



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

**CARACTERIZAÇÃO DO TRANSCRIPTOMA E GENOMA MITOCONDRIAL DA
FORMIGA CORTADEIRA *Atta laevigata* (FORMICIDAE: ATTINI)**

CYNARA DE MELO RODOVALHO

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Área: Biologia Celular e Molecular).

Fevereiro - 2011

CYNARA DE MELO RODOVALHO

**CARACTERIZAÇÃO DO TRANSCRIPTOMA E GENOMA
MITOCONDRIAL DA FORMIGA CORTADEIRA *Atta laevigata*
(FORMICIDAE: ATTINI)**

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências do Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista Júlio de
Mesquita Filho, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Doutor em Ciências Biológicas (Área:
Biologia Celular e Molecular).

Orientador: Prof. Dr. Maurício Bacci Júnior

Co-orientador: Prof. Dr. Henrique Ferreira

Rio Claro
2011

595.796 Rodovalho, Cynara de Melo
R695c Caracterização do transcriptoma e genoma mitocondrial
da formiga cortadeira *Atta laevigata* (Formicidae: Attini) /
Cynara de Melo Rodovalho. - Rio Claro : [s.n.], 2011
83 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Maurício Bacci Júnior
Co-Orientador: Henrique Ferreira

1. Formiga. 2. Caracterização molecular. 3. Expressão
gênica. 4. Biblioteca de cDNA. 5. Controle de cortadeiras
pragas. 6. Mitogenoma. 7. Primer walking. I. Título.

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE RIO CLARO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE RIO CLARO

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

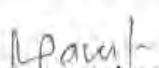
TÍTULO: Caracterização do Transcriptoma e Genoma Mitocondrial da Formiga Cortadeira *Atta laevigata* (Formicidae: Attini)

AUTORA: CYNARA DE MELO RODOVALHO

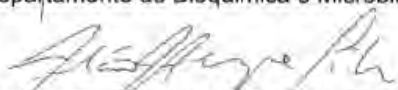
ORIENTADOR: Prof. Dr. MAURÍCIO BACCI JUNIOR

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. HENRIQUE FERREIRA

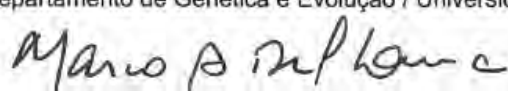
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. MAURÍCIO BACCI JUNIOR

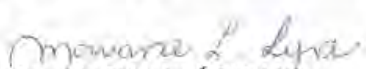
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / Instituto de Biociências de Rio Claro


Prof. Dr. FLAVIO HENRIQUE DA SILVA

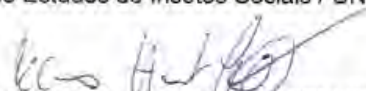
Departamento de Genética e Evolução / Universidade Federal de São Carlos


Prof. Dr. MARCO ANTONIO DEL LAMA

Depto. de Genética e Evolução / Universidade Federal de São Carlos


Profa. Dra. MARIANA LÚCIO LYRA

Centro de Estudos de Insetos Sociais / UNESP - Rio Claro


Prof. Dr. KLAUS HARTMANN HARTFELDER

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / USP-Ribeirão Preto

Data da realização: 24 de fevereiro de 2011.

*À Filgia e Maria (in memoriam),
jóias preciosas da minha vida
e que certamente estão muito
orgulhosas desta conquista,
dedico esta Tese.*

Agradecimientos

Agradecimentos

Agradeço a Deus por todas as oportunidades de aprendizado, pelas experiências compartilhadas, pelos novos amigos e colegas e por toda proteção e bênçãos concedidas ao longo desses anos.

Agradeço aos meus pais por todo apoio, incentivo, por sempre acreditarem e não pouparem esforços para realização dos meus sonhos. São exemplo de força, honra, coragem, companheirismo e determinação que tento sempre seguir.

Agradeço ao Dr. Maurício Bacci Júnior por me confiar esse projeto e por todo suporte oferecido, desde infraestrutura, até contatos, intercâmbios e todo material necessário para realização do mesmo. É uma pessoa que admiro muito e com quem pude aprender bastante, durante discussões, planejamentos, escrita de trabalhos, aulas, cursos e no dia a dia do laboratório. Foi um super orientador me ensinando a buscar o conhecimento, fazer as perguntas certas e a desenvolver pensamentos e habilidades de um verdadeiro cientista.

Sou muito grata ao Dr. Henrique Ferreira que aceitou ser meu co-orientador e que tenho como exemplo de garra e perseverança. Esteve sempre disponível para troca de experiências e conhecimento, para solucionar minhas dúvidas e ajudar com protocolos e técnicas.

Não há pessoa que devo maiores agradecimentos do que ao Cleiton, minha Vida. Por quatro anos teve toda paciência do mundo com nosso namoro à distância, não cobrou quando tive que ficar em Rio Claro trabalhando, compreendeu quando mesmo estando juntos eu precisava estudar, sempre me apoiou para realizar todas minhas tarefas, viajar para congressos, participar de cursos, ministrar aulas. Foram anos de muita saudade, de grandes distâncias, de sofrimento por estar longe, mas nunca desistiu de mim, do nosso amor e do sonho de ficarmos juntos e construir uma família. Muito obrigada, Vida, por tudo mesmo!

Agradecimento especial ao Dr. Flávio Henrique Silva (por abrir seu laboratório e disponibilizar o material necessário para realização de alguns experimentos, principalmente o sequenciamento do transcriptoma) e aos doutorandos Fernando Fonseca (por todo auxílio com a construção e sequenciamento da biblioteca) e Kesser (pela companhia e empréstimo da sua casa).

Agradeço a Dra. Mariana Lyra por toda ajuda com a parte mitocondrial. Sem os seus conselhos, ideias, análises e sugestões este trabalho não estaria completo.

Agradeço a todos os professores (Fernando Pagnocca, Mário Palma, Odair Bueno, Osmar Malaspina, Vanderlei Martins), funcionários, amigos e colegas do CEIS, especialmente Necis, Lucilene, Ita, Olívia, Vanessa, André Rodrigues, Cíntia Martins, Rodrigo, Sandra, Manuela, Marcela, Amanda, Eduardo, Andriago, Natália, Paulo, Lucilene Delazari, Nicoli, Daniel, Bibiana, Ife e Virgínia. Foram muitas dúvidas solucionadas, muitos galhos quebrados, muitas festas organizadas, muita burocracia resolvida, muitas conversas jogadas fora, muita torcida compartilhada. Obrigada por tudo mesmo, por tornar esse local tão especial, tão gostoso de trabalhar e tão propício para o aprendizado!!!

Não tenho palavras para descrever tudo que passei no laboratório com Joaquim, Ana Carolina, Milene, Cíntia Maria, Alexandre, Sérgio, Joana, Alexandre Takara, Fernando, Letícia, Tássio, Wellinton, Washington, Marcelo, Giovana, Paula Maria, com os colaboradores Erik, Rodrigo Esposti, Pâmella Malagrino, Carlos Sponton, Ricardo, Marcos Queiroga, Mariana, Victor, Carla, Ariadne, Tulliana, Clarissa, Murillo e com todos os estagiários que estiveram aqui. Foram muitas conversas, ajudas, aprendizado, diversão, experiências compartilhadas... Os amigos sempre foram muito dispostos, presentes, queridos, especialmente os estagiários e co-orientados que sempre foram muito trabalhadores, competentes e prestativos.

