
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ALEXANDRE HIDEAKI TAKARA

**PORCENTAGEM DE INFECÇÃO POR
Mesoplasma sp. NAS DIFERENTES
CASTAS DE *Atta sexdens*
(HYMENOPTERA: FORMICIDAE)**



Rio Claro
2011

ALEXANDRE HIDEAKI TAKARA

PORCENTAGEM DE INFECÇÃO POR *Mesoplasma* sp. NAS
DIFERENTES CASTAS DE *Atta sexdens* (HYMENOPTERA:
FORMICIDAE)

Orientador: Prof^o. Dr. Maurício Bacci Júnior

Co-orientador: Dra. Cynara de Melo 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 Bacharelado em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2011

595.796 Takara, Alexandre Hideaki
T136p Porcentagem de infecção por Mesoplasma sp. nas
diferentes castas de Atta sexdens (hymenoptera: formicidae) /
Alexandre Hideaki Takara. - Rio Claro : [s.n.], 2011
38 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências
biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências de Rio Claro

Orientador: Maurício Bacci Júnior

Co-Orientador: Cynara de Melo Rodovalho

1. Formiga. 2. Prospecção molecular. 3. Mollicutes. 4.
Formiga cortadeira. I. Título.

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

Agradecimentos

Agradeço a minha família que, mesmo estando longe, me apoiou ao longo de minha formação, não só acadêmica como minha formação pessoal. Também todos que fizeram parte dessa minha vida acadêmica e que acrescentaram muito, direta ou indiretamente, nesses anos de graduação.

Tudo começou logo no primeiro dia em Rio Claro, quando fui ao mercadinho Munique e havia esquecido o caminho de volta para a kitnet. Ainda bem que eu encontrei a Pokas, não só para me mostrar o caminho de casa, mas também por me mostrar o início de uma grande amizade. Agradeço a ela, Marol, Paulinha, Renata, Elisandra, Thatá e ao Thomé – que não largava do meu pé, literalmente –, pois se não fosse por elas eu teria que passar dois meses vivendo de baixo do viaduto do shopping. Serei eternamente grato por tudo meninas, pelas conversas, festas, risadas e choros que compartilhamos.

Agradeço também a todos da minha sala, CBI 2006 – a melhor turma que passou pela UNESP de Rio Claro. Nossos jogos lúdicos noturnos foram demais, mesmo com alguns contratempos, injúrias e cabeças batidas. As festinhas, churrascos e até mesmo os programas de índio fizeram com que a nossa sala se aproximasse mais. Vou sentir saudade de todos vocês.

Ahhhh Nemelés, o que dizer de vocês “9 pessoas morando juntas...acho que não vai dar certo”. Devo informar aos descrentes que deu certo sim. Raíssa, 69, Henrique, Laura, Gandhi, Chaves, Pássaro, Paulo e a Tocha. São tantas histórias temos para contar e muitas outras ainda estão por vir que nem me atrevo a conta-las aqui. Precisamos nos reunir e escrever um livro sobre elas. Já estou vendo um *best-seller* a caminho.

Aos meus amigos de laboratório que me apoiaram não só na elaboração desse trabalho, mas também em momentos de dificuldades. Muito obrigado pelas risadas, festinhas, viagens e faxinas de laboratório. Cynara foi e ainda é minha mentora, ensinou-me tudo que eu sei. Não tenho palavras para expor minha gratidão e carinho por essa pessoa. Também devo agradecimentos especiais a Carol e Joana, que sempre me ajudaram com pinceladas de genialidade quando algo dava errado. E a tantos outros, Miagui, Milene, Cíntia, Tássio e Letícia. Sem vocês esse trabalho nunca teria sido concretizado.

Agradeço ao Prof. Dr. Maurício Bacci Júnior pelo apoio e oportunidade concedidos para a realização desse trabalho. Foi uma oportunidade de ouro que surgiu no momento em que eu estava tentando me encontrar. Ao Prof. Dr. Leopoldo Magno Coutinho por, mesmo sem nos conhecermos pessoalmente, por ter gentilmente fornecido materias de pesquisa para o desenvolvimento desse trabalho.

Muito obrigado a todos

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	4
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
Formiga cortadeira.....	5
Simbiose tripartida.....	7
Fungo simbiote de <i>Atta sexdens</i> – <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	8
<i>Pseudonocardia</i>	9
Parasitas.....	10
Outros microrganismos presentes em ninhos de Attini.....	11
<i>Mesoplasma</i>	11
OBJETIVO	13
MATERIAL E MÉTODOS	14
Coletas.....	14
Extração de DNA total.....	14
Amplificação e purificação da região 16 S de rDNA.....	15
Sequenciamento.....	15
Cálculo da porcentagem de infecção.....	16
RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
Extração.....	17
Detecção de <i>Mesoplasma</i> sp. em amostras de formigas.....	19
Sequenciamento.....	21
Infecção por <i>Mesoplasma</i> sp.....	23
CONSIDERAÇÕES FINAIS	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
APÊNDICES	32
Apêndice A.....	32
Apêndice B.....	33
Apêndice C.....	33
Apêndice D.....	35
Apêndice E.....	36
Apêndice F.....	36
Apêndice G.....	37
Apêndice H.....	37
Apêndice I.....	38

INTRODUÇÃO

Vários autores destacam as formigas cortadeiras como os insetos que maiores danos causam às atividades agrárias (COUTINHO, 1984; MAYHÉ-NUNES *et al.*, 1998; FOWLER, 1993; DELLA LUCIA, 1993; RODRIGUES, 2005). Algumas espécies desfolham, indistintamente, mono e dicotiledônea (SOUSA, 1996), e devido à quantidade de material que coletam constituem praga das plantações (AUTUORI, 1949). Portanto os estudos a respeito desses insetos são de grande importância.

A interação entre formiga da tribo Attini com algumas espécies de fungos é obrigatória nas aproximadamente 200 espécies e essencial para a sobrevivência das formigas (RODRIGUES, 2004). Além de estabelecer simbiose com fungos, algumas destas espécies também apresentam simbioses com bactérias, que podem conferir proteção contra infecção do ninho por fungos entomopatogênicos, através da produção de antibióticos (CURRIE *et al.*, 2002; CARAFO *et al.*, 2005; POULSEN *et al.*, 2005). Uma nova bactéria parasita intracelular, *Mesoplasma* sp., pertencente ao grupo dos Mollicutes, foi recentemente descrita por nosso grupo de pesquisa como agente infectante em algumas espécies de formigas da tribo Attini.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Formigas cortadeiras

As formigas cortadeiras encontram-se na tribo Attini, que se caracteriza por apresentar um mutualismo obrigatório com um fungo simbiote, e desse mutualismo essas formigas obtêm grande parte de seu alimento (SILVA *et al.*, 2003). Especula-se que tal simbiose tenha se iniciado nas Attini mais basais há cerca de 50 milhões de anos, cujos descendentes não extintos são representados pelos gêneros *Mycocepurus* e *Myrmicocrypta*, perdurando até as Attini superiores *Atta* e *Acromyrmex* (SEN *et al.*, 2009).

Atualmente, cerca de 95 % das espécies de Attini estão distribuídas na região neotropical do novo mundo, estendendo-se desde o sul da América do Norte até o sul da América do Sul. No Brasil, *Atta* e *Acromyrmex* são as mais abundantes, distribuindo-se entre 20° e 40° de latitude sul (MAYHÉ-NUNES *et al.*, 1998). Estas formigas cultivam seus fungos simbiotes sobre material vegetal fresco, principalmente folhas, cortado por elas mesmas, por essa razão são conhecidas como formigas cortadeiras.

A capacidade de cultivar seu próprio alimento a partir de um substrato tão abundante, aparentemente, liberou as formigas cortadeiras de certas restrições alimentares e permitiu a formação de enormes colônias, como ocorre no gênero *Atta* (WEBER, 1972). Devido ao tamanho de suas colônias e sua ampla distribuição no continente americano, as formigas cortadeiras são de grande importância econômica e ecológica, podendo ser consideradas como os herbívoros dominantes da região (FOWLER, 1993; DELLA LUCIA, 1993).

O grande tamanho dos formigueiros aliado à preferência por plantas exóticas, trazidas pelo homem, as torna pragas agrícolas de grande relevância devido aos danos que causam às plantações, pastagens e reflorestamento. No entanto, a ação dessas formigas pode apresentar benefícios ao ambiente, estimulando o crescimento de algumas plantas através da poda, decompondo rapidamente o material vegetal caído no solo, além de enriquecê-lo, como ocorre no Cerrado brasileiro (COUTINHO, 1984).

Após o forrageio, as formigas conduzem o material vegetal ao interior do formigueiro para o cultivo do fungo simbiote, mas antes, esse material passa por

um processo de desinfecção através da remoção de agentes contaminantes, é cortado em pedaços menores e posteriormente limpos em um processo mecânico de raspagem (ANDRADE *et al.*, 2002). Há estudos, como o realizado por LITTLE e colaboradores (2005), que revelam a presença de bactérias no aparelho bucal da formiga, capazes de sintetizar antibióticos contra patógenos, dessa forma, o contato do material vegetal cortado com o aparato bucal da formiga induz a produção de metabólitos secundários que protegem o fungo simbiote. Após a limpeza os fragmentos de folhas são regados com líquido fecal das operárias, que contém várias enzimas que auxiliam na degradação inicial de proteínas e polissacarídeos do substrato. Após essa preparação, o substrato é depositado e inoculado junto a um pequeno micélio do fungo simbiote (ANDRADE *et al.*, 2002). A partir de então se inicia a produção de nutrientes de reserva utilizados pelo fungo e pela própria formiga.

O voo nupcial é o principal evento do formigueiro, em que as rainhas virgens aladas (*i.e.* içás) alcançam altas altitudes e são inseminadas por diversos machos. As rainhas, então, descem ao solo para selecionar o local do ninho (FOWLER, 1987), geralmente locais de vegetação menos densas. Em seguida, retiram suas próprias asas e escavam um pequeno buraco, que pode variar de 8,5 a 18 cm de profundidade, jogando a terra escavada na forma de pelotinhas para a superfície. Inicia-se a construção da primeira câmara, de formato esférico e paredes lisas (DELLA LUCIA *et al.*, 1993). É nessa câmara que a rainha inocula a pequena porção do fungo, trazido do ninho mãe, alojada em sua cavidade infrabucal, que, depois de cultivado, alimentará o novo saubeiro (MARICONI, 1970).

Em três dias, o micélio do fungo começa a crescer e a rainha terá colocado seus primeiros ovos. Até o final da segunda semana, os ovos e o jardim de fungos estarão separados, mas passado esse período, quando mais de 20 ovos estão presentes e a massa fúngica já é dez vezes maior que seu tamanho original, ovos, ovos tróficos e jardim de fungos são colocados juntos.

Até o surgimento das primeiras operárias, o cultivo do jardim de fungo é realizado pela rainha, que em intervalos de aproximadamente uma hora, retira um pequeno fragmento da extremidade do fungo, curva seu abdômen e deposita nele uma gota de fluido fecal, recolocando o fragmento micelial tratado no jardim de fungo. Nesse período, a rainha, aparentemente, não se alimenta do fungo simbiote,

sobrevivendo do catabolismo da gordura do seu corpo (AUTUORI, 1941 apud BUENO, 2002).

As primeiras operárias começam a alimentar as larvas irmãs com os ovos tróficos (*i.e.*, ovos não fecundados destinados à alimentação), cultivam o fungo simbiote e, em aproximadamente uma semana após seu nascimento, as primeiras operárias escavam o canal de entrada obstruído e iniciam o forrageamento nas proximidades do ninho.

