute from the Firefly Beetle *Ellychnia corrusca*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Spencers Wood, v. 39, n. 3, p. 284-289, jul. 1989.

WHEELER, W. M. A Study of Some Texan Ponerinae. *Biological Bulletin*, Woods Hole, v. 2, n. 1, p. 1-31. 1900.

WHEELER, W. M. The habits of the tent-building ant (*Cremastogaster lineolata* Say), *Bulletin of the American Museum of Natural History*, Santa Barbara, v. 22, p. 1-18. 1906.

WILLIAMSON, D. L.; ADAMS, J. R.; WHITCOMB, R. F.; TULLY, J. G.; CARLE, P.; KONAI, M.; J. M. BOVÉ; HENEGAR, R. B. *Spiroplasma platyhelix* sp. nov., a New Mollicute with Unusual Morphology and Genome Size from the Dragonfly *Pachydiplax longipennis*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Spencers Wood, v. 47, n. 3, p. 763 – 766. 1997.

WILSON, E. O.; HÖLLDOBLER, B. The rise of the ants: A phylogenetic and ecological explanation. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United of America*, Washington, v. 102, n. 21, p. 7411–7414. 2005.

WOESE, C. R. Bacterial Evolution. *Microbiological Reviews*, Philadelphia, v. 51, n. 2, p. 221-271. 1987.

ZHOU, C., YANG, Y., JONG, A. Y. Mini-prep in Ten Minutes. *BioTechniques*, Natick, v.8, n.2, p. 172-173. 1990.

GLOSSÁRIO

Análise de *pairwise*: análise realizada a partir de um par de sequências. Mostra quão semelhante uma sequência é da outra.

BioEdit: programa desenvolvido para edição de sequências de DNA.

Clonagem: técnica que consiste em utilizar uma bactéria para produzir ou expressar genes de interesse.

Eletroforese em gel de agarose: técnica que consiste em separar as moléculas de DNA por meio de um campo elétrico gerado numa cuba de eletroforese. Sendo o DNA uma molécula negativa (devido a presença de fosfato), em pH neutro, ele migra em direção ao pólo positivo. A velocidade e qualidade dessa migração dependerão do tamanho e forma da molécula estudada, concentração de agarose no gel, voltagem aplicada no campo elétrico, tempo de corrida e tamanho do poço de aplicação.

Inserto: fragmento do DNA de interesse que será ligado ao vetor de clonagem que por sua vez será inserido numa célula hospedeira compatível por meio do processo de transformação.

GenBank: banco de dados genéticos *online* com sequências nucleotídicas de organismos do mundo todo. Pode ser acessado pelo endereço: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.

Marcador de peso molecular: também chamado e *ladder*, o marcador contém DNAs com pesos moleculares pré-estabelecidos que permitem a comparação com a amostra de interesse.

Megablast: ferramenta do NCBI que busca sequências praticamente iguais a estudada (semelhança acima de 80%)

Mini prep: procedimento final da clonagem, no qual o plasmídeo bacteriano é extraído da bactéria por processos físico-químicos.

NCBI: Centro Nacional de Informação Biotecnológica.

PCR: técnica inventada em 1983 por Kery Banks Mullis. Apresenta três etapas básicas que são repetidas várias vezes em ciclos: a desnaturação térmica do DNA de interesse, o anelamento dos *primers* e a extensão, onde age a enzima *Taq polimerase* adicionando bases nitrogenadas (dNTPs) às novas fitas de DNA.

Plasmídeo: DNA bacteriano originado de replicação autônoma.

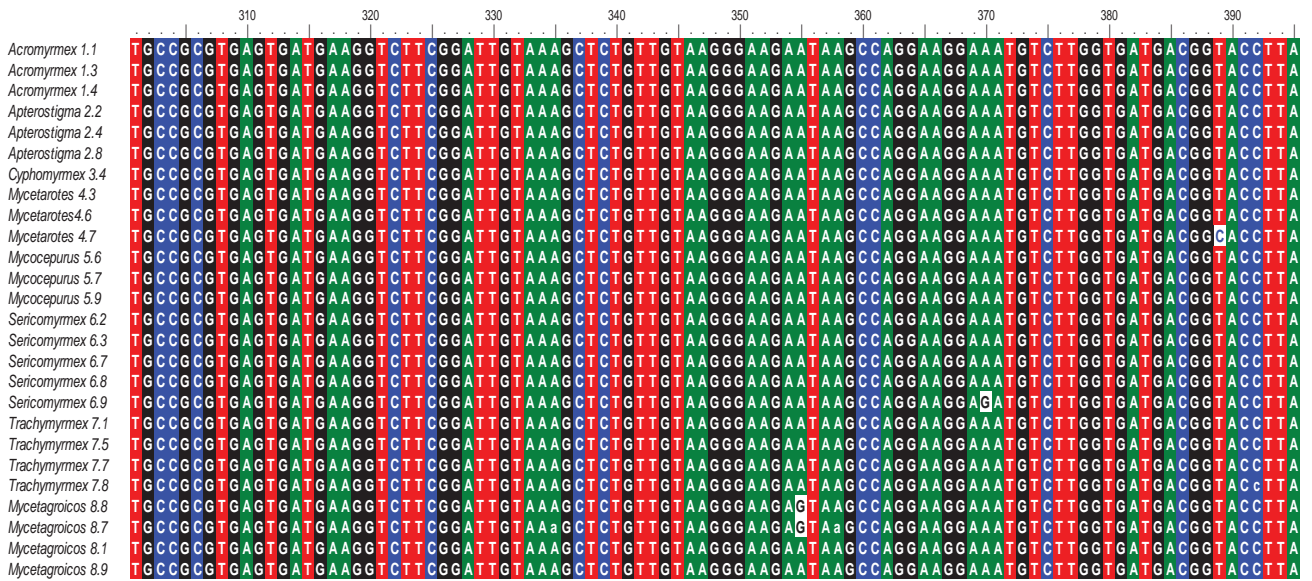
pUC 18: vetor de clonagem usado com *Escherichia coli*.