Preciso destacar três grandes amigas conquistadas, a quem devo muitos e muitos agradecimentos. Não posso transmitir todo o meu carinho e amizade em palavras, mas elas sabem da importância e significado de todos os momentos que passamos juntos: almoços, festinhas, reuniões, lágrimas, viagens, conselhos, compras, filmes, faxinas. Meus dias em Rio Claro ficaram mais coloridos, mais bonitos e agradáveis e sei que essa amizade não termina aqui. Carol, Cintia Henrique e Milene, vocês são mais do que amigas e sou grata de todo coração a vocês e suas famílias que também me adotaram e cuidaram tão bem de mim! Além disso, Carol e Milene foram dois anjinhos que Deus colocou em minha vida e que ajudaram bastante no laboratório e na confecção da tese, especialmente a Mi, que com todos os seus conhecimentos e experiência em Bioinformática possibilitou a realização de todas as análises, facilitando e tornando acessível esse outro mundo dos softwares, scripts, programas e computadores.

Não posso me esquecer dos velhos amigos que sempre permaneceram nos meus pensamentos e estiveram presentes em todos os momentos que precisei: André, Luciana, Flávia, Carlos, Fausto, Cynthia, Fernando, Virgínia, Laila, Márcia Arantes, Márcia Cristina (pelos congelados e pão de queijo), todas as G11, especialmente a Daniela e família, meu ponto de apoio em São Paulo, cantinho especial para me sentir em casa e sofrer menos com a saudade de Minas. Preciso agradecer também a três novas amigas: Egle (vizinha e companheira), Elaine (professora e psicóloga) e Márcia Rodrigues (colega de k̃itnet, conselheira, algumas vezes mãe).

Sou muito grata à minha família que sempre torceu, acreditou e me apoiou e, em especial, Máira (por ser essa irmã maravilhosa e querida) e Verusk̃a (prima linda que juntamente com sua família também constituíram ponto de apoio em São Paulo, estando sempre de braços abertos pra me receber).

Por último, agradeço a Unesp, pela infra-estrutura, à FAPESP, pelo financiamento dos projetos e à CAPES pela bolsa e auxílios concedidos durante esses anos.

“... Transformei minha reflexão em oração e pedi ao Senhor:

*Que me desse a tenacidade daquela formiga,
para ‘carregar’ as dificuldades do dia-a-dia.*

*Que me desse a perseverança da formiga,
para não desanimar diante das quedas.*

*Que eu pudesse ter a inteligência, a esperteza dela,
para dividir em pedaços o fardo que, às vezes,
se apresenta grande demais.*

*Que eu tivesse a humildade
para partilhar com os outros o êxito da chegada,
mesmo que o trajeto tivesse sido solitário.*

*Pedi ao Senhor a graça de, como aquela formiga,
não desistir da caminhada,
mesmo quando os ventos contrários
me fazem virar de cabeça para baixo,
mesmo quando, pelo tamanho da carga,
não consigo ver com nitidez
o caminho a percorrer.”*

“... Sonhos não morrem, apenas adormecem na alma da gente.”

Ninon Rose Hawryliszyn e Silva

Resumo

RESUMO

Formigas cortadeiras do gênero *Atta*, popularmente conhecidas como saúvas, são as mais derivadas dentro da tribo Attini. Apresentam grande importância ecológica, porém, pelo hábito de cortarem folhas para manutenção do fungo simbiote e pelo enorme tamanho das colônias, causam muitos prejuízos às lavouras, pastagens e plantações, sendo consideradas pragas agrícolas. *Atta laevigata* Smith, 1858 apresenta vasta distribuição pelo Brasil e é responsável pela herbivoria de inúmeras plantas dicotiledôneas, gramíneas e espécies nativas de diferentes biomas. O presente trabalho teve como objetivos a caracterização parcial do transcriptoma e do genoma mitocondrial de *A. laevigata*. Foram caracterizadas 2006 sequências únicas do transcriptoma, a partir de uma biblioteca de cDNA preparada com indivíduos inteiros da formiga. Entre essas sequências, 16 provavelmente representam genes com grande número de transcritos. Esses 16 genes estão relacionados a três funções celulares: (i) conservação de energia através de reações redox na mitocôndria; (ii) estrutural, pelo citoesqueleto e músculos; (iii) regulação da expressão gênica e metabolismo. Considerando o estilo de vida e processos biológicos chaves para essas formigas, 146 sequências foram identificadas com base na sua utilização para o controle de cortadeiras pragas. A partir de dados da biblioteca de cDNA e procedimentos envolvendo *primer walking*, o genoma mitocondrial de *A. laevigata* foi parcialmente caracterizado, apresentando-se com 17920 pb, maior, portanto, do que outros já descritos em Hymenoptera, mesmo considerando-se a impossibilidade de determinação da sequência de uma pequena porção do mtDNA, envolvendo a região controle, uma parte do 12S e os tRNAs *S*₁, *V* e *M*. Como já descrito para outros mitogenomas, o de *A. laevigata* apresentou alto conteúdo AT, os mesmos 13 genes codificadores e as duas subunidades ribossomais com tamanho e localização compatíveis com o inferido para o mitogenoma hipotético ancestral. Rearranjos foram encontrados para os tRNAs, porém a diferença mais marcante refere-se ao grande número e maior tamanho de regiões intergênicas presentes no mtDNA. Os dados genômicos obtidos pelo presente trabalho representam importante base genética para estudos filogenéticos e evolutivos de cortadeiras, além de identificar alvos moleculares potenciais para o controle de cortadeiras pragas através de procedimentos mais específicos e menos agressivos ao meio ambiente.

Palavras chaves: expressão gênica, biblioteca de cDNA, controle de cortadeiras pragas, mitogenoma, *primer walking*.

Abstract

ABSTRACT

Leafcutter ants from *Atta* genus, popularly known as “saúvas”, are the most derived of the tribe Attini. They have major ecological importance, but, because of their habit of cutting leaves for the maintenance of the symbiotic fungus and the huge colony size, they impose severe economic damages to plantations, pastures, and agriculture, being considered as agriculture pests. *Atta laevigata* shows wide distribution in Brazil and it is responsible for the herbivory of many dicots, grass, and native species from different biomes. The present work aimed to characterize the transcriptome and the mitochondrial genome of *A. laevigata*. 2,006 unique sequences of the transcriptome were characterized from a cDNA library constructed with whole individuals. Among those sequences, 16 are likely from genes with high number of transcripts. Those 16 genes are related with three cellular functions: (i) energy conservation through redox reactions in mitochondria; (ii) cytoskeleton and muscle structuring; (iii) regulation of gene expression and metabolism. Based on lifestyle and key biological processes of these ants, 146 sequences were identified with potential use for controlling pest leafcutters. Using data from cDNA library and primer walking proceedings, the mitochondrial genome of *A. laevigata* was partially characterized with 17,920 bp, being larger than the others already described for Hymenoptera. A small part of the mtDNA was not sequenced, including the control region, a portion of 12S and tRNAs *S*₁, *V*, and *M*. As described before for other mitogenomes, *A. laevigata* mtDNA displayed high AT content, the same 13 protein-coding genes and the two ribosomal subunits with length and location according to the hypothetical ancestral mitogenome. Rearrangements were found for the tRNAs, but the most remarkable difference were the high number and longer length of intergenic regions presented in the mtDNA. The genomic data obtained with the present work provided important genetic basis for phylogenetic and evolutionary studies of leaf-cutting ants, as well as the identification of potential molecular targets for the control of pests leafcutter through more specific and environmentally friendly methods.

Key words: gene expression, cDNA library, pest leafcutter control, mitogenome, primer walking.