Os materiais vegetais introduzidos no ninho são fragmentos cortados, amassados e depositados no jardim de fungos. Sobre o substrato vegetal assim preparado, são inoculadas porções dos micélios adjacentes, que originarão mais massa fúngica e assim sucessivamente (AUTUORI, 1949; WEBER, 1966; QUINLAN, e CHERRETT, 1977 apud CARLETTI, 2005).

Outro importante comportamento que ocorre no ninho são as interações sociais, em especial a trofalaxia, comumente presente em insetos sociais, tais como abelhas, vespas e cupins. A trofalaxia oral, comumente realizada, consiste na transferência oral de alimento de um indivíduo a outro e durante essa transferência também são passados componentes sintetizados pelo próprio inseto, que ficam estocado na glândula pós faríngea. Durante o *grooming* (comportamento em a formiga realiza limpeza de seu corpo ou de outro indivíduo) essas substâncias podem ser espalhadas pela superfície do corpo, promovendo o reconhecimento de indivíduos de uma mesma colônia (MOREIRA, 2007).

Naug & Camazine (2002) citam alguns exemplos onde foi comprovada a transferência de patógenos durante a trofalaxia, como o vírus que causa paralisia e esporos de fungo que causam doenças na prole de abelhas (BAILEY & GIBBS, 1964 apud NAUG & CAMAZINE, 2002).

Simbiose tripartida

Até o final do século 20 acreditava-se que a simbiose envolvesse apenas dois tipos de organismos: a formiga e seu fungo cultivado, caracterizando uma simbiose bipartida. No entanto trabalhos descrevendo os ninhos dessas formigas revelaram, na verdade, uma simbiose tripartida entre a formiga, o fungo cultivado e uma bactéria que combate ações parasitárias contra o fungo cultivado (CURRIE *et al.*, 2003).

Apesar de algumas diferenças entre os fungos cultivados de Attini basais e derivadas ambos apresentam um problema em comum: o parasitismo por microrganismos oportunistas, que incluem bactérias, microrganismos detritívoros e até outros fungos, sendo o mais conhecido pertencente ao gênero *Escovopsis* (Hypocreaceae: Hypocreales). O terceiro organismo que participa dessa simbiose tripartida apresenta um importante papel na manutenção da colônia, são as bactérias capazes de proteger o fungo simbiote contra os patógenos oportunistas (POULSEN et al., 2001; CURRIE et al., 2003).

Fungo simbiote de *Atta sexdens* – *Leucoagaricus gongylophorus*

Os primeiros trabalhos de descrição do fungo simbiote presentes em colônias de Attini não chegaram a uma identificação dos mesmos, pois foi constatado que esses se encontravam na forma vegetativa, e como a taxonomia de fungos era baseada em caracteres de morfologia reprodutiva a identificação era imprecisa (ANGEI-PAPA & EYMÉ, 1979, 1985 apud BONAZZA, 2000). Foram necessários outros trabalhos que induzissem o crescimento de estruturas reprodutivas desses fungos em laboratório, e ao comparar esses trabalhos o fungo simbiote foi identificado como *Leucoagaricus gongylophorus*, nomenclatura aceita até hoje para as espécies *Atta* sp. e *Acromyrmex* sp. (SINGER, 1986 apud BONAZZA, 2000).

As Attini vivem em simbiose obrigatória com o fungo *Leucoagaricus*, que disponibiliza nutrientes e enzimas para as formigas, enquanto que essas fornecem diversos substratos ao fungo. O material vegetal disponibilizado pelas cortadeiras é desinfetado e cortado, sendo inoculado junto ao fungo em câmaras, para compor o assim chamado, “jardim fúngico” (WEBER, 1972). No estágio vegetativo o fungo produz hifas espessas, denominadas de gongilídeos, que são agrupadas em cachos, conhecido como estáfilos, onde são armazenados os nutrientes de reserva do fungo.

Por meio de observações, acreditava-se que as formigas cortadeiras obtinham a maior parte de seu alimento a partir da seiva do material vegetal cortado e complementavam sua dieta ingerindo parte do micélio do fungo cultivado. No entanto, SILVA e colaboradores (2003) constataram que grande parte da dieta das formigas é obtida pela ação metabólica dos fungos. Operárias de *Atta sexdens* foram

mantidas em laboratório onde a única fonte de substrato era folhas, micélio do fungo ou fungo simbiote junto às folhas. Foi observada uma maior taxa de sobrevivência na presença do fungo junto às folhas em relação aos outros dois tratamentos. Quando em associação, *L. gongylophorus* é capaz de degradar polissacarídeos do material vegetal em pequenos carboidratos, que são consumidos pelas formigas.

Foi observado que, em Attini derivadas, as iças deixam os ninhos carregando uma amostra do fungo simbiote, são fecundadas durante o “voo nupcial”, e então fundam um novo ninho (WEBER *et al.*, 1972), evidenciando uma transmissão vertical do fungo pelas formigas. A transmissão horizontal ocorre normalmente em Attini basais, como proposto por Mueller e colaboradores (1988), mas já foram relatados casos de transferências horizontais em algumas derivadas vivendo no Estado de São Paulo (SILVA-PINHATI *et al.*, 2004) e ainda por indução experimental em laboratório (BOT *et al.*, 2001).

Pseudonocardia

Há muito se sabe do mutualismo entre as formigas cortadeiras e seus fungos simbiotes com um terceiro microrganismo dessa simbiose tripartida: a bactéria (CURRIE *et al.*, 2003). Entre essas bactérias, o gênero *Pseudonocardia* foi o mais amplamente estudado. Essa bactéria habita o tegumento da formiga e se acredita que seja capaz de produzir um antibiótico de espectro restrito ao fungo parasita *Escovopsis*. (CURRIE *et al.*, 2003, CAFARO *et al.*, 2005 apud SEN *et al.*, 2009).

Acredita-se que relação antagonista entre *Pseudonocardia* e *Escovopsis* seja uma coevolução, baseada em observações realizadas ao longo de vários trabalhos. Poulsen e colaboradores (2005) observaram que somente uma linhagem de *Pseudonocardia* é encontrada no interior de cada ninho. Currie e colaboradores (1999) confirmaram a transmissão vertical da bactéria, a produção de metabólitos secundários que promovem o crescimento do fungo cultivado, e a produção bacteriana de um antibiótico específico contra o fungo *Escovopsis*. As observações desses trabalhos apontariam para uma forte relação coevolutiva antagonista entre *Pseudonocardia* e *Escovopsis*.

No entanto, SEN e colaboradores (2009) questionaram essa coevolução, apresentando algumas contraprovas: como a descoberta, em diferentes formigas

Attini, de mais de uma linhagem de *Pseudonocardia* no tegumento de operárias em um mesmo ninho; evidências dessa bactéria em machos, indicativo de que a transmissão dessa bactéria não ocorre unicamente de maneira vertical; ação de antibióticos não específicos contra *Escovopsis*; e a produção de metabólitos, por parte de *Pseudonocardia*, que inibiam o crescimento do fungo simbiote.

Parasitas

Microrganismos competitivos, detritívoros ou saprofitos, como fungos e bactérias, podem infectar a colônia. São patógenos mais generalistas, podendo ser combatidas pelo comportamento de limpeza apresentado pelas formigas ou pela produção de antibióticos da bactéria *Pseudonocardia*, dessa forma a permanência desses parasitas não chegam a causar grandes danos à colônia (CURRIE, 1999).

Acreditava-se que as Attini eram capazes de manter seu jardim de fungos em condições axênicas (MÖLLER, 1941 apud RODRIGUES, 2004). Entretanto, uma diversidade de fungos parasitos pode ser encontrada nas câmaras de fungos, como os pertencentes ao gênero *Trichoderma*, *Fusarium* ou *Syncephalastrum* (RODRIGUES, 2005; RODRIGUES, 2008), sendo *Escovopsis* o mais bem estudado (CURRIE *et al.*, 1999). É um fungo especialista, somente encontrado no jardim de fungos de Attini (SEIFERT, 1995; MUCHOVEJ, 1990 apud CURRIE, 1999), capaz de parasitar o micélio de *Leucoagaricus* spp. Os mecanismos de contaminação por esse parasito ainda são desconhecidos, no entanto sabe-se que ele apresenta altos índices de infestação e mortalidade, podendo conduzir o formigueiro a morte.

Sabe-se que *Escovopsis* compartilha uma antiga história evolutiva com as formigas cortadeiras e seu fungo simbiote, e que diferentes linhagens de *Escovopsis* são encontradas nos diferentes grupos dentro de Attini, indicando uma propensão de certas linhagens de fungo para com grupos específicos de formigas (CURRIE *et al.*, 2003). Essa especificidade é indicativa de uma filogenia congruente entre *Escovopsis* e o fungo simbiote de cortadeiras, no entanto isso não ocorre. Foi evidenciado que linhagens de *Escovopsis* de Attini mais primitivas estão relacionadas com *Escovopsis* de Attini derivadas, sugerindo que ao longo da evolução desses dois organismos ocorreram diversas transferências entre linhagens de *Escovopsis* de várias Attini (GERARDO *et al.* 2006). Outra evidência dessa incongruência é o fato das formigas *Atta* e *Acromyrmex*, muitas vezes,

compartilharem linhagens semelhantes, ou em alguns casos idênticas, de *Escovopsis* (TAERUM *et al.*, 2007).

Até o momento poucas espécies foram descritas, sendo a primeira, *Escovopsis weberi*, realizada por Muchovej & Della Lucia (1990), isolada de um ninho de *Atta* no Brasil. Posteriormente Seifert *et al.* (1995) descreveram uma outra espécie isolada de *Trachymyrmex ruthae* em Trinidad, *Escovopsis aspergilloides*. Muitas outras espécies ainda aguardam descrição.

Outros microrganismos presentes em ninhos de Attini

O interior dos jardins de fungos é propício ao desenvolvimento de outros microrganismos, e vários estudos apontam para existência de uma vasta microbiota. Existência de leveduras já foi apontada em várias espécies de *Atta* e *Acromyrmex* (PAGNOCCA *et al.*, 1996, CRAVEN *et al.*, 1970 e CARREIRO *et al.*, 1997 apud RODRIGUES, 2004). Diversas bactérias também haviam sido isoladas de ninhos dessa cortadeiras.

Bacci e colaboradores (1995) haviam demonstrado que bactérias isoladas de ninhos de *Atta sexdens rubropilosa* eram capazes de degradar biopolímeros provenientes do substrato vegetal cortado, assim como algumas espécies de leveduras (CARREIRO, 2000). Ambos trabalhos entendem essa atividade degradativa como um auxílio ao fungo simbiote na degradação do substrato vegetal.

Outros trabalhos vêm evidenciando que esses outros microrganismo não são apenas contaminantes do jardim de fungos, como a muito se acreditava (WEBER, 1955; POULSEN *et al.*, 2006), mas alguns podem exercer importantes funções na simbiose entre a formiga e seu fungo cultivado.

Mesoplasma

Entre as bactérias recém-descobertas, foi detectada em nosso laboratório uma linhagem do gênero *Mesoplasma* (Bacteria; Tenericutes; Mollicutes; Entomoplasmatales; Entomoplasmatacea) infectando algumas espécies de formigas da tribo Attini.