Sequenciamento: processo para determinar a sequência nucleotídica de uma amostra de interesse.

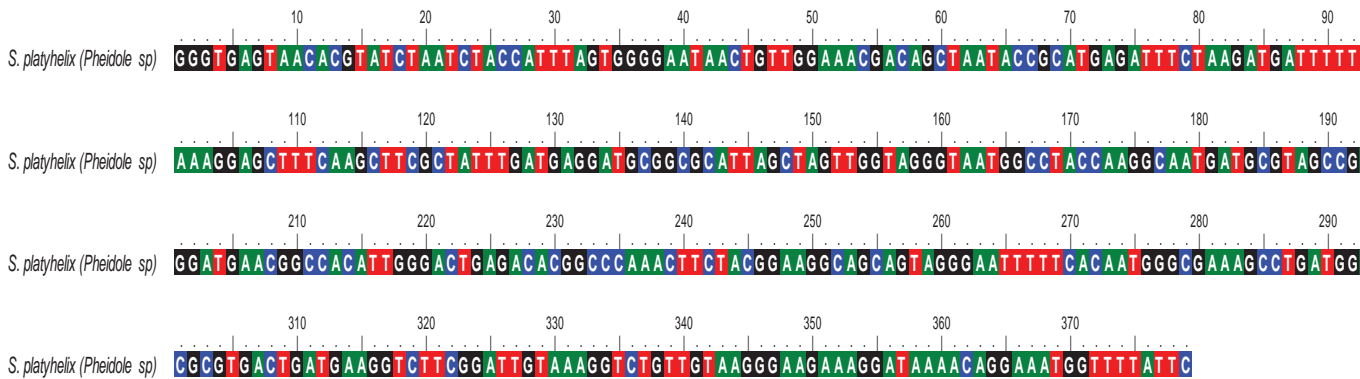
Single colony prep: etapa anterior a *miniprep*, na qual é verificado o sucesso da transformação bacteriana.

Vetor de clonagem: fragmento de DNA que contém um gene de interesse e possui propriedades específicas. Exemplo.: plasmídeo.