SUMÁRIO

	Página
INTRODUÇÃO GERAL	14
Formiga cortadeira <i>Atta laevigata</i>	15
Transcriptoma	18
Genoma mitocondrial	19
Apresentação dos capítulos	22
OBJETIVOS	23
CAPÍTULO 1	25
EXPRESSED SEQUENCE TAGS FROM <i>Atta laevigata</i> AND IDENTIFICATION OF CANDIDATE GENES FOR THE CONTROL OF PEST LEAF-CUTTING ANTS	
Abstract	27
Background	28
Methods	29
Results and Discussion	30
Conclusion	38
List of abbreviation used	38
Authors' contributions	39
Acknowledgements	39
Authors' details	39
References	39
Tables	49
Figures	51
CAPÍTULO 2	55
GENOMA MITOCONDRIAL DA FORMIGA CORTADEIRA <i>Atta laevigata</i> (FORMICIDAE: ATTINI)	
Introdução	56
Material e Métodos	57
Resultados e Discussão	63
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	73
REFERÊNCIAS	75

Introdução Geral

INTRODUÇÃO GERAL

Formiga cortadeira *Atta laevigata*

As formigas Attini são conhecidas pelo hábito de cultivar fungos, em câmaras presentes nos ninhos, para sua alimentação (WEBER, 1972; HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Compreendem um grupo monofilético (SCHULTZ; MEIER, 1995) com mais de 230 espécies descritas, todas obrigatoriamente dependentes do cultivo do fungo simbiote, comportamento que teve sua origem entre 45 a 65 milhões de anos atrás (WEBER, 1972; MUELLER et al., 2001).

Dentre estas formigas, *Atta* e *Acromyrmex* destacam-se por sua grande herbivoria e distribuição pelo Novo Mundo (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990), cortando e utilizando principalmente folhas como substrato para seu fungo mutualista sendo, por isso, conhecidas como formigas cortadeiras (WETTERER et al., 1998).

Schultz e Brady (2008) reconstituíram a evolução da agricultura de Attini, relatando cinco sistemas agrícolas conhecidos e seus períodos de surgimento e diversificação. Tal estudo mostra a origem recente (8 a 12 milhões de anos) das formigas cortadeiras e o maior nível de domesticação do fungo simbiote. Este é incapaz de viver livremente longe das formigas e muitas espécies de cortadeiras cultivam uma única espécie de fungo, *Leucoagaricus gongylophorus* (SILVA-PINHATI et al., 2004).

As formigas pertencentes a *Atta* compreendem 19 espécies (BOLTON, 2006) com distribuição geográfica que abrange desde o Sul dos Estados Unidos até o Norte da Argentina (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

Essas formigas são popularmente conhecidas como saúvas, sendo este o gênero com posição mais apical em relação a grupos taxonômicos próximos dentro da tribo Attini (WETTERER et al., 1998). As operárias possuem três pares de espinhos no dorso do tronco e a superfície dorsal do gáster lisa, sem tubérculos (ANJOS et al., 1998).

As formigas desse gênero apresentam grande importância ecológica relacionada à associação com diferentes organismos como o fungo simbiote (WEBER, 1972; MUELLER et al., 2001) e a bactéria *Pseudonocardia*, anteriormente descrita como *Streptomyces* (CURRIE et al., 1999). Seus ninhos hospedam répteis e

anfíbios (WEBER, 1972), artrópodos (MOSER; NEFF, 1971; STEINER, 2004; WALLER; MOSER, 1990) e diferentes microrganismos (BACCI et al., 1995; CARREIRO et al., 2004; CURRIE, 2001; RODRIGUES et al., 2005). Atuam na criação de clareiras (GARRETTSON et al., 1998), aeração do solo e criação de passagens para drenagem e penetração de água (WEBER, 1972), poda da vegetação, reciclagem de nutrientes ao levarem matéria orgânica para os ninhos subterrâneos escavados em solos úmidos (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990) e trazerem minerais presentes nas partes mais profundas do solo para a superfície (WEBER, 1972). Apresentam ainda papel importante na fixação de nitrogênio nos jardins de fungos (PINTO-TOMÁS, 2009) e aumento no número de plantas crescendo em volta e sobre os ninhos, contribuindo, também, para a manutenção da biodiversidade (GARRETTSON et al., 1998; WIRTH et al., 2003).

Os ninhos maduros estão entre os maiores construídos por insetos sociais e são compostos por até oito milhões de operárias e uma única rainha (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Existe grande polimorfismo dentro da classe operária com divisão de tarefas, de forma que as operárias maiores (soldados) são especializadas na defesa da colônia, as operárias médias cortam e carregam as folhas, removem dejetos e indivíduos mortos e escavam os ninhos, enquanto as operárias menores processam as folhas, cuidam dos jardins de fungo e da prole (WEBER, 1972; WILSON, 1980).

As colônias são consideradas “superorganismos” (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990) com sistema digestivo externo composto pelos jardins de fungos que secretam enzimas extracelulares para degradação de polissacarídeos vegetais (SIQUEIRA et al., 1998), gerando mono e dissacarídeos para as formigas adultas (SILVA et al., 2003), enquanto as larvas se alimentam das proteínas do micélio do fungo mutualista, o que é importante para o crescimento dessas formas jovens (BASS; CHERRET, 1995).

A manutenção do elevado número de indivíduos na colônia e grande quantidade de fungos demanda enorme quantia de matéria vegetal fresca (folhas, flores, frutos), superando o que é consumido por outros herbívoros, incluindo mamíferos, homópteros e lepidópteros (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Assim, muitas das espécies de *Atta* são consideradas pragas e causam enormes prejuízos à agricultura (WEBER, 1972; FOWLER et al., 1986; CAMERON, 1985). Algumas das características que contribuem para o status de praga são a habilidade de explorar

grande variedade de espécies de plantas (VASCONCELOS, 1990), alcance de altas densidades populacionais (FOWLER et al., 1986) e produção de rainhas longevas capazes de botar ovos constantemente por mais de 15 anos (KELLER, 1998).

Atta laevigata Smith, 1858 (Figura 1), popularmente conhecida como “saúva cabeça de vidro”, apresenta soldados com a cabeça e superfície dorsal do gáster sem pêlos e brilhantes (ANJOS et al., 1998).



Figura 1 – *A. laevigata*. A – Operária. B – Soldado. (Fotos: Joaquim Martins Júnior, retiradas de [HTTP://omega.rc.unesp.br/formiga](http://omega.rc.unesp.br/formiga))

Essa formiga apresenta ampla distribuição geográfica podendo ser encontrada na Venezuela, Colômbia, Guiana, Bolívia e Paraguai. No Brasil, vive nos estados do Pará, Amazonas, Alagoas, Goiás, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná (BORGMEIER, 1950), Bahia, Sergipe (MARICONI, 1970), Roraima, Tocantins, Ceará, Maranhão, Piauí, Pernambuco, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rondônia (ANJOS et al., 1998) e Acre (FORTI et al., 2003).

A. laevigata nidifica em terrenos arenosos no litoral, na beira de estradas, em lugares com vegetação rasteira ou capoeiras e mesmo na periferia de áreas de mata, ocasionando danos a numerosas espécies de plantas cultivadas em fazendas (DELABIE et al., 1997). Os ninhos possuem o monte de terra solta arredondado, com superfície quase sempre lisa, encontrados tanto em lugares ensolarados quanto sombreados.

Como substrato para o cultivo do fungo são utilizadas folhas de inúmeras plantas dicotiledôneas e algumas gramíneas (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Ataca plantações de pinheiros (HERNÁNDEZ; JAFFÉ, 1995), cacau (DELABIE, 1990) e eucalipto (ZANETTI et al., 2008), bem como uma grande variedade de plantas nativas de diferentes biomas como Cerrado ou Floresta Tropical, onde sua

intensa herbivoria desafia o processo de reflorestamento natural de áreas degradadas (VASCONCELOS; CHERRETT, 1977; VIANA et al., 2004).