A existência de microrganismos procariotos, sem parede celular (Mollicutes) associado à superfície de plantas e em insetos foi primeiramente observada por

Clark (1977), posteriormente, outros trabalhos evidenciaram essa presença (DAVIS, 1978; CLARK et al., 1986; TULLY et al., 1994 apud GASPARICH, 2004). A partir dessas observações iniciou-se a investigação a respeito da ecologia de Mollicutes associado a plantas, e sua possível relação com insetos (TULLY et al., 1989; WEISBURG et al., 1989; ROSE et al., 1990; GASPARICH et al., 2004.). Clark e colaboradores (1986) especularam a respeito dos possíveis mecanismos de transmissão de plantas para insetos, acreditando que é através da alimentação que essa transmissão ocorra. Outros pesquisadores se propuseram a revisar a taxonomia de Mollicutes, antigamente baseada em caracteres morfológicos e de acordo com suas necessidades nutricionais. Weisburg e colaboradores (1989) realizaram análise genética da região 16 S rRNA de 47 linhagens de Mollicutes, resultando em uma nova organização desses microrganismos. Tully e colaboradores (1990), ao realizar sua revisão taxonômica, propuseram a introdução de uma nova família à ordem Entomoplasmatales, Entomosplamataceae, onde se encontra o gênero *Mesoplasma*.

Van Borm e colaboradores (2002) propuseram analisar e documentar toda a diversidade de microrganismos associados à *Acromyrmex octospinosus*. Entre os microrganismos isolados foram encontrados duas espécies de *Mesoplasma*, *M. entomophilum* e *M. florum*.

Algumas espécies de *Mesoplasma*, como *M. seiffertii*, encontrado na superfície de algumas plantas, podem ser patológicas tanto para a planta quanto para vertebrados, inclusive o ser humano. Portanto a capacidade dessas bactérias utilizarem de insetos, tão abundante quanto saúvas, como vetor para sua propagação é, no mínimo, preocupante.

OBJETIVO

Realizar análise quantitativa da ocorrência de infecção por *Mesoplasma* sp. nas diferentes castas da formiga Attini *Atta sexdens*.

MATERIAL E MÉTODOS

Coletas

As formigas foram coletadas na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” no município de Rio Claro. A coleta foi realizada em um ninho, nas proximidades do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), a 22,39511 ° de latitude sul e 47,54237 ° de longitude oeste.

Durante a coleta, foi utilizada uma pinça esterilizada, periodicamente lavada com álcool 70 % entre as capturas, a fim de se minimizar a contaminação entre indivíduos. O armazenamento das formigas foi realizado em frascos individuais contendo álcool 90 % a -20 ° C até o momento da extração de DNA total.

Foram coletados 19 bitus no dia 16 de Setembro de 2009, antes do voo nupcial, quando se encontravam na superfície do ninho. Nos dias 18 e 19 de Setembro de 2009, 20 içás foram coletadas após o voo nupcial. As 50 operárias e os 20 soldados foram coletados ao longo do mês de Janeiro de 2010, no mesmo ninho onde foram coletados os bitus e as içás.

Extração de DNA total

A extração de DNA foi realizada com a formiga inteira, no caso das operárias, soldados e machos. Devido ao seu tamanho, as rainhas foram separadas em cabeça, pernas e mesossoma (*i.e.* tórax fundido ao primeiro segmento abdominal) . A extração do gaster não pôde ser concretizada devido à grande quantidade de corpo gorduroso presente.

A extração de DNA seguiu Martins e colaboradores (2007). A qualidade da extração foi verificada em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídeo ou Gel Red (Biotium) e a quantificação foi realizada utilizando NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific).

Amplificação e purificação da região 16 S de rDNA

Para a detecção da possível presença de *Mesoplasma* sp., o DNA total extraído foi submetido a reação de amplificação de um fragmento de aproximadamente 500 pb da região 16 S de rDNA de Mollicutes.

As reações de PCR foram realizadas em tubos de 200 µL, ao qual foram adicionados tampão de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 X, 1,5 mM de MgCl_2 , 200 µM de dNTPs, 1 U de Taq Polimerase (Fermentas), 5 pmol de cada *primer* (MolliF: 5' – TGGCGAACGGGTGAGTAACACGTATCT e MolliR: 5' – ATGTATTACCGCGGCTGCTGGCACAT) e cerca de 10 ng de DNA *template*, em um volume final de 30 µL. A reação de amplificação iniciava-se com uma temperatura de desnaturação de 95 ° C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos que se consistiam de desnaturação a 95 ° C por 1 minuto, anelamento a 57 ° C por 1 minuto e extensão a 72 ° C por 3 minutos.

A fim de se assegurar que a reação de amplificação não tenha sofrido contaminação foi realizado teste com controle negativo, que continha todos os componentes da PCR exceto *template*, o qual foi substituído por água ultra pura. O controle positivo, constituído dos mesmos componentes de PCR, possuía como *template* uma amostra que continha *Mesoplasma* sp., garantindo o sucesso da amplificação.

O resultado das amplificações foi averiguado pela presença de uma banda de cerca de 500 pares de base, em gel de agarose 1 %, corado com GelRed.

Sequenciamento

Para confirmação da presença de *Mesoplasma* sp., 8 amostras que apresentaram a banda esperada foram submetidas à reação de sequenciamento. Para tanto, os produtos amplificados foram purificados utilizando-se o kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), seguindo-se as recomendações do fabricante, sendo posteriormente quantificados em NanoDrop 2000.

As reações de sequenciamento foram montadas utilizando-se BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems), sendo 2 µL de premix, 2 µL de tampão de diluição, 10 ng do produto de PCR purificado e 3,2 pmol de *primer*,

em volume final de 10 μ L. O termociclador executou um programa de 2 minutos a 96 ° C, seguido de 28 ciclos de 96 ° C por 45 segundos, 50 ° C por 30 segundos e 60 ° C por 4 minutos. Em seguida, a reação de sequenciamento foi purificada pelo método de precipitação Etanol/EDTA/Acetato de Sódio. Os produtos obtidos foram sequenciados utilizando sequenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems).

As sequências obtidas foram editadas com o programa BioEdit 7.0.5 e comparadas às sequências depositadas no banco de dados GenBank, utilizando a ferramenta BLASTN.

Cálculo da porcentagem de infecção

Calculou-se a porcentagem de infecção por *Mesoplasma* sp. nas castas de *Atta sexdens*. Para isso foi utilizado a fórmula:

$$P = (X/N) \times 100,$$

onde P representa a porcentagem de indivíduos contaminados em cada casta, X corresponde ao número de indivíduos contaminados, por casta (*i.e.* após a PCR apresentaram a banda próxima aos 500 pares de base) e N ao número total de indivíduos da casta.

Para verificar se havia diferenças entre as porcentagens de infecção nas diferentes castas utilizamos o teste qui quadrado (χ^2) para proporções:

$$\chi^2 = \sum [(o-e)^2/e],$$

em que o é a frequência de infecção observada para cada casta, e é a frequência esperada de infecção para cada casta. Teste foi realizado a um nível de significância de 5 % ($\alpha = 0,05$). A correção de *Yates* foi empregada ao teste quando se compara duas categorias (*i.e.* duas castas), utilizando a fórmula:

$$\chi^2 = \sum [(o-e-0,5)^2/e],$$

em que 0,5 corresponde a correção de *Yates*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Extração

Devido ao seu grande tamanho, as içás foram fracionadas em cabeça, mesossoma, gaster e pernas. No entanto, a presença de uma grande quantidade de corpo gorduroso no gaster comprometeu a qualidade da extração de DNA. Sendo assim, essa parte do corpo não foi utilizada nas análises posteriores. Para a extração do DNA total das demais castas, cujo indivíduos são de menor tamanho, utilizou-se dos indivíduos inteiros.

Após o processo de extração, realizou-se a quantificação de DNA em NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) (apêndices A a D) e a visualização do produto extraído foi feita em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídeo ou GelRed. As figuras 1 a 4 mostram alguns exemplos dos resultados obtidos.

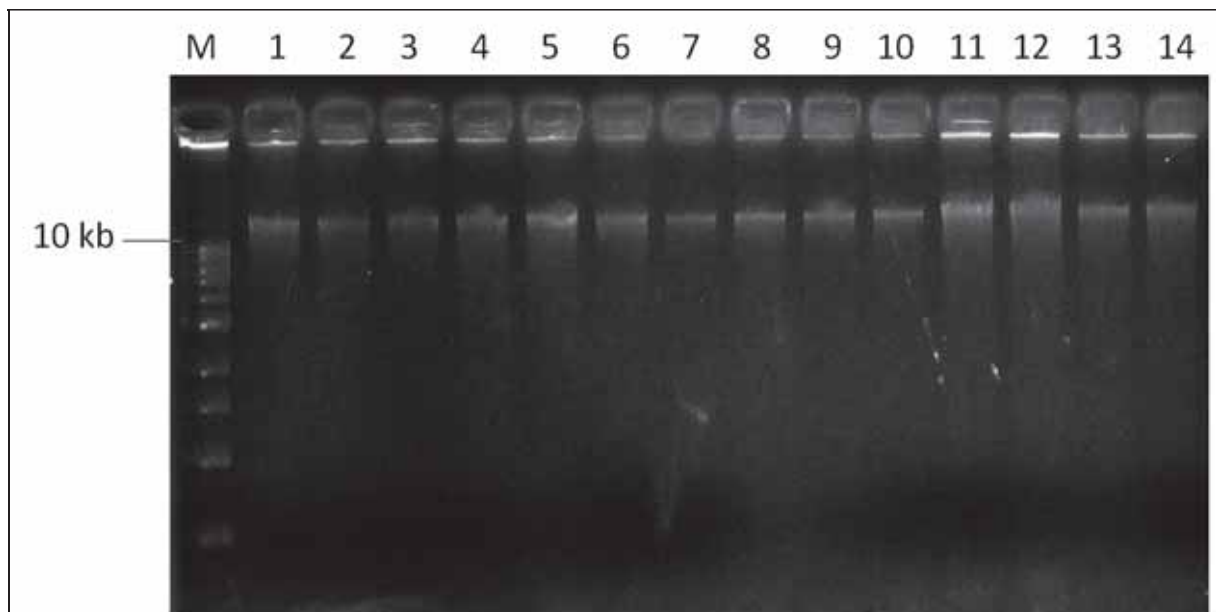


Figura 1: Gel de agarose 1 % corado com brometo de etídeo, mostrando extrações de DNA de operárias. A presença de bandas acima de 10 kb indica o sucesso da extração do DNA total. M: marcador de peso molecular. 1 – 14 operárias.