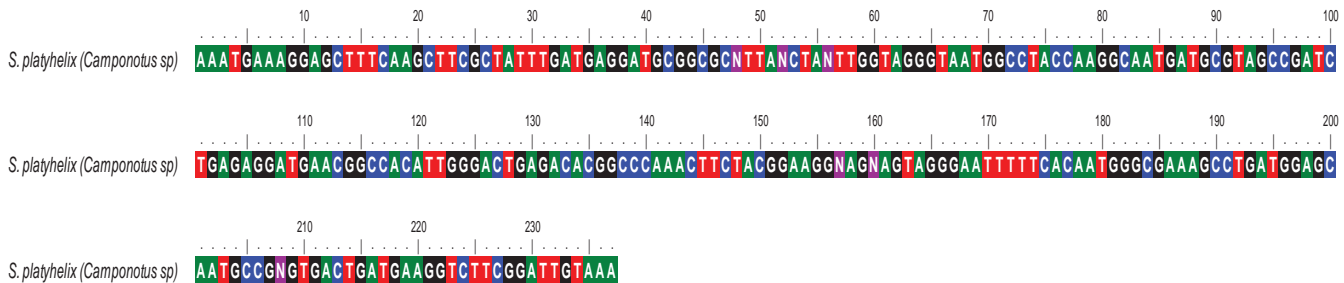
APÊNDICES



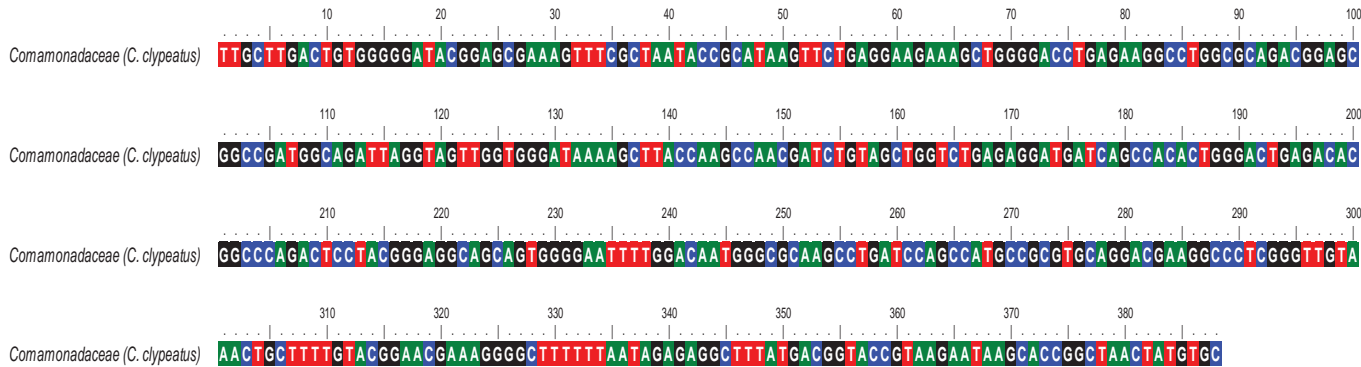
APÊNDICE B - Sequência de *Spiroplasma platyhelix* amplificada a partir de indivíduo do gênero Pheidole.



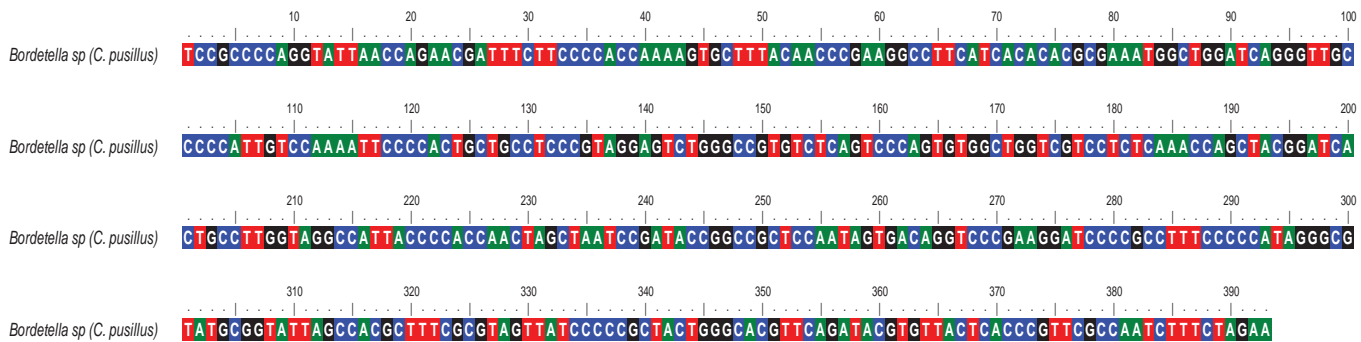
APÊNDICE C - Sequência de *Spiroplasma platyhelix* amplificada a partir de indivíduo do gênero Camponotus sp.



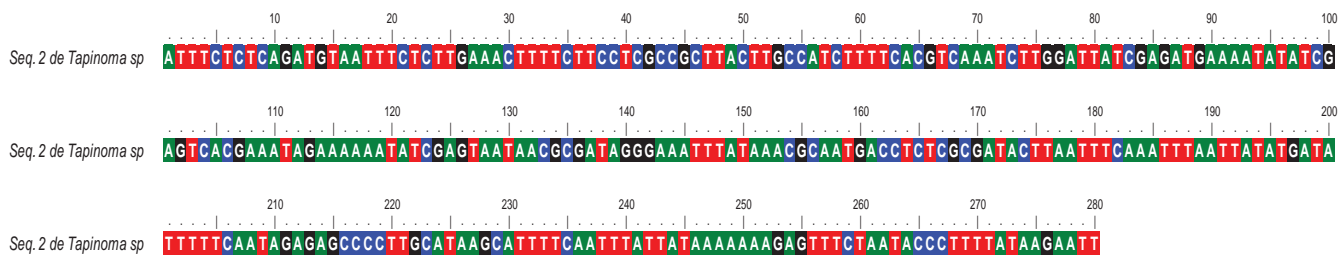
APÊNDICE D - Sequência de *Comamonadaceae* sp amplificada a partir de indivíduo da espécie *Cephalotes clypeatus*.



APÊNDICE E - Sequência de *Bordetella* sp amplificada a partir de indivíduo da espécie *C. pusillus*.



APÊNDICE F - Sequência obtida a partir do indivíduo do gênero *Tapinoma* sp.



APÊNDICE G - Sequência obtida a partir do indivíduo do gênero *Tapinoma* sp.