Transcriptoma

Os insetos sociais são modelos biológicos preferenciais para estudos sobre altruísmo, divisão de trabalho e plasticidade demonstrada frente a mudanças ambientais (PAGE JR; ERBER, 2002). Representam, portanto, uma oportunidade para compreender as bases moleculares da vida social: como evoluiu, como é governada e como influencia todos os aspectos da estrutura genômica, expressão gênica e desenvolvimento, fisiologia e comportamento do organismo (ROBINSON, 2002).

Alguns insetos tiveram determinada a sequência completa de seus genomas, incluindo a mosca de fruta (*Drosophila melanogaster* – ADAMS et al., 2000), abelha melífera (*Apis mellifera* – THE HONEYBEE GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2006), bicho da seda (*Bombyx mori* – MITA et al., 2004), vespas parasitóides (*Nasonia* – THE *Nasonia* GENOME WORKING GROUP, 2010) e o besouro castanho (*Tribolium castaneum*), o qual era a única espécie de praga agrícola com tal informação genética disponível até o momento (*Tribolium* GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2008).

Atta cephalotes, outra formiga cortadeira considerada praga por sua grande herbivoria na região neotropical, teve seu genoma publicado muito recentemente (SUEN et al., 2011), em fevereiro deste ano.

Desta forma, para as formigas, tais estudos têm sido limitados devido à falta de bancos de sequências e outras ferramentas moleculares (WANG et al., 2007). Algumas das sequências existentes para esse grupo foram derivadas de dois estudos que geraram centenas de ESTs para *Solenopsis invicta* (TIAN et al., 2004) e *Camponotus festinatus* (GOODISMAN et al., 2005).

Em 2007, Wang e colaboradores geraram para *S. invicta*, a partir de uma biblioteca de cDNA normalizada, 21715 ESTs que representam 11864 diferentes transcritos com diversas funções moleculares. Tais ESTs foram usadas para construção de *microarray* de cDNA, o qual pode ser uma valiosa fonte para estudos moleculares, ecológicos e evolutivos em formigas.

Os organismos superiores contêm milhares de genes distintos, dos quais somente uma fração é expressa num dado momento em uma célula, controlando processos como desenvolvimento e diferenciação celular (MANNIATIS et al., 1987). O termo transcriptoma corresponde ao conjunto de mRNA, ou transcritos, expressos em um organismo ou grupo de células em um determinado momento. Por refletir a população de genes ativamente expressa, o transcriptoma pode variar de acordo com as condições ambientais, estágio de desenvolvimento, tecido de origem.

Uma biblioteca de cDNA é uma coleção de clones contendo regiões transcritas do genoma sendo, por isso, menor que uma biblioteca genômica. O cDNA, ou DNA complementar, é um DNA sintetizado no laboratório a partir de um mRNA molde e, portanto, não apresenta sequências reguladoras nem íntrons. A partir da ação da transcriptase reversa, originalmente isolada de retrovírus, mRNA é usado como molde para síntese de uma molécula de DNA dupla-fita (GRIFFITHS et al., 1998). As moléculas de cDNA são ligadas a vetores, transfectadas em *Escherichia coli* e, de cada clone, determina-se a sequência individualmente.

A expressão gênica em uma determinada célula ou tecido pode ser estimada pela abundância dos diferentes transcritos (BOUCK; VISION, 2007), que está relacionada à abundância de clones cDNA correspondentes a cada um destes transcritos e presentes em uma biblioteca de cDNA.

As sequências nucleotídicas das extremidades de cada um dos cDNAs presentes em uma biblioteca são chamadas de *Expressed Sequence Tags* (ESTs). Através da determinação de ESTs, é possível identificar o conjunto de genes expressos em uma determinada situação, especialmente para organismos que possuem genomas muito grandes ou que ainda não foram sequenciados (ADAMS et al., 1991; BOUCK; VISION, 2007). Tal procedimento apresenta inúmeras aplicações biológicas, biotecnológicas, ecológicas e evolutivas e, por essa razão as ESTs constituem um dos tipos mais diversos e abundantes de informações disponíveis em bancos de dados moleculares (BOUCK; VISION, 2007).

Genoma mitocondrial

A mitocôndria é uma organela citoplasmática com dupla membrana, presente na maioria das células eucarióticas, em número que pode variar de algumas centenas até centenas de milhares por célula. Sua principal função está relacionada

com a conservação de energia celular, com síntese de ATP, através do transporte de elétrons acoplado à fosforilação oxidativa (LEHNINGER et al., 1995). A mitocôndria apresenta outras funções importantes, como produção de espécies reativas de oxigênio, regulação da apoptose, do metabolismo intermediário e da homeostasia iônica (WALLACE, 2005; SCHEFFLER, 2008).

Essa organela é produzida por fissão simples, a partir de mitocôndrias pré-existentes e possui seu próprio DNA (em várias cópias por organela), ribossomos e enzimas necessárias para sintetizar as proteínas codificadas em seu genoma (LEHNINGER et al., 1995). Estas e outras evidências levaram à teoria, atualmente aceita, de que as mitocôndrias têm uma única origem e surgiram entre 2 e 3 bilhões de anos atrás, a partir de uma relação simbiótica entre uma célula proto-eucariótica e um procarioto primitivo capaz de realizar fosforilação oxidativa. Os primórdios dessa teoria remontam há 120 anos, porém Margulis tornou-se forte defensora e popularizadora de tais ideias na década de 80 (WALLACE, 2005; SCHEFFLER 2008).

O grande aumento no número de sequências e melhorias nos métodos computacionais de inferência filogenética permitiram que em 2006, Embley e Martin publicassem uma revisão com dados e análises atualizados de vários laboratórios. Esses dados foram utilizados na geração de uma árvore filogenética, descrevendo os principais grupos de eucariotos e as relações mais plausíveis entre seus genomas, incluindo as espécies que apresentam organelas derivadas de mitocôndria (mitossomos e hidrogenossomos). Ainda é difícil estimar os períodos de evolução e divergência dos eucariotos, os detalhes de ramos e raízes são ainda incertos e a natureza do hospedeiro que adquiriu a mitocôndria é mais obscura do que se pensava.

O tamanho, conteúdo gênico e a arquitetura do mtDNA podem variar bastante entre metazoários, plantas, fungos e protozoários. Todavia, a maioria das proteínas da mitocôndria é codificada por genes nucleares, havendo grande interação e co-evolução entre o genoma nuclear e o mitocondrial (BURGER et al., 2003; SCHEFFLER, 2008). Muitos genes bacterianos foram perdidos e muitos outros foram transferidos para o núcleo do hospedeiro, culminando no genoma nuclear moderno (WALLACE, 2005).

Animais multicelulares apresentam mitogenomas (sinônimo para mtDNA) com tamanho aproximado de 16 Kb, formando uma estrutura circular, normalmente

contendo 37 genes: 22 tRNAs, dois RNAs ribossomais (*16S RNA* e *12S RNA*) e 13 proteínas associadas com fosforilação oxidativa, sendo sete do complexo I (*ND1-6*, *ND4L*), uma do complexo III (*Cytb*), três do complexo IV (*COI-III*) e duas do complexo V (*ATP6* e *8*) (WOLSTENHOLME, 1992; BOORE, 1999; WALLACE, 2005).