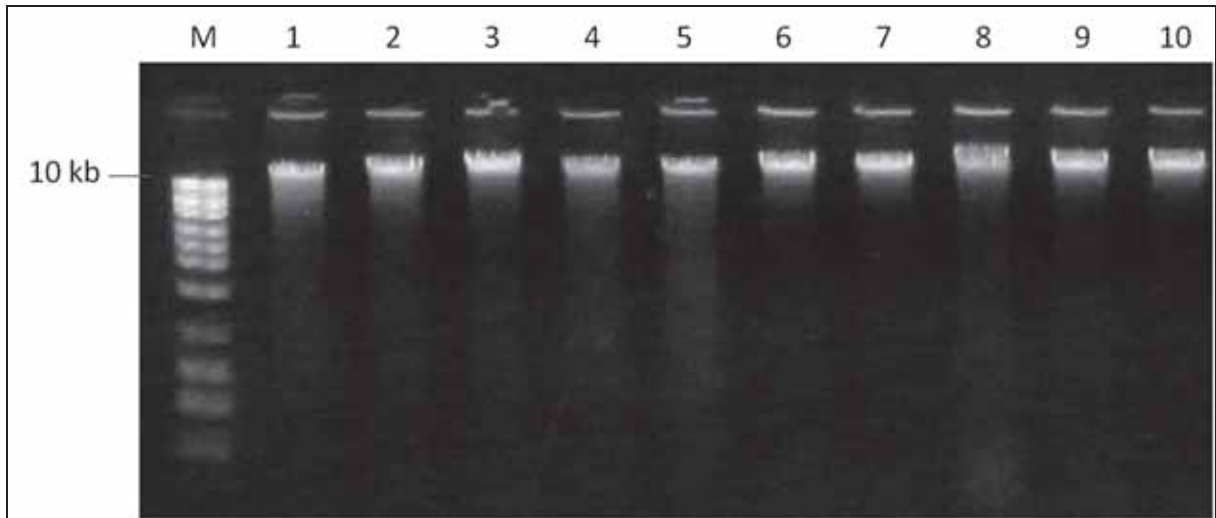


Figura 2: Gel de agarose 1 % corado com brometo de etídeo, mostrando extrações de DNA de soldados. A presença de bandas acima de 10 kb indica o sucesso da extração do DNA total. M: marcador de peso molecular. 1 – 10: soldados.

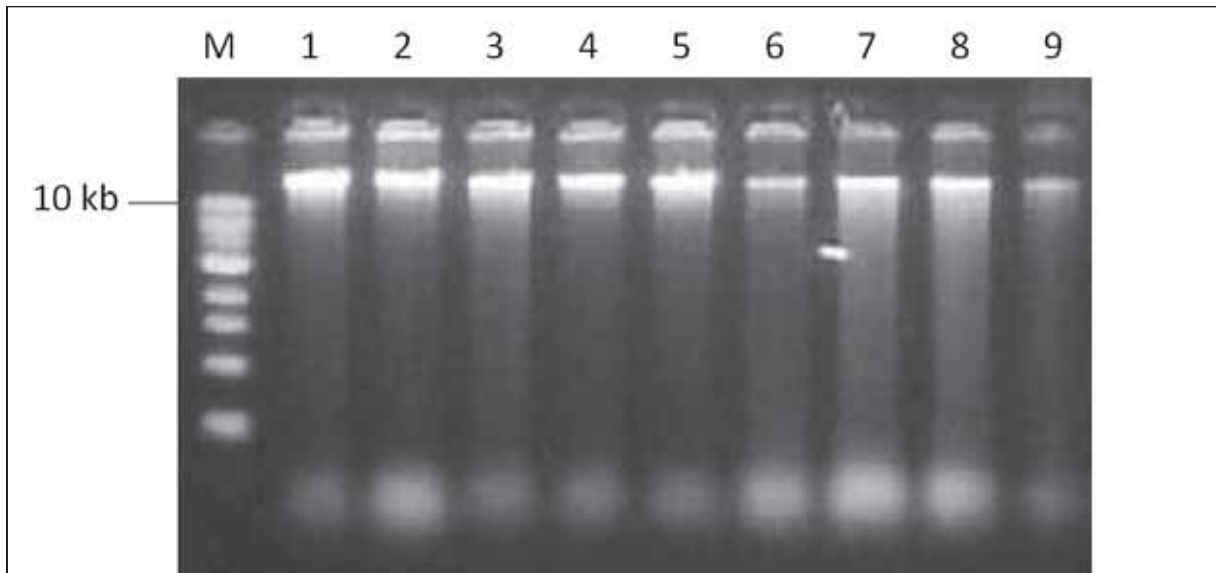


Figura 3: Gel de agarose 1 % corado com brometo de etídeo, mostrando extrações de DNA de rainhas. A presença de bandas acima de 10 kb indica o sucesso da extração do DNA total. M: marcador de peso molecular. 1 – 9: cabeça, mesossoma e pernas das rainhas 1 a 3.

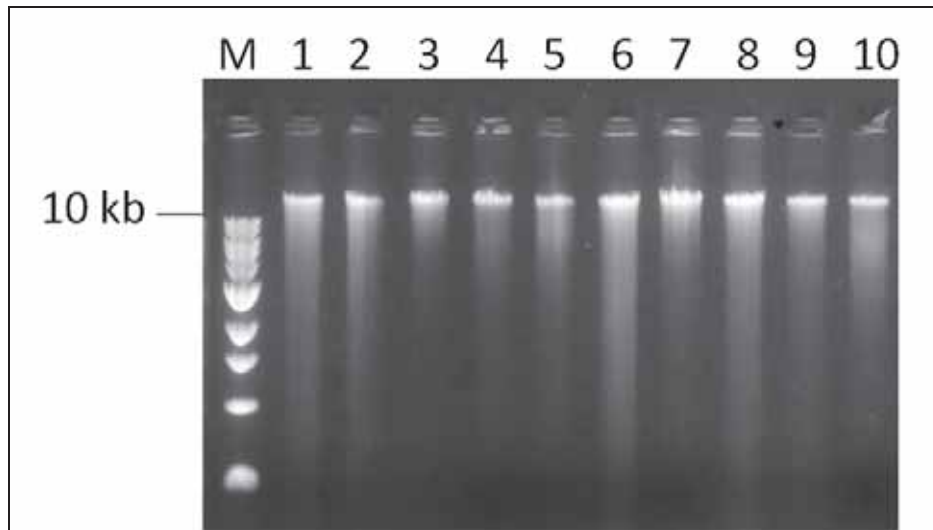


Figura 4: Gel de agarose 1 % corado com brometo de etídeo, mostrando extrações de DNA de machos. A presença de bandas acima de 10 kb indica o sucesso da extração do DNA total. M: marcador de peso molecular. 1 – 10: machos.

Detecção de *Mesoplasma sp.* em amostras de formigas

Para identificar a possível presença de *Mesoplasma sp.* associadas às amostras de *Atta sexdens* coletadas no presente trabalho, utilizamos extratos de DNA total dessas formigas, que poderiam ou não estar contaminadas com DNA bacteriano, como *template* em reações de PCR, usando *primers* específicos para a classe Mollicutes.

Os resultados podem ser observados nas figuras 5 a 8.

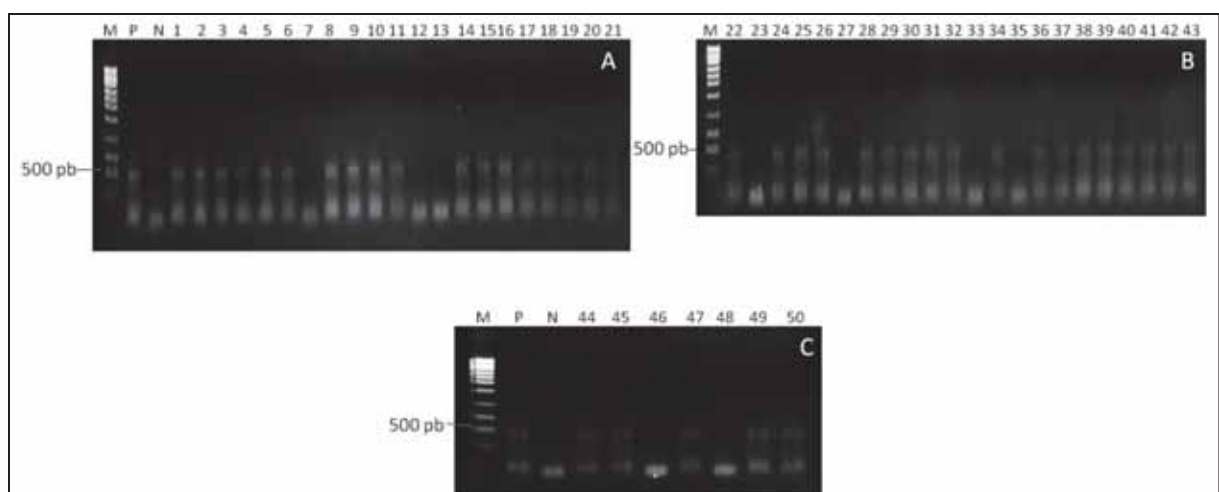


Figura 5: Gel de agarose 1 % corado com GelRed, mostrando os resultados da amplificação do fragmento 16 S do rDNA de *Mesoplasma sp.* A banda em torno de 500 pb é indicativa dessa presença. M: marcador de peso molecular de 1 kb. P: controle positivo. N: controle negativo. (A) 1 – 21: operárias 1 a 21. (B) 22 – 43: operárias 22 a 43. (C) 44 – 50: operárias 44 a 50.

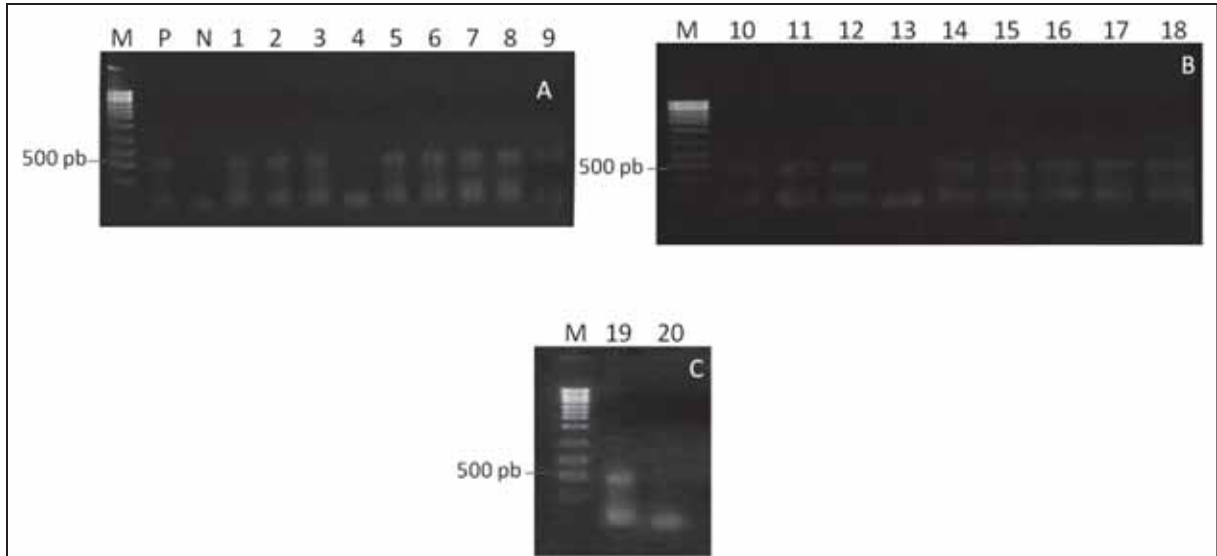


Figura 6: Gel de agarose 1 % corado com GelRed, mostrando os resultados da amplificação do fragmento 16 S do rDNA de *Mesoplasma* sp. A banda em torno de 500 pb é indicativa dessa presença. M: marcador de peso molecular de 1 kb. P: controle positivo. N: controle negativo. (A) 1 – 9: soldados 1 a 9. (B) 10 – 18: soldados 10 a 18. (C) 19 e 20: soldados 19 e 20.