Além de ser compacto, sem íntrons e com genes separados por poucos ou nenhum nucleotídeo, todos os mtDNAs apresentam uma ou duas regiões não-codificadoras, bastante variáveis, mas que contém elementos regulatórios para replicação e transcrição (região controle). Alguns genes são truncados, completando seu códon de parada pela poliadenilação. A transcrição ocorre nas duas direções formando moléculas de RNA policistrônicas que depois são quebradas e geram os mRNAs individuais, tRNAs e rRNAs (SCHEFFLER, 2008). O código de leitura é um pouco diferente daquele do DNA nuclear, não sendo interpretado pelo sistema presente no citoplasma (WALLACE, 2005). Sendo assim, quando sequências mitocondriais são transferidas para o núcleo permanecem como pseudogenes não funcionais, ou NUMTs (*nuclear mitochondrial-like sequences*), primeiramente descobertos por Du Buy e Riley (1967).

O mtDNA apresenta grande número de cópias por célula, pouca recombinação, alta taxa mutacional (a substituição de bases é maior do que nos genes nucleares), haploidia e herança predominantemente materna (AVISE et al., 1987; MORITZ et al., 1987; SIMON et al., 2006), características que conferem vantagens para seu uso como marcador molecular. De fato, tem sido amplamente utilizado em estudos populacionais, evolutivos e filogenéticos (BOORE et al., 1995; BOORE et al., 1998; BOORE; BROWN, 1998; CHIOTIS et al., 2000; HU et al., 2004; SIMON et al., 2006; LAVROV, 2007; DOWTON et al., 2009; PIGANEAU; EYRE-WALKER, 2009).

Até o momento, 2473 mitogenomas completos de distintas espécies foram publicados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, acesso em janeiro de 2011) e, apesar da predominância das formigas nos ecossistemas terrestres, tanto pela sua constância, abundância e riqueza de espécies (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990), somente *Solenopsis* (GOTZEK et al., 2010) tem os genomas mitocondriais de três espécies descritos e *Pristomyrmex punctatus* teve dois mitogenomas (gerados a partir de formigas de regiões diferentes do Japão) depositados no GenBank recentemente (janeiro de 2011).

Apresentação dos capítulos

O presente trabalho surgiu da curiosidade e necessidade de se conhecer as bases moleculares que governam aspectos da biologia, fisiologia, comportamento e vida social de *Atta laevigata*.

Desta forma, o estudo do transcriptoma descrito no Capítulo 1 para essa formiga conhecida por sua grande herbivoria, fornecerá importantes informações a respeito dos genes e proteínas expressos e os papéis fisiológicos, metabólicos e regulatórios desempenhados por tais genes. Além disso, abrirá imensas possibilidades para a caracterização de proteínas e enzimas novas e para a produção heteróloga de proteínas de formigas visando estudos em biologia estrutural e funcional. Por ser praga, o controle de *A. laevigata* é normalmente feito por iscas químicas que são tóxicas, afetam também outros animais não alvos e acumulam-se no ambiente. Sendo assim, os dados do transcriptoma constituem importante base genética para identificação de alvos moleculares e desenvolvimento de estratégias de controle mais específicas e menos danosas à natureza.

Com a caracterização parcial do transcriptoma, um elevado número de sequências mitocondriais foi obtido. O Laboratório de Evolução Molecular é reconhecido pelo grande número de trabalhos envolvendo filogenia, evolução e sistemática de Attini. O uso de sequências mitocondriais como marcadores moleculares para inferências filogenéticas e caracterização das espécies é uma das abordagens utilizadas em tais estudos. Dessa forma, o Capítulo 2 surgiu como complemento ao Capítulo 1 e para suprir uma necessidade do grupo de pesquisa relativa ao desenvolvimento de novos marcadores e à caracterização de genomas mitocondriais completos que são importantes não só pelos dados de sequência, mas também pelos dados de estrutura gênica e organização genômica que permitem o estabelecimento e entendimento de relações filogenéticas, processos evolutivos e mecanismos moleculares que levam aos rearranjos gênicos, aquisição de sequências não codificadoras e diversificação de espécies e grupos taxonômicos.

Objetivos

Objetivo geral

Caracterização parcial do transcriptoma e do genoma mitocondrial de *Atta laevigata*.

Objetivos específicos

Criação de um banco de sequências expressas para *A. laevigata*.

Identificação de genes com potencial para serem alvos de estratégias de controle mais específicas e menos danosas ao ambiente.

Caracterização do mitogenoma de *A. laevigata*.

Geração de uma base genética para estudos filogenéticos e evolutivos de cortadeiras.

Capítulo 1

Expressed sequence tags from *Atta laevigata* and identification of candidate genes for the control of pest leaf-cutting ants

Cynara M Rodovalho¹, Milene Ferro¹, Fernando P P Fonseca², Erik A Antonio³, Ivan R Guilherme⁴, Flávio Henrique-Silva², Maurício Bacci Jr^{1§}

[§]Corresponding author

¹Center for the Study of Social Insects. Univ. Estadual Paulista, Av. 24A, 1515, Bela Vista, Rio Claro, São Paulo, Brazil.

Full list of author information is available at the end of the article

Email addresses: CMR: cynaramr@yahoo.com.br

MF: milenef@gmail.com

FPPF: fonseca.fpp@gmail.com

EAA: aceiro@gmail.com

IRG: ivan@rc.unesp.br

FHS: dfhs@ufscar.br

MB: mbacci@rc.unesp.br

Artigo submetido para publicação na revista *BMC Research Notes*.

Abstract

Background

Leafcutters are the highest evolved within Neotropical ants in the tribe Attini and model systems for studying caste formation, labor division and symbiosis with microorganisms. Some species of leafcutters are agricultural pests controlled by chemicals which affect other animals and accumulate in the environment. Aiming to provide genetic basis for the study of leafcutters and for the development of more specific and environmentally friendly methods for the control of pest leafcutters, we generated expressed sequence tag data from *Atta laevigata*, one of the pest ants with broad geographic distribution in South America.

Results

The analysis of the expressed sequence tags allowed us to characterize 2,006 unique sequences in *Atta laevigata*. Sixteen of these genes had a high number of transcripts and are likely positively selected for high level of gene expression, being responsible for three basic biological functions: energy conservation through redox reactions in mitochondria; cytoskeleton and muscle structuring; regulation of gene expression and metabolism. Based on leafcutters lifestyle and reports of genes involved in key processes of other social insects, we identified 146 sequences potential targets for controlling pest leafcutters. The targets are responsible for antixenobiosis, development and longevity, immunity, resistance to pathogens, pheromone function, cell signaling, behavior, polysaccharide metabolism and arginine kynase activity.

Conclusion

The generation and analysis of expressed sequence tags from *Atta laevigata* have provided important genetic basis for future studies on the biology of leaf-cutting ants and may contribute to the development of a more specific and environmentally friendly method for the control of agricultural pest leafcutters.

Background

The tribe Attini comprises over 200 ant species [1] which culture mutualistic fungi for their feeding [2]. The most evolutionary derived attines are the leaf-cutting ants in the genera *Atta* and *Acromyrmex* which are considered major herbivores in the tropics [3].

Some *Atta* species contributes to nutrient cycling, aeration and drainage of water in the soil [4], as well as maintenance of plant diversity [5, 6]. Their nests were also found to host arthropods [7, 8, 9], reptiles and amphibians [4], and microorganisms [10, 11, 12, 13, 14].

However, despite of these ecological roles, many leafcutter species are considered agricultural pests which impose severe economic damages to agriculture [15, 16]. Some of the characteristics contributing to the pest status of leafcutters are their ability of exploiting a great variety of plant species [17], reaching high population density [15] and long life spanning queens constantly laying eggs for up to 15 years [18].