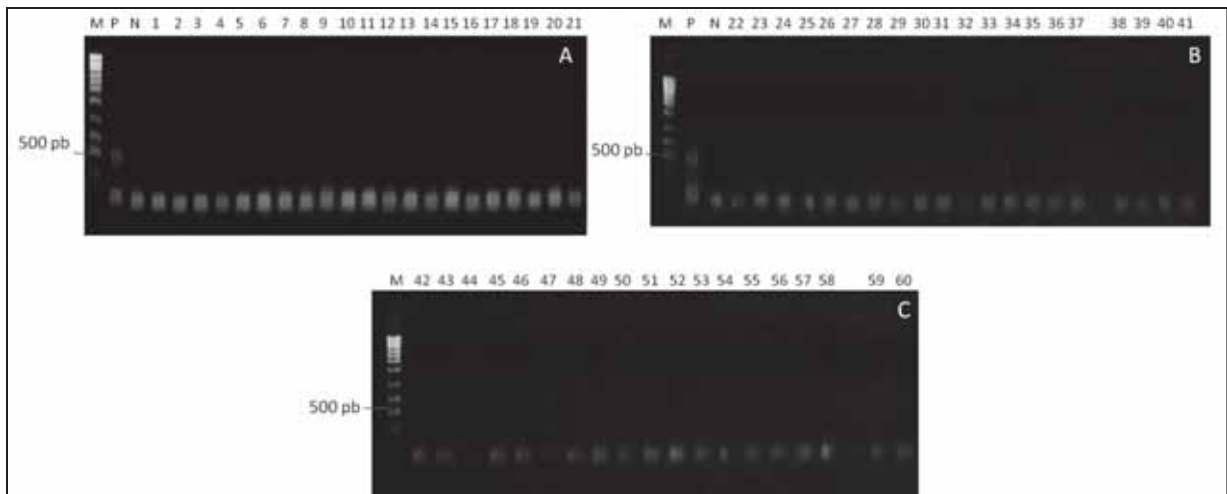


Figura 7: Gel de agarose 1 % corado com GelRed, mostrando os resultados da amplificação do fragmento 16 S do rDNA de *Mesoplasma* sp. A banda em torno de 500 pb é indicativa dessa presença. M: marcador de peso molecular de 1 kb. P: controle positivo. N: controle negativo. (A) 1 – 21 : cabeça, mesossoma e pernas das rainhas 1 a 7. (B) 22 – 39: cabeça, mesossoma e pernas das rainhas 8 a 13. 40: cabeça da rainha 14. 41: mesossoma da rainha 14. (C) 42: pernas da rainha 14. 43 – 60: cabeça, mesossoma e pernas das rainhas 15 a 20.



Figura 8: Gel de agarose 1 % corado com GelRed, mostrando os resultados da amplificação do fragmento 16 S do rDNA de *Mesoplasma* sp. A banda em torno de 500 pb é indicativa dessa presença. M: marcador de peso molecular de 1 kb. P: controle positivo. N: controle negativo. 1 – 19: macho 01 a 19.

Sequenciamento

Utilizamos os *amplicons* obtidos e posteriormente na reação de sequenciamento, a fim de confirmar a presença de *Mesoplasma* sp. Das 8 bandas inicialmente propostas, 5 foram sequenciadas com sucesso, sendo elas Operária 02, Operária 09, Operária 14, Operária 25 e Soldado 12 (Apêndice E a I).

As sequências obtidas foram editadas no BioEdit e alinhadas com outras sequências recuperadas do banco de dados GenBank utilizando a ferramenta BLASTN. Todas as sequências apresentaram uma identidade superior a 91 % com *Mesoplasma lactucae* (gb AF303132) (figura 9).

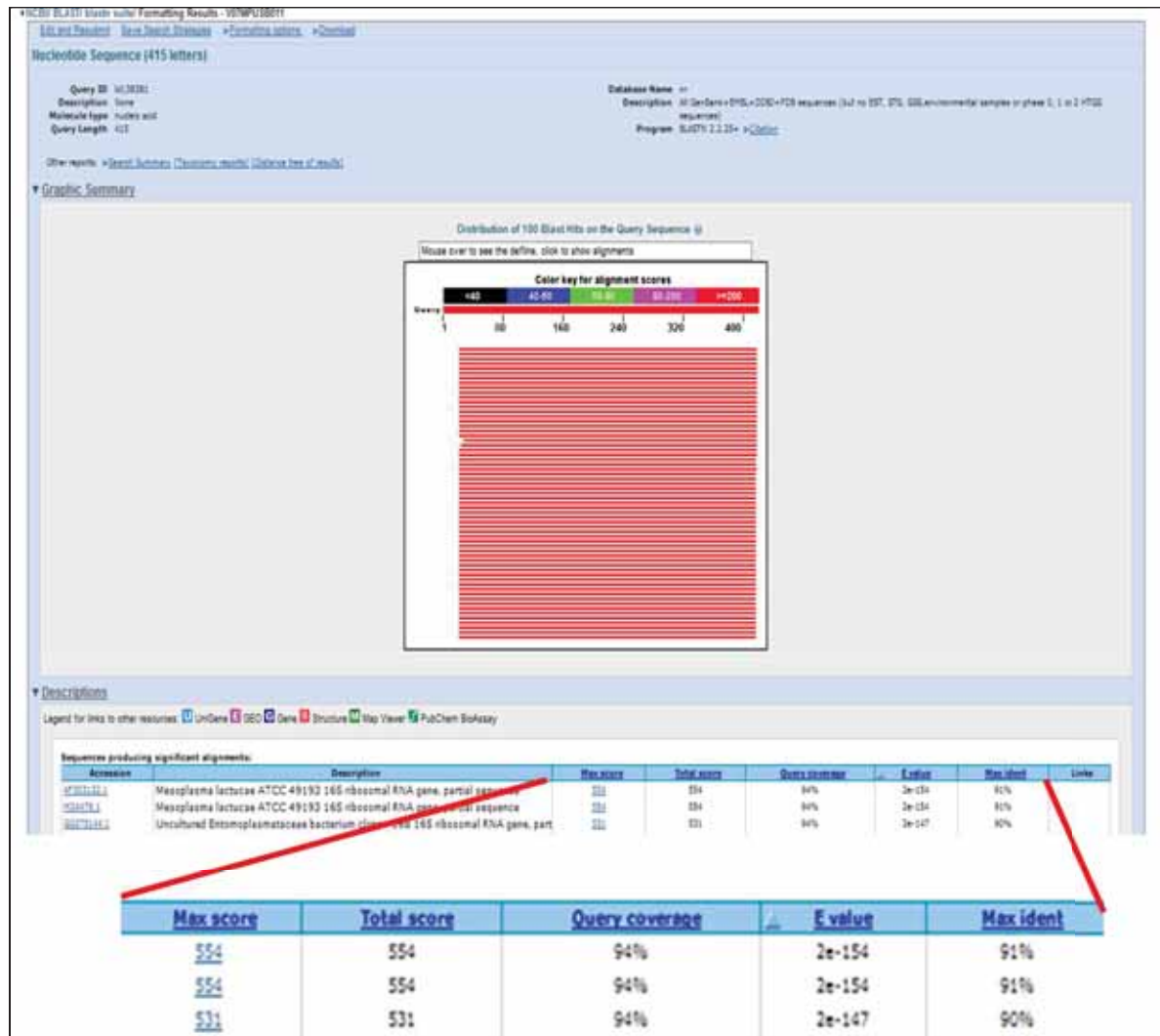


Figura 9: Resultado de BLASTN da sequência operária 02 mostrando sua alta similaridade com a sequência de *M. lactucaes* recuperada do banco de dados GenBank.

Infecção por *Mesoplasma* sp.

Calculou-se a percentagem de infecção por *Mesoplasma* sp. em cada casta de *Atta sexdens*. Os resultados obtidos podem ser visualizados na figura 10.

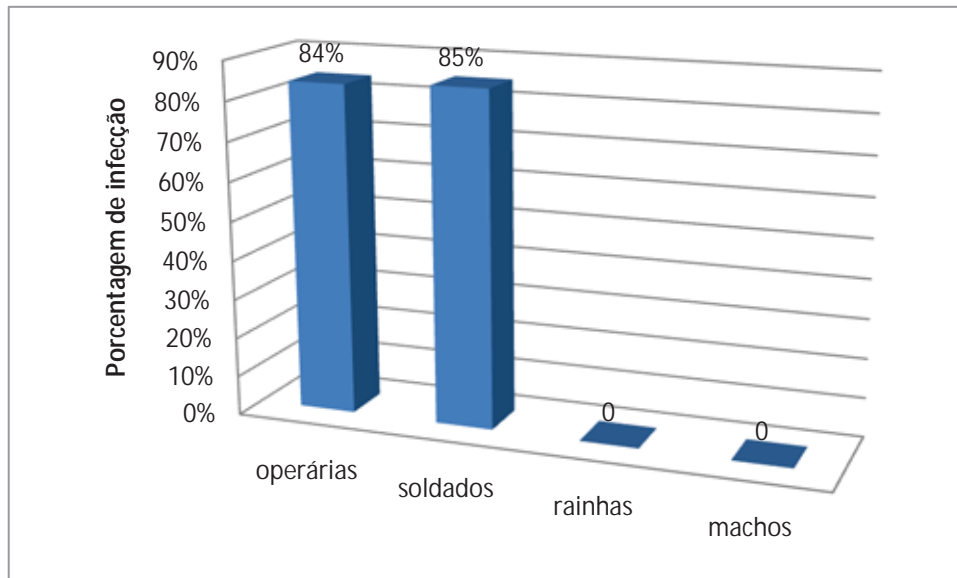


Figura 10: Gráfico mostra as percentagens de infecção por *Mesoplasma* sp. nas diferentes castas de *Atta sexdens*.

Podemos observar a prevalência de *Mesoplasma* sp. nas castas de operárias e soldados, 84 % e 85 %, respectivamente, em detrimento de içás e bitus, onde não foi possível detectar a presença da bactéria. A fim de compararmos se a infecção de *Mesoplasma* sp. é equivalente entre as castas, realizou-se teste qui quadrado para proporções, a nível de significância de 0,05 ($\alpha = 0,05$), concluindo que há diferença estatística entre as quatro castas ($\chi^2_{\text{calculado}} = 72,74$; GL= 3). O mesmo teste estatístico foi empregado a fim de se averiguar a existência de diferença na percentagem de infecção entre soldados e operárias, acrescido da correção de Yates. Conclui-se que há diferença estatística entre essas duas castas ($\chi^2_{\text{calculado}} = 26,71$; GL=1).

É importante observar que durante o processo de extração de DNA em rainhas, a região do gaster foi removida por apresentar uma grande quantidade de corpo gorduroso, o qual atrapalhava a realização da extração. Diversos autores citam a presença de Mollicutes no intestino em diversos insetos (TULLY, 1987; TULLY, 1988; ROSE, 1990; WILLIAMSON, 1997; FLETCHER, 1998; GASPARICH, 2004). Dessa forma, a ausência de *Mesoplasma* sp. nas amostras de rainhas,

provavelmente, deveu-se a metodologia empregada durante a extração de DNA. Seria necessária a utilização de outros protocolos capazes de promover a extração de DNA do gaster a fim de se realizar a PCR dessa parte do corpo.