Atta laevigata is a pest leafcutter distinguished by a very large and shiny head in soldiers, a characteristic which has rendered the species with the popular name “cabeça de vidro” (meaning glass head). It can be found in Venezuela, Colombia, Guyana, Bolivia, Paraguay and, in Brazil, from the Amazonian Rain Forest in the North to the Paraná state in the South [19]. It cuts leaves from many plantations, like pine tree [20], cocoa [21] and eucalypts [22], as well as wide variety of native plants from different biomes such as the Cerrado or the Rain Forest, where its intense herbivory challenges reforestation of degraded areas [23, 24].

The control of pest leafcutters in small properties can be done by biological methods [25] or even utilizing the waste material generated by the ants [26], but in extensive monocultures this control utilizes massive amounts of broad spectrum insecticides which are toxic to other animals and persist in the environment [27]. Thus, the development of a more specific and environmentally friendly process for controlling the leafcutters is required [28].

Genomic studies can contribute with that by characterizing genes involved in key functions for the leafcutters, like longevity, fertility and plasticity to exploit different vegetations,

raising more specific targets for the ant control. Genomics is also a valuable resource for ecological and evolutionary studies of leaf-cutting ants.

In the present investigation, we carried out a genomic study in the pest leafcutter *Atta laevigata* by generating 3,203 expressed sequence tags (ESTs) which characterized 2,006 unique sequences (US). We postulate important differences in expression level among the transcripts and identified 146 potential target sequences for the control of pest leaf-cutting ants.

Methods

EST generation

Two grams of soldiers and major workers of *Atta laevigata* were macerated under liquid nitrogen, total RNA was extracted with the TRIzol method (Invitrogen, UK) and mRNA was purified using the PolyAtract System (Promega, USA). The CloneMiner cDNA Library Construction Kit (Invitrogen, UK) and 2 µg of mRNA were utilized for the synthesis of first and second cDNA strands which were then size-fractionated in a 1.0 ml Sephacryl S-500 resin column, inserted in a pDONR222 plasmid (Invitrogen, UK) and transformed into DH10B *Escherichia coli*. Cells were plated onto solid Circle Grow medium (QBIO-GENE, Canada) containing 25 µg.ml⁻¹ kanamycin and individually picked into a permanent culture plate with 96 wells. After 22 hours growth in liquid Circle Grow medium (25 mg.ml⁻¹ kanamycin), plasmidial DNA was purified by alkaline lysis [29] and sequenced in reactions containing 300 ng template DNA, 5 pmol M13 forward primer and the DYEnamic ET Dye Terminator kit reactant (GE Healthcare, UK), according to the manufacturer's protocol. The amplified products were resolved in a MEGA-BACE 1000 automated DNA sequence machine (GE Healthcare, UK).

EST analysis

The pipeline generation system EGene [30] was used to clean and assemble ESTs in contigs and singlets. Sequences were filtered by quality using phred values > 20 and 90 % of minimum identity percent in window. Filtered sequences were then masked against vector and primer sequences, selected by size (> 100 bp) and assembled using CAP3 [31] with an overlap percent identity cutoff (p) of 90 and a minimum overlap length cutoff (o) of 50.

The program Blast2GO (B2G) [32] was used to associate every *Atta laevigata* singlet and contig to blastx [33] results (nr protein database; E-value $\leq 10^{-5}$), Gene Ontology (GO) terms [34], InterProScan classification [35, 36] including signal peptide [37] and transmembrane regions predictions, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) maps (<http://www.genome.jp/kegg/>), and Enzyme Commission (EC) numbers (IUBMB). The results generated by B2G and those obtained from Conserved Domain Database (CCD) were manually inspected, in order to group contigs and singlets in functional categories and to infer transcript abundance in *Atta laevigata*.

Results and Discussion

EST generation and assembly

The 5' ends of 4,704 clones from the *Atta laevigata* cDNA library were sequenced, resulting 4,482 reads. We were able to selected 3,203 of these reads, which presented high-quality with average length of 418 bp (Table 1; [GenBank:JG659458 to JG662660, dbEST ID:73713535 to 73716737, Genome Project ID: 63563]).

The high-quality sequences were assembled in 340 contigs (619 bp average) and 1,666 singlets which we assume to represent 2,006 US. It is likely that some of the US came from the same gene due to non-overlapping ESTs from a single gene or products of alternative splicing [38].

Comparative analysis of *Atta laevigata* genes

Using Blastx we found that 1,165 (58 %) of the characterized *Atta laevigata* US matched significantly ($E\text{-value} \leq 10^{-5}$) with GenBank sequences in the non-redundant (nr) database (Figure 1A). Most of the best hits (Figure 1B) came from the hymenopterans *Apis mellifera* [39] (677) and *Nasonia vitripennis* [40] (334) genomes, but only 10 hits came from the ants *Solenopsis invicta*, *Lasius niger* or *Myrmica rubra* because ant sequences are relatively poorly represented in the nr database.

We used B2G program and found GO terms (Figure 2) to 865, EC numbers to 250, predicted signal peptides in 229, and domain information for 66 *Atta laevigata* US, as well as KEGG information. This bulk of retrieved information and data obtained from CDD were manually inspected to annotate *Atta laevigata* US in 27 functional categories (Figure 3).

The number of US per category gives us an idea on the diversity of genes existing in each cell function. This diversity was found high within transcripts related with signaling pathways, membrane or regulation of gene expression, but very low within transcripts related to secondary metabolism, cuticular and peritrophic membranes or homeobox.

Variation of the number of reads per contig

The number of reads per contig varied from two to 123, with 73 % of the contigs containing two or three reads and only 7 % containing 10 or more reads (Figure 4). Therefore few contigs concentrated many reads, i.e. 1.1 % (23 out of 2,006) of the contigs contained 18.8 % (603 out of 3,203) of the reads. By dividing the number of reads (3,203) by the number of US (2,006) it was found the average of 1.6 reads per contig. Some of the contigs exceeding this average value are shown in Table 2. Whether the number of reads per contig is related to gene expression level, it can be assumed that *Atta laevigata* contains a set of 23 highly expressed genes. Sixteen of these genes are involved with three major cellular processes (Table 2): (i) ATP synthesis coupled to redox reactions in mitochondria (273 reads); (ii) muscle or cytoskeleton structure (135 reads); (iii) transcription regulatory processes through homeobox

or signaling proteins (95 reads). Gene expression is energetically expensive and is accompanied by protein synthesis for the translational process which is even more expensive. The increasing of the number of transcripts of a given gene, even in a very small extent, is not a neutral process but rather strongly constrained by evolution [41], and expected to occur only if positively selected. Therefore, our results suggest that high expression levels have been positively selected in *Atta laevigata* for genes responsible for energy conservation, cell structure and regulation.

Identification of candidate genes for the control of pest leafcutters

Inhibition of the translation of genes which play essential functions in insects by feeding these insects with dsRNA [42] or using transgenic plants [43] seems a promising procedure for the control of agricultural pests [44]. One of the advantages of this procedure is that it targets mRNA molecules which may be species-specific.

In order to control pest leafcutters by inhibiting gene translation, one needs to identify and sequence target candidate genes. Our library was found to contain 146 US which represent potential target genes for the control of leafcutters, because these US are likely playing essential functions in *Atta laevigata* (Table 3). These target genes are related to antixenobiosis (including insecticide detoxification), queen longevity, larval development, insect immunity or resistance to pathogens, communication necessary to social tasks, polysaccharide metabolism or insecticide action.