Esses mesmos trabalhos assumem que a infecção do inseto vetor ocorre na alimentação. Fletcher e colaboradores (1998) descrevem o ciclo de transmissão de *Spiroplasma citri* (Tenericutes: Mollicutes) em Cicadellidae. Durante a alimentação, *S. citri*, presente no floema da planta infectada, entra no intestino e passa para a hemocele, onde ocorre sua multiplicação. O parasita, então, atravessa a parede do trato intestinal, atingindo a hemolinfa e encaminha-se para as glândulas salivares. Enquanto a cigarrinha perfura o floema para se alimentar, *S. citri* infecta a nova planta hospedeira. No caso das operárias de *Atta sexdens*, estas se alimentam essencialmente de metabólitos fornecidos pelo fungo, sendo assim a infecção por *Mesoplasma* sp. não ocorreria. Porém, a formiga entra em contato com a seiva durante o forrageamento e corte das folhas. Dessa forma, a infecção de operárias dar-se-ia nesse momento.

Os soldados não apresentam o hábito de cortar folhas e quando o fazem, realizam esse comportamento com baixa frequência (FOWLER & ROBINSON, 1979). A presença de *Mesoplasma* sp. em soldados pode ser explicada por um comportamento comumente realizado por formigas e outros insetos sociais, a trofalaxia. Durante esse comportamento, as operárias repassam junto com o alimento compostos sintetizados pelo próprio inseto, que ficam estocados na glândula pós faringiana (MOREIRA, 2007). Juntamente com esses compostos e alimentos pode ocorrer a transmissão da bactéria de operária para soldado e vice-versa. Outros trabalhos já haviam constatado essa forma de transmissão. Em abelhas, a doença da prole (conhecida como cria pútrida), causada por *Paenibacillus larvae*, ocorre quando uma adulta infectada transmite o esporo do parasita via trofalaxia para outro indivíduo que realiza o cuidado com a prole (BAILEY & GIBBS, 1964 apud NAUG & CAMAZINE, 2002). Sendo assim, é possível explicar a contaminação dos soldados através da realização da trofalaxia com uma operária contaminada e sob essa luz, podemos entender as altas taxas de infecção entre essas castas.

Ao final desse trabalho algumas dúvidas foram levantadas como o local de alojamento deste parasito, quais possíveis alterações sua presença poderia causar

em seus hospedeiros e como ocorreria sua disseminação. Para isso, se faz necessário a elaboração de mais trabalhos a respeito da biologia dessa bactéria.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho teve como objetivo determinar a taxa de infecção em *Atta sexdens* por *Mesoplasma* sp., que foi acima de 80 % em operárias e em soldados, mas zero em rainhas e em bitus. Estes resultados permitem entender alguns aspectos a respeito da interação entre formiga e bactéria e levantam questões interessantes que abrem portas para novos estudos e esclarecimentos sobre esta relação hospedeiro-parasito.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, A. P. P.; FORTI, L. C.; M OREIRA, A. A.; BOARETTO, M. A. C.; RAMOS, V. M.; MATOS, C. A. O. Behavior of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers during the preparation of the leaf substrate for symbiontfungus culture. **Sociobiology**, v.40, n.2, p.293-306, 2002.
- AUTUORI, M. *Investigação sobre a biologia da saúva*. Ciência e Cultura, v.1, n.1/2, p.4-15. 1949
- BACCI, M., 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**, v. 28, n. 1, p. 79–82, 1995.
- BONAZZA, F. **Microrganismos em jardins de fungos de formigas cortadeiras (*Atta sexdens*)**. Rio Claro, 2000. Trabalho de Conclusão de Curso - Instituto de Biociências, Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”.
- 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**, v. 55, p. 1980-1991, 2001.
- BRETON, M.; DURET, S.; ARRICAU-BOUVERY, N.; BÉVEN, L.; RENAUDIN, J. Characterizing the replication and stability regions of *Spiroplasma citri* plasmids identifies a novel replication protein and expands the genetic toolbox for plant-pathogenic spiroplasmas. **Microbiology**, v. 154, p. 3232-3244, 2008.
- BRESSAN, A.; CLAIR, D.; SÉMÉTEY, O.; BOUDON-PADIEU, E. Insect injection and artificial feeding bioassays to test the vector specificity of *Flavescence dorée* phitoplasma. **The American Phitopatological Society**. v. 96, n.7, p.790-796. 2006.
- BUENO, F. C. **Toxicidade de extratos da planta *Cedrela fissilis* Vell. para operárias de *Atta sexdens rubropilosa* FOREL (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)**. Rio Claro, 2002. Trabalho de Conclusão de Curso - Instituto de Biociências, Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”.
- CARREIRO, S. C.;PAGNOCCA, F. C., BUENO. O. C., BACCI, M.;HEBLING M. J. A.; SILVA, O. A.: Yeasts associated with nests of the leafcutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (FOREL 1908). **Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 71, p.243–248, 1997.
- CARREIRO, S. C. **Pesquisa do fator killer e análise da degradação de polissacarídeos vegetais por leveduras associadas ao ninho de *Atta sexdens***. Rio Claro, 2000. Dissertação (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”.
- CHERRETT, J. M. The biology, pest status and control of leaf-cutting ants. **Agricultural Zoology Reviews**, v. 1, p.1–37. 1986.

CLARK, T. B.; TULLY, J. G.; ROSE, D.L.; HENEGAR, R.; WHITCOMB, R. F. *Acholeplasma*s and similar nonsterol-requiring mollicutes from insects: Missing link in microbial ecology. **Current Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 11-16. 1986.

CLARK, T. B. Honeybee spiroplasmosis, a new problem for beekeepers. **American Bee Journal**. v.118, n. 23, p. 18-19. 1978.

COUTINHO, L. M. Aspectos ecológicos da saúva no cerrado – a saúva, as queimadas e sua possível relação na ciclagem de nutrientes minerais. **Boletim de Zoologia**, v. 8, p.1-9, 1984.

CURRIE, C. R. A community of ants, fungi, and bacteria: A multilateral approach to studying symbiosis. **Annual Review of Microbiology**. v. 55, p. 357-380, 2001.

CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G.; MALLOCH, D. The agricultural pathology of ant fungus gardens. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 96, n. 7, p. 7998-8002, 1999.

CURRIE, C. R., SCOTT, J.A. SUMMERBELL, R. C. MALLOCH D., D. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. **Nature**, v. 398, p. 701–704, 1999. CURRIE, C.R. A community of ants, fungi, and bacteria: A multilateral approach to studying symbiosis. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, p. 357–380, 2001.

CURRIE, C. R.; BOT, A. N. M.; BOOMSMA, J. J. Experimental evidence of a tripartite mutualism: bacteria protect ant fungus gardens from specialized parasites. **Oikos**, v. 101, p. 91–102, 2003.

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

DELLA-LUCIA, T. M.; BENTO, J. M. S. Voo nupcial ou revoada. In: DELLA-LUCIA, T. M. C. (Ed) **As formigas cortadeiras**. Viçosa: Folha de Viçosa, 1993. Cap. 6, p. 54-59.

FLETCHER, J.; WAYADANDE, A., MELCHER, U.; YE, F. The phytopathogenic Mollicute-insect vector interface: A close look. **Phytopathology**, v. 88, p. 1351-1358, 1998.

FOWLER, H. G. Colonization patterns of the leaf-cutting ant, *Atta bisphaerica*: evidence for population regulation.. **Zeitschrift fur angewandte Entomologie**, v. 104, p. 102-105, 1987.

FOWLER, H. G.; ROBINSON, W. B. Foraging by *Atta sexdens* (Formicidae: Attini) : seasonal patterns, caste and efficiency. **Ecological Entomology**, v. 4 n. 3, p. 239–247. 1979

FOWLER, H. G., DELLA-LUCIA, T. M. C.; Moreira D. D. O. Posição taxonômica das formigas cortadeiras, p.4-25. In T.M.C. Della Lucia (ed.), **As formigas cortadeiras**. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 1993, p. 262.

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 phenopyte and roots of the Mycoplasma mycoides clade. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 893-918, 2004.

GERARDO, N. M., MUELLER, U. G., CURRIE, C. R. Complex host-pathogen coevolution in the *Apterostigma* fungus-growing ant-microbe symbiosis. *BMC Evol Biol.* v. 6, p. 88–98, 2006.

LACERDA, F. G. **Manuseio do lixo de colônias de *Atta sexdens rubropilosa* e suas implicações no comportamento e na mortalidade das operárias**. Viçosa, 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências - Área de Biologia) - Universidade Federal de Viçosa.

LACERDA, F. G. Mecanismos de defesa em insetos sociais contra patógenos. **Revista Educação Meio Ambiente e Saúde**, v. 4, p. 31-50, 2009.

LITTLE, A. E. F.; MURAKAMI, T.; MUELLER, U. G.; CURRIE, C. R. Defending against parasites: fungus-growing ants combine specialized behaviours and microbial symbionts to protect their fungus gardens. **Biology Letters**, v. 2, p. 12-16, 2005.

MARICONI, F. A. M. **As saúvas**. São Paulo: Ceres, 1970. p, 167.

MARTINS, J. SOLOMON, S. E., MIKHEYEV, A. S., MUELLER, U. G., ORTIZ, A.; BACCI, M. Nuclear mitochondrial-like sequences in ants: evidence from *Atta cephalotes* (Formicidae: Attini). **Insect Molecular Biology**, v. 16, p. 777-784, 2007.

MAYHÉ-NUNES, A. J.; JAFFÉ, K. On the biogeography of Attini (Hymenoptera: Formicidae). **Ecotropicos**, 11(1), p.45-54, 1998.

MOREIRA, D. D. O.; VIANA-BAILEZ, A. M.; FERREIRA, F. F. ERTHAL JUNIOR, M.; CARRERA, F.; SAMUELS, R. I. Oral trophalaxis between *Acromyrmex subterraneus subterraneus* in mini-colonies. In: XVIII Simpósio de Mirmecologia, v. 69, São Paulo, 2007, p. 403-404.

MUELLER, U. G.; GERALDO, N.; SCHULTZ, T. R.; AANEN, D.; SIX, D. L. The evolution of agriculture in insects. **Annual Reviews of Ecological Evolution Systems**, v. 36, p. 563–595, 2005.

NAUG, D.; CAMAZINE, S. The role of colony organization on pathogen transmission. In social insects. **Journal of Theoretical Biology**, v. 215, p. 427-439. 2002. doi:10.1006/jtbi.2001.2524

POULSE, N. M.; BOT, A. N. M.; CURRIE, C. R.; BOOMSMA, J. J. Mutualistic bacteria and a possible trade-off between alternative defence mechanism in *Acromyrmex* leaf-cutting ants. **Insectes Sociaux**, v. 49, p. 15-19, 2002.

POULSE, N. M.; CAFARO, M.; BOOMSMA, J. J.; CURRIER, C. R. Specificity of the mutualistic association between actinomycete bacteria and two sympatric species of *Acromyrmex* cutting ants. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 3597 – 3604, 2005.

POUSEN, N. M., CURRIE, C. R. complexity of insect-fungal association: exploring the influence of microorganisms on attine ant-fungus symbiosis. In BOURTZSIS, K.; MILLER, T. A.(Ed) **Insect symbiosis**, v. 2, Newbury. CRC Press, p. 57 – 77. 2006.

POULSE, N. M.; CURRIE, C. R. Symbiont Interactions in a Tripartite Mutualism: Exploring the Presence and Impact of Antagonism between Two Fungus-Growing Ant Mutualists. **PLoS ONE**, v. 5, n.1, e8748.doi:10.1371/journal.pone.0008748, 2010.

RODRIGUES, A. **Ocorrência de fungos filamentosos em ninhos de *Atta sexdens* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae) submetidos a tratamento com iscas tóxicas**. Rio Claro, 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas. Área de Mirmecologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”.

RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F. C., BUENO; O. C.; PFENNING, L. H.; BACCI, M. Assessment of microfungi in fungus gardens free of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 46, p. 329–334, 2005.

RODRIGUES, A.; BACCI, M.; MUELLER, U. G.; ORTIZ, A.; PAGNOCCA, F. C. Microfungal “weeds” in the leafcutter ant symbiosis. **Microbial Ecology**, v. 56, p. 604–614, 2008.

RODRIGUES, A.; CARLETTI, C. D.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C. Leaf-cutting ant faecal fluid and andibular gland secretion: Effects on microfungi spore germination. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 64–67, 2008.

RODRIGUES, A. R.; CABLE, N.; MUELLER, U. G.; BACCI, M.; PAGNOCCA, F. C. Antagonistic interactions between garden yeasts and microfungi garden pathogens of leaf-cutting ants. **Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 6, p. 331–342. 2009.

ROSE, D. L.; KOCKA, J. P.; SOMERSON, N. L.; TULLY, J. G.; WHITCOMB, R. F.; CARLE, P.; BOVÉ, J. M.; COLFLESH, D. E.; WILLIAMSON, D. L. *Mycoplasma lactucae* sp. nov., a Sterol-Requiring Mollicute from plant surface. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.40, n.2, p.138. 1990.

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*. **Microbiology Letters**, v. 239, p. 319–323, 2004.

SEN, R.; ISHAK, H. D.; ESTRADA, D.; DOWD, S. E.; HONG, E.; MUELLER, U. G. Generalized antifungal activity and 454-screening of *Pseudonocardia* and *Amycolatopsis* bacteria in nest of fungus-growing ants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, p. 17805-17810, 2009.

SILVA, A.; BACCI, M.; SIQUEIRA, C. G.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A. Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. **Jornal of Insect Physiology**, v. 9, p. 307-313, 2003.

SIMAS, V. R.; COSTA, E. C.; SIMAS, C. A. Morfometria de operárias de *Atta vollenweideri* (Forel, 1893) (Hymenoptera: Formicidae). **Revista da FZVA**. Uruguaiana, v. 9, n. 1, p. 11-19. 2002.

SOUSA, N. J. **Avaliação do uso de três tipos de porta-isca no controle de Formigas cortadeiras, em áreas preparadas para implantação de povoamento de *Pinus taeda* L.** Curitiba, 1996. Dissertação (Mestrado em Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná.

TAERUM, S. J.; CAFARO, M. J.; LITTLE, A. E. F.; SCHULTZ, T. R.; CURRIER, C. R. Low host-pathogen specificity in the leaf-cutting ant microbe symbiosis. **Proceedings of the Royal Society**, v. 274, p. 1971-1978, 2007. VAN BORM, S.; BILLEN, J.; BOOMSMA, J. The diversity of microorganism associated with *Acromyrmex* leaf-cutting ants. **BMC Evolutionary Biology**, v. 2, p. 9-19, 2002.

TULLY, J. G.; ROSE, D. L.; WHITCOMB, R. F.; HACKETT, K. J.; CLARK, T. B.; HENEGAR, R. B.; CLARK, E.; CARLE, P.; BOVÉ, J. M. Characterization of some new insect-derived acholeplasmas. **Israel Journal of Medical Sciences**. v. 23, p. 699-703. 1987.

TULLY, J. G.; ROSE, D. L.; CARLE, P.; BOVÉ, J. M.; HACKETT, K. J.; WHITCOMB, R. F. *Acholeplasma entomophilum* sp. nov. from gut contents of a wide range of host insects. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 38, n. 2. 1988.

VILELA, E. F. Status of leaf-cutting ant control in forest plantations in Brazil. In: **Fire Ants and Leaf-cutting Ants: Biology and Management**. Ed. by Lofgren, C. S.; Vander Meer, R. K.. Boulder and London: Westview Press, 399-408. 1986.

WEBER, N. A. Gardening ants: the attines. **Philadelphia: Memoirs of the American Philosophical Society**, p. 73, 1972.

WEISBURG, W. G.; TULLY, J. G.; ROSE, D. L.; PETZEL, J. P.; OYAIZU, H.; YANG, D.; MANDELCO, L.; SECHREST, J.; LAWRENCE, T. G.; VAN ETEN, J.; MANILOFF, J.; WOESE, C. R. A phylogenetic analysis of the *Mycoplasma*: Basis of their classification. **Journal of bacteriology**, v.171, n. 12, 1989.

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

APÊNDICE

Apêndice A: Tabela com a concentração e pureza do DNA total extraído de operárias de *Atta sexdens*.

Amostra	Concentração de ácido nucleico (ng/μL)			Amostra	Concentração de ácido nucleico (ng/μL)				
	A260	A280	260/280		A260	A280	260/280		
Operária 01	101,2	2,023	1,227	1,65	Operária 26	416,7	8,335	5,198	1,6
Operária 02	88,3	1,766	1,086	1,63	Operária 27	234,9	4,698	2,746	1,71
Operária 03	53,3	1,065	0,637	1,67	Operária 28	398,9	7,978	5,241	1,52
Operária 04	95,6	1,912	1,149	1,66	Operária 29	234,7	4,694	2,791	1,68
Operária 05	28,8	0,576	0,321	1,79	Operária 30	164,2	3,283	1,972	1,67
Operária 06	40,7	0,813	0,478	1,7	Operária 31	375,9	7,517	4,516	1,66
Operária 07	15,7	0,315	0,170	1,85	Operária 32	164,2	3,284	1,911	1,72
Operária 08	29,5	0,590	0,339	1,74	Operária 33	235,6	4,712	2,761	1,71
Operária 09	48,2	0,964	0,589	1,64	Operária 34	207,6	4,153	2,446	1,7
Operária 10	36,9	0,738	0,439	1,68	Operária 35	299,6	5,992	3,706	1,62
Operária 11	114,1	2,281	1,365	1,67	Operária 36	229	4,580	2,717	1,69
Operária 12	136,4	2,728	1,694	1,61	Operária 37	170,5	3,411	1,995	1,71
Operária 13	46,8	0,937	0,569	1,65	Operária 38	179,1	3,582	2,117	1,69
Operária 14	75,8	1,516	0,926	1,64	Operária 39	125,1	2,502	1,454	1,72
Operária 15	67,2	1,344	0,797	1,69	Operária 40	223,7	4,474	2,689	1,66
Operária 16	142,4	2,848	1,699	1,68	Operária 41	195	3,899	2,273	1,72
Operária 17	103,1	2,063	1,198	1,72	Operária 42	259,9	5,198	3,163	1,64
Operária 18	338,9	6,777	4,087	1,66	Operária 43	143,1	2,861	1,752	1,63
Operária 19	194,8	3,896	2,302	1,69	Operária 44	134	2,680	1,551	1,73
Operária 20	150,8	3,017	1,792	1,68	Operária 45	396,8	7,937	4,774	1,66
Operária 21	40,1	0,802	0,451	1,78	Operária 46	396,4	7,928	4,930	1,61
Operária 22	224,4	4,488	2,583	1,74	Operária 47	271,2	5,425	3,217	1,69
Operária 23	202	4,040	2,376	1,7	Operária 48	274,6	5,491	3,187	1,72
Operária 24	159,7	3,194	1,859	1,72	Operária 49	313,4	6,268	3,706	1,69
Operária 25	293	5,859	3,469	1,69	Operária 50	241,1	4,823	2,763	1,75

Apêndice B: Tabela com a concentração e pureza do DNA total extraído de soldados de *Atta sexdens*.

Amostra	Concentração de ácido nucleico (ng/μL)			
	A260	A280	260/280	
Soldado 01	453,5	3,583	2,146	1,67
Soldado 02	692	11,849	7,744	1,53
Soldado 03	1383,7	27,675	16,184	1,71
Soldado 04	874,6	16,682	10,234	1,63
Soldado 05	563,2	8,436	5,021	1,68
Soldado 06	518	7,935	5,119	1,55
Soldado 07	632,4	10,467	6,583	1,59
Soldado 08	618,3	10,103	6,123	1,65
Soldado 09	571,8	8,747	5,056	1,73
Soldado 10	621,7	9,816	6,022	1,63
Soldado 11	57,2	1,183	0,672	1,76
Soldado 12	68,7	1,351	0,855	1,58
Soldado 13	37,3	0,543	0,312	1,74
Soldado 14	80,4	2,071	1,311	1,58
Soldado 15	78,1	1,941	1,244	1,56
Soldado 16	75,8	1,894	1,222	1,55
Soldado 17	69,6	1,689	1,206	1,4
Soldado 18	71	1,703	1,051	1,62
Soldado 19	72,3	1,512	1,088	1,39
Soldado 20	65,3	1,059	0,701	1,51

Apêndice C: Tabela com a concentração e pureza do DNA total extraído de rainhas de *Atta sexdens*.

Amostra	Concentração de ácido nucleico (ng/μL)				Amostra	Concentração de ácido nucleico (ng/μL)			
	A260	A280	260/280			A260	A280	260/280	
Rainha 01-Cabeça	66,2	1,323	0,792	1,67	Rainha 03-Cabeça	292	5,854	3,364	1,74
Rainha 01-Perna	58,2	1,163	0,646	1,8	Rainha 03-Perna	32,6	0,652	0,388	1,68
Rainha 01-Mesossoma	886,1	17,72	10,126	1,75	Rainha 03-Mesossoma	1383,7	27,68	15,206	1,82
Rainha 02-Cabeça	395	7,95	4,466	1,78	Rainha 04-Cabeça	102,3	2,046	1,176	1,74
Rainha 02-Perna	50,1	1,002	0,579	1,73	Rainha 04-Perna	73,5	1,471	0,808	1,82
Rainha 02-Mesossoma	2020,3	40,41	20,721	1,95	Rainha 04-Mesossoma	1045,2	20,91	11,120	1,88

Apêndice C (continuação): Tabela com a concentração e pureza do DNA total extraído de rainhas de *Atta sexdens*.