The function and potential utilization of these 146 US as targets for the control of pest leafcutters are considered below.

Antixenobiotic genes

Cytochrome P450, carboxylesterases, and glutathione transferases are involved in insecticide metabolism [45]. In insects, P450 also participates in the metabolism of many endogenous

(including juvenile hormones, ecdysteroids, and pheromones) and exogenous compounds (plant allelochemicals and insecticides) [46].

The enzyme glutathione S-transferase catalyzes the initial conjugation of insecticides with glutathione. Both enzyme and glutathione are very abundant in the cells and essential for detoxification of electrophiles causing cytotoxic or genotoxic damage [47]. The enzyme may play a role in insecticide resistance [48], herbicide resistance in plants [49], resistance of cancer cells to chemotherapeutic agents [50], and antibiotic resistance in bacteria [51]. In our study we found 25 US in the *cytochrome P450* family and 12 US probably related with detoxification of xenobiotics, including *glutathione S-transferase*, *glutamate cysteine ligase* and *aldehyde oxidase* (Table 3). All these genes may be important targets for the control of leafcutters.

Development and longevity genes

Of the 18 US we found (Table 3) involved in development, growth and differentiation, four are putatively related with nervous system development, two of which contained the immunoglobulin domain: the *wrapper* and *lachesin* genes. The protein *lachesin* has a role in early neuronal differentiation as well in axon outgrowth, cell recognition events, cell adhesion or intercellular communication [52]. The other 14 US in this category (Table 3) may be involved in different phases of insect development like egg, or larvae, and development of tissues or organs like mesoderma, spermatechae and antennae.

Queen and worker ants develop from identical eggs, being genetically identical, but the caste system produces a long-lived queen and a short-lived worker with up to ten-fold lifespan differences [3]. Harman [53] stated that lifespan is determined by the rate at which oxidative damage occurs due to the accumulation of by-products of oxidative energy metabolism. Harman's theory implicates that long-lived organisms produce fewer reactive oxygen species or have increased antioxidant production [54], although the degree of lifespan extension can

be sex- or genotype-specific [55] and sometimes poorly correlated with antioxidant levels [56].

We found 13 US likely involved in organism lifespan by protection from oxidative stress (Table 3) and which are directly involved in the degradation of superoxide radicals and hydrogen peroxide or neutralization of reactive oxygen species, such as the putative *Cu/Zn superoxide dismutase*, *catalase*, *Rpd3 histone deacetylase*, *peroxiredoxin 5*, *thioredoxin reductase* and *phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase*.

Our library contained four US putatively coding for juvenile hormone binding protein (JHBP) domain and two for putative proteins that participate in JHBP biosynthesis (Table 3). Juvenile hormones (JH) regulate a great number of physiological processes in insect development. Larvae requires JH to maintain larval state and JH must be absent in the last larval instar for metamorphosis to start [57, 58]. They are also necessary for reproduction in adults [59].

The characterization of genes which are related to development and longevity in *Atta laevigata* allows future investigation on the effect of the expression of these genes on queen maturation and lifespan, which are a key features associated with leafcutter pest ability.

Genes associated with immunity and resistance to pathogens

Pathogens, parasites or injury triggers in insects innate immune responses that are in essence similar and comprise both cellular and humoral components. Cellular mechanisms include phagocytosis by special blood cells and encapsulation of large invaders [60]. Humoral responses involve events of proteolytic cascades leading to melanization [60] and the production of antimicrobial peptides initiated via two distinct signaling pathways, Toll and Immune Deficiency, which depend on the pathogen recognition [61]. There are two types of recognition proteins: peptidoglycan recognition proteins and Gram-negative bacteria-binding proteins.

We found 37 US that are may be involved with immunity or pathogen resistance (Table 3), including the putative *toll like interacting protein*, *prophenoloxidase subunit 3* and *easter* CG4920-PA, the last two with role in melanin synthesis. We also found sequences putatively coding for the antimicrobial peptides *hymenoptaecin* and *defensin 2*, and for the *peptidoglycan recognition protein precursor*, as well as *transferrin* and *transferrin 2* which participate in response to microbial infection by sequestering iron that is an essential nutrient for some pathogens [62].

Leaf-cutting ants and their mutualistic fungus are constantly challenged by pathogenic microorganisms [63] which ultimately regulate host population [64]. Therefore, the 37 US we found probably involved in resistance to microbial pathogens are important markers for understanding antimicrobial mechanisms in leafcutters and putative targets for controlling pest leafcutters.

Communication genes

Communication plays a central part in social insects necessary for division of labor and task partitioning which are essential for harvesting food, nursing the broods and sexual reproduction [65]. Thus, targeting genes involved in communication seems a promising strategy for the control of leaf-cutting ants.

Our library contained 11 US probably related to communication, one of them putatively coding for the *pheromone binding protein* (PBP), which is important for chemical recognition of insect conspecifics by transporting odorant molecules from cuticular pores to receptors [66]. In *Solenopsis invicta*, the gene *Gp-9*, which is a PBP homolog, seems to have a role in worker ability to recognize queens and regulate their numbers [67]. Other important communication gene found putatively codes for fatty acid binding protein involved in transport of communication molecules in insects [68].

Four of the communication US we found were in the lipocalin family which is composed of secreted proteins binding small hydrophobic molecules or forming macromolecular complexes associated with cell surface receptors important for transport, pheromone signaling and olfaction [69]. These sequences putatively code for the odorant binding proteins, apolipoprotein III or PP238.

We also found three orthologues to the chemosensory protein from *Nasonia vitripennis*, chemosensory protein 2 from *Apis mellifera* and chemosensory protein 5 from *Bombyx mori*. Chemosensory proteins may be specifically expressed in sensory organs which are important in ant behavior [70] and participate in cellular processes that require lipophilic compounds [71].

The putative genes *gustatory receptor* and *dihydroorotate dehydrogenase* involved in odorant reception in insects were also found.

Signaling genes

Tetraspanin is an important signaling membrane protein expressed in antennae of moths and honeybees [72], being a molecular facilitator of signal transduction and cell adhesion [73]. In our library, six US putatively coding for *tetraspanin* were present.

We also found two US corresponding to nicotinic acetylcholine receptor which plays a role in visual processing, learning and memory, olfactory signal processing, and mechanosensory antennal input in honeybee [74]. These receptors are targets of neonicotinoids insecticides used against piercing-sucking pests [75].

Behavior genes

Eleven *Atta laevigata* US in this category (Table 3) were homologs to genes involved in behavior, learning, memory and courtship in *Apis mellifera*, *Drosophila melanogaster* or *Solenopsis invicta*. Some of the genes controlling social behavior and complex tasks or

abilities may be specific to Hymenoptera [38] and thus may be specific targets for the control of pest leafcutters.

Polysaccharide metabolism genes

Food sources for worker leafcutters relies mostly on the plant polysaccharides cellulose, xylane and starch, which are degraded by extracellular enzymes secreted by the mutualistic fungus [76], generating mono and disaccharides readily assimilated by the ants [77]. Degradation of cellulose by the mutualistic fungus generates cellobiose [10] and degradation of starch generates maltose, both disaccharides being consumed by leafcutters [77] through the production of alpha- and beta-glucosidase, respectively. In addition, workers assimilate starch at certain extent [77], which demands production of alpha-amylase.

Our library contained 59 US (Figure 5) corresponding to genes related to carbohydrate metabolism, amongst which *alpha-glucosidase-like*, *beta-glucosidase* and *alpha-amylase* (Table 3) are promising targets for leafcutters control.