Amostra	Concentração de ácido nucleico (ng/μL)				Amostra	Concentração de ácido nucleico (ng/μL)			
	A260	A280	260/280			A260	A280	260/280	
Rainha 05-Cabeça	329	6,581	3,718	1,77	Rainha 11-Mesossoma	834,1	16,68	9,116	1,83
Rainha 05-Perna	56,1	0,632	0,357	1,77	Rainha 12-Cabeça	133,6	2,673	1,610	1,66
Rainha 05-Mesossoma	1013,5	20,27	10,669	1,9	Rainha 12-Perna	38,9	0,778	0,466	1,67
Rainha 06-Cabeça	166,3	2,38	1,700	1,4	Rainha 12-Mesossoma	858,6	17,17	10,161	1,69
Rainha 06-Perna	59,1	0,622	0,327	1,9	Rainha 13-Cabeça	76,5	1,529	0,916	1,67
Rainha 06-Mesossoma	594,2	11,88	6,459	1,84	Rainha 13-Perna	70,1	1,401	0,849	1,65
Rainha 07-Cabeça	250,6	3,041	1,843	1,65	Rainha 13-Mesossoma	500,5	10,01	5,721	1,75
Rainha 07-Perna	117,7	1,229	0,643	1,91	Rainha 14-Cabeça	54,3	1,086	0,679	1,6
Rainha 07-Mesossoma	968,9	19,38	10,532	1,84	Rainha 14-Perna	25,1	0,501	0,309	1,62
Rainha 08-Cabeça	222,8	2,738	1,680	1,63	Rainha 14-Mesossoma	1045,7	20,91	11,554	1,81
Rainha 08-Perna	77,2	0,818	0,433	1,89	Rainha 15-Cabeça	270,9	5,417	3,303	1,64
Rainha 08-Mesossoma	1255,5	25,11	13,216	1,9	Rainha 15-Perna	24,3	0,486	0,306	1,59
Rainha 09-Cabeça	175,5	2,712	1,674	1,62	Rainha 15-Mesossoma	711,5	14,23	7,950	1,79
Rainha 09-Perna	70,1	0,765	0,418	1,83	Rainha 16-Cabeça	190,7	3,814	2,461	1,55
Rainha 09-Mesossoma	678,1	13,56	7,620	1,78	Rainha 16-Perna	62,9	1,258	0,744	1,69
Rainha 10-Cabeça	2,661	3,718	2,226	1,67	Rainha 16-Mesossoma	261,3	5,226	2,887	1,81
Rainha 10-Perna	141,4	1,552	0,853	1,82	Rainha 17-Cabeça	62,2	1,244	0,736	1,69
Rainha 10-Mesossoma	1003,6	20,07	10,791	1,86	Rainha 17-Perna	212,7	4,255	2,610	1,63
Rainha 11-Cabeça	180,9	3,617	2,153	1,68	Rainha 17-Mesossoma	570,7	11,41	5,976	1,91
Rainha 11-Perna	25,4	0,508	0,316	1,61	Rainha 18-Cabeça	185,3	3,706	2,504	1,48

Apêndice C: (continuação): Tabela com a concentração e pureza do DNA total extraído de rainhas de *Atta sexdens*.

Amostra	Concentração de ácido nucleico (ng/μL)	A260	A280	260/280	Amostra	Concentração de ácido nucleico (ng/μL)	A260	A280	260/280
Rainha 18-Perna	168,4	3,368	2,029	1,66	Rainha 19-Mesossoma	1252,3	25,046	13,538	1,85
Rainha 18-Mesossoma	1370	27,4	14,731	1,86	Rainha 20-Cabeça	274,3	5,486	3,707	1,48
Rainha 19-Cabeça	419,9	8,397	5,488	1,53	Rainha 20-Perna	81,2	1,624	1,009	1,61
Rainha 19-Perna	75,9	1,518	0,920	1,65	Rainha 20-Mesossoma	1309,6	26,193	14,471	1,81

Apêndice D: Tabela com a concentração e pureza do DNA total extraído de machos de *Atta sexdens*.

Amostra	Concentração de ácido nucleico (ng/μL)	A260	A280	260/280	Amostra	Concentração de ácido nucleico (ng/μL)	A260	A280	260/280
Macho 01	608,7	26,839	15,673	1,71	Macho 11	680,05	27,201	15,714	1,73
Macho 02	661,6	25,983	15,961	1,63	Macho 12	554,2	11,084	6,594	1,68
Macho 03	709	28,051	14,726	1,90	Macho 13	1361,1	27,222	15,684	1,74
Macho 04	637	17,792	10,813	1,65	Macho 14	1247,7	24,955	13,373	1,87
Macho 05	584,3	16,625	9,794	1,70	Macho 15	470,8	9,416	5,308	1,77
Macho 06	609,8	17,201	8,678	1,98	Macho 16	330,2	6,604	3,932	1,679552
Macho 07	1159	24,893	17,371	1,43	Macho 17	696,1	13,921	7,502	1,86
Macho 08	579,5	13,683	7,172	1,91	Macho 18	541,3	10,826	6,020	1,8
Macho 09	875,3	15,147	8,821	1,72	Macho 19	485	9,700	5,445	1,78
Macho 10	593,9	14,625	8,892	1,64					

Apêndice E: Sequência de *Mesoplasma* sp. obtida a partir da amplificação da região 16 S da amostra operária 02.

```

Operária 02  . . . . . 10      20      30      40      50      60
               C A G G A T C T T T T A A A N C A N C A A N A T A T G T A T T A C C G C G G C T G C T G G C A C A T A G T T A G C C G G
Operária 02  . . . . . 70      80      90      100     110     120
               G G C T T T T G T A A G G T A C C G T C A T C A C C A A G A C A T T T C C T T C C T G G C T T A T T C T T C C C T T A A
Operária 02  . . . . . 130     140     150     160     170     180
               A C A G A G C T T T A C A A T C C G A A G A C C T T C A T C A C T C A C G C G G C A T T G C T T C A T C A G A C T T T C
Operária 02  . . . . . 190     200     210     220     230     240
               G T C C A T T G T G A A A A A T T C C C T A C T G C T G C C T C C C G T A G G A G T C T G G G C C G T A T C T C A G T C
Operária 02  . . . . . 250     260     270     280     290     300
               C C A A T G T G G C C G A T C A A C C T C T C A G T T C G G C T A C G T A T C A T C G T C T A G G T G G G C C T T T A A
Operária 02  . . . . . 310     320     330     340     350     360
               C C C G C C T A C T A A C T A A T A C G C C G C A T C C T C A T C T T T T A G C G A T C C A A A C G G G T C T T T C C T
Operária 02  . . . . . 370     380     390     400     410
               C T T C T T C T G A T G T C A T A A T G A A G A T C T T A T G C G G T A A T A T C C C T C G T T T C C A A A A

```

Apêndice F: Sequência de *Mesoplasma* sp. obtida a partir da amplificação da região 16 S da amostra operária 09.

```

Operária 09  . . . . . 10      20      30      40      50      60
               G G A T A T G T A T T A C C G C G G C T G C T G G C A C A T A G T T A G C C G G G G C T T C C T G G T A A G G T A C C G
Operária 09  . . . . . 70      80      90      100     110     120
               T C A T C A C C A A G A C A T T T C C T T C C T G G C T T T T C T T C C C C T T A C A A C A G A G C T T T A C A A T C
Operária 09  . . . . . 130     140     150     160     170     180
               C G A A G A C C T T C A T C A C T C A C G C G G C A T T G C T T C A T C A G A G C T T T C G T C C A T T G T G A A A A A
Operária 09  . . . . . 190     200     210     220     230     240
               T T C C C T A C T G C T G C C T C C C G T A G G A G T C T G G G C T C G T A T C T C A G T C C C A A T G T G G C C G A T
Operária 09  . . . . . 250     260     270     280     290     300
               C A A C C T C T C A G T T C G G C T A C G T A T C A T C G T C T A G G T G G G C C T T T A C C C C G C G C T A C T A A C
Operária 09  . . . . . 310     320     330     340     350     360
               T A A T A C G C C G C A T C C T C A T C T T T T A A G C G A T C C A A A C G G A T C T T T C C T C T T C T T C T G A T G
Operária 09  . . . . . 370     380     390     400     410     420
               T C A T A A T T G A A G A C T C T T A T G C G G T A T T A T C C T T C G T T T C G C A A A G G T T A T C C C C C A C T A
Operária 09  . . . . . 420
               A A A G

```

Apêndice G: Sequência de *Mesoplasma* sp. obtida a partir da amplificação da região 16 S da amostra operária 14.

Operária 14 10 20 30 40 50 60
 Operária 14 Á G A A G A T A T G T A T T A C C G C G G C T G C T G G C A C A T A G T T A G C C G G G G C T T T C T G G T A A G C T A
 Operária 14 70 80 90 100 110 120
 Operária 14 C C G T C A T C A C C A A G A C A T T T C C T T C C T G C T T A T T C T T C C C T T A C A A C A G A T C T T T A C A T C
 Operária 14 130 140 150 160 170 180
 Operária 14 C G A A G A C C T T C A T C A C T C A C G C G G C A T T G C T T C A T C A G A C T T T C G T C C T T T G T G A A A A A T
 Operária 14 190 200 210 220 230 240
 Operária 14 T C C C T A C T G C T A C C T C C C G T A G G A G T C T G G C C G T A T C T C A G T C C C A A T G T G G C C G A T C A A
 Operária 14 250 260 270 280 290 300
 Operária 14 C C T C T C A G T T C G G C T A C G T A T C A T C G T C T A G G T G G G C C T T T A C C C G C C T A C T A A C T A A T
 Operária 14 310 320 330 340 350 360
 Operária 14 A C G C C G C A T C C T C A T C T T T T A G C G A T C C A A A C G G A T C T T T C C T C T T C T T C T G A G G C T A G T
 Operária 14 T A T T G T C A

Apêndice H: Sequência de *Mesoplasma* sp. obtida a partir da amplificação da região 16 S da amostra operária 25.

Operária 25 10 20 30 40 50 60
 Operária 25 A T G T A T T A C C G C G G C T G C T G G C A C A T A G T T A G C C G G G G C T T T C T G G T A A G G T A C C G T C A T
 Operária 25 70 80 90 100 110 120
 Operária 25 C A C C A A G A C A T T T C C T T C C T G G C T T A T T C T T C C C T T A C A A C A G A G C T T T A C A A T C C G A A G
 Operária 25 130 140 150 160 170 180
 Operária 25 A C C T T C A T C A C T C A C G C G G C A T T G C T T C A T C A G A C T T T C G T C C A T T G T G A A A A A T T C C C T
 Operária 25 190 200 210 220 230 240
 Operária 25 A C T G C T G C C T C C C G T A G G A G T C T G G G C C G T A T C T C A G T C C C A A T G T G G C C G A T C A A C T C
 Operária 25 250 260 270 280 290 300
 Operária 25 T C A G T T C G G C T A C G T A T C A T C G T C T A G G T G G G C C T T T A C C C G C C T A C T A A C T A A T A C G C
 Operária 25 310 320 330 340 350 360
 Operária 25 C G C A T C C T C A T C T T T T A G C G A T C C A A A C G G A T C T T T C C T C C T G A T G T C A T A A T G A A G A T C
 Operária 25 370 380 390 400 410 420
 Operária 25 T T A T G C G G T A T T A T C C T T C G T T T C C A A A G G T T A T T T C A C T A A A A G G T A G A T T A G A T A C G T
 Operária 25 430 440
 Operária 25 G T A C T C A C C T C G T T C G C C C G A A T C T T

Apêndice I: Sequência de *Mesoplasma* sp. obtida a partir da amplificação da região 16 S da amostra soldado 12.

Soldado 12 10 20 30 40 50 60
 Soldado 12 CGTCATCACCAAGACATTTCC TTCC TGGC TTATTCTTCCC TTAAGAGCTTTACAATCCGA

Soldado 12 70 80 90 100 110 120
 Soldado 12 AGACC TTCA TCAC TCACGC GGCATTGCTTC ATCAGACTTT CGTCCATT GTGAAAAATTCC

Soldado 12 130 140 150 160 170 180
 Soldado 12 CTACTGCTGCC TC CCGTAGGAGTCTGGGCCG TATCTCAGTCCCAATG TGGCCGATCAACC

Soldado 12 190 200 210 220 230 240
 Soldado 12 TCTCAGTTCCGGCTACGTATCATCGTCTAGG TGGGCC TTTACCCCGCC TACTAAC TAATAC

Soldado 12 250 260 270 280 290 300
 Soldado 12 GCCGCATCC TCATCTTAGCTTAGCGATC CAAACGGATC TTTCC TCTTCTTCTGATGTCAT

Soldado 12 310 320 330 340 350 360
 Soldado 12 AATGAAGATCTTATGCGGTATTA TCCTTCG TTTCCAAAGG TTA TCCCCAC TAAC TACAA

Soldado 12 370
 Soldado 12 GGTCTAGGTAGATTAGA