Arginine kinase gene

Arginine kinase catalyses the reversible transfer of phosphate between ATP and guanidine substrates and acts in cells that need readily available energy sources [78]. This enzyme activity in cockroaches was found to be inhibited by nitrates and borates [79] which were then used as insecticides. Our library contained two US of putative *arginine kinase* (Table 3) which may also be important for the control of leafcutters.

Future perspectives

The 146 US here proposed as targets for the control of leaf-cutting ants can be used for primer designing in order to study gene expression through real time PCR. For instance, over-expression of sequences here proposed as related to immunity or antixenobiosis in *A. laevigata* challenged by pathogens or insecticides should validate the protective role of the respective gene products in leafcutters exposed to adverse conditions, helping us to

understand the molecular basis of pest ant resistance to hazardous chemicals. A future scenario can be envisaged in which inhibition of gene expression, gene translation or the related protein activities would make pest leafcutters more susceptible to pathogens, insecticides or anti-herbivory chemicals produced by crops. In summary, inhibition of genes or gene products related to the processes described in Table 3 may specifically hamper the colonization of crop areas by pest leafcutters.

Conclusion

Leaf-cutting ants are the major neotropical herbivores, many of which are important agricultural pests. We characterized 2,006 US in *Atta laevigata*, one of the most geographically spread pest leaf-cutting ant in South America, and found that 16 of the genes are likely under positively selected high expression and responsible for energy conservation or cell structuring or regulation. Another set of 146 US which play important part in anti-xenobiosis, longevity, immunity, development, communication, nutrition or insecticide action were identified as putative targets for the control of pest leafcutters. Our findings provided genetic background for basic and applied studies on these ants.

List of abbreviation used

EST: Expressed Sequence Tags; **US:** unique sequences; **mRNA:** messenger RNA; **cDNA:** complementary DNA; **bp:** base pair; **B2G:** Blast2GO; **nr:** non- redundant; **GO:** Gene Ontology; **KEGG:** Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; **EC:** Enzyme Commission; **IUBMB:** International Union of Biochemistry and Molecular Biology; **CDD:** Conserved Domain Database; **JHBP:** juvenile hormone binding protein; **JH:** juvenile hormone; **PBP:** pheromone binding protein; **PCR:** polymerase chain reaction.

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests

Authors' contributions

Conceiving and designing of the experiments: CMR, MB. Construction and sequencing of the cDNA library: CMR, FFPP, FHS. Bioinformatic analyses: MF, EAA, IRG. Contribution with reagents, materials and analysis tools: FHS, MB. Manual annotation and manuscript preparation: CMR, MF, MB. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank CAPES, CNPq 476250/2008-0 and 304661/2009-0 and FAPESP 2008/54386-9 for financial support as well as the trainees Alexandre H Takara, Cristiane P Garcia, Pamella A Malagrino, Rafael B Souza, Fernando K Cochi and Washington Luiz Pires for clone picking and miniprep and Caio C Batista for computational support.

Authors' details

¹Center for the Study of Social Insects. Univ. Estadual Paulista, Av. 24A, 1515, Bela Vista, Rio Claro, São Paulo, Brazil.

²Department of Genetics and Evolution, Federal University of São Carlos, Via Washington Luis, Km 235, CP 676, São Carlos, São Paulo, Brazil

³Department of Computer Science, Federal University of São Carlos, Via Washington Luis, Km 235, CP 676, São Carlos, São Paulo, Brazil

⁴Department of Statistics, Applied Mathematics and Computation. Univ. Estadual Paulista, Av. 24A, 1515, Bela Vista, Rio Claro, São Paulo, Brazil.

References

1. Bolton BA, Alpert G, Ward PS, Naskrecki P: *Bolton's catalogue of ants of the world: 1758-2005*. Cambridge: Harvard University Press; 2006.
2. Mueller UG, Schultz TR, Currie CR, Adams RM, Malloch D: **The origin of the attine ant-fungus mutualism**. *Q Rev Biol* 2001, **76**:169-97.

3. Hölldobler B, Wilson EO: *The Ants*. Massachusetts: Belknap Press of Harvard University; 1990.
4. Weber NA: *Gardening ants: the Attines*. Philadelphia: The American Philosophical Society, 1972.
5. Garrettson M, Stetzel JF, Halpern BS, Hearn DJ, Lucey BT, McKone MJ: **Diversity and abundance of understorey plants on active and abandoned nests of leaf-cutting ants (*Atta cephalotes*) in a Costa Rican rain forest**. *J Trop Ecol* 1998, **14**:17-26.
6. Wirth R, Herz H, Ryel RJ, Beyschlag W, Hölldobler B: *Herbivory of leaf-cutting ants. A case study on *Atta colombica* in the tropical rain forest of Panama*. Berlin: Springer, 2003.
7. Moser JC, Neff SE: ***Phleomyia comans* (Diptera: Milichiidae) an associate of *Atta texana*: larval anatomy and notes on biology**. *Z Angew Entomol* 1971, **69**:343-348.
8. Steiner WE: **The first records of *Bycrea villosa* Pascoe (Coleoptera: Tenebrionidae) in the United States, Central America and Colombia and notes on its association with leaf-cutting ants**. *Coleopterists Bulletin* 2004, **58**:329-334.
9. Waller DA, Moser JC: **Invertebrate enemies and nest associates of the leaf cutting ant *Atta texana* (Buckley) (Formicidae, Attini)**. In: *Applied myrmecology: a world perspective*. Edited by Vander Meer RK, Jaffe K, Cedeño A. Boulder, Colorado: Westview Press, 1990:255–273.
10. Bacci M, Anversa MM, Pagnocca FC. **Cellulose degradation by *Leucocoprinus gongylophorus*, the fungus cultured by the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa***. *Antonie van Leeuwenhoek Int J Gen Mol Microbiol* 1995, **67**:385-386.
11. Carreiro SC, Pagnocca FC, Bacci M, Lachance MA, Bueno OC, Hebling MJA, Ruivo CCC, Rosa CA: ***Sympodiomyces attinorum* sp nov., a yeast species associated with**

- nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004, **54**:1891-1894.**
12. Currie CR: **A community of ants, fungi, and bacteria: A multilateral approach to studying symbiosis.** *Annu Rev Microbiol* 2001, **55**:357-380.
 13. Rodrigues A, Pagnocca FC, Bacci M, Hebling MJA, Bueno OC, Pfenning LH: **Variability of non-mutualistic filamentous fungi associated with *Atta sexdens rubropilosa* nests.** *Folia Microbiol* 2005, **50**:421-425.
 14. Pinto-Tomás AA, Anderson MA, Suen G, Stevenson DM, Chu FST, Cleland WW, Weimer PJ, Currie CR: **Symbiotic nitrogen fixation in the fungus gardens of leaf-cutter ants.** *Science* 2009, **326**:1120-1123.
 15. Fowler HG, Silva VP, Saes NB: **Population dynamics of leaf-cutting ants: a brief review.** In *Fire ants and leaf-cutting ants: biology and management*. Edited by Lofgren CS, Vander Meer RK. Boulder, Colorado: West-View Press; 1986:123-145.
 16. Cameron RS: *Distribution, impact and control of the Texas leaf-cutting ant: 1983 survey results*. Texas Forest Service Publication; 1985.
 17. Vasconcelos HL: **Foraging activity of two species of leaf-cutting ants (*Atta*) in a primary Forest of the Central Amazon.** *Insectes Soc* 1990, **37**:131-145.
 18. Keller L: **Queen lifespan and colony characteristics in ants and termites.** *Insectes Soc* 1998, **45**:235-246.
 19. Borgmeier T: **Estudos sobre *Atta* (Hym. Formicidae).** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1950, **48**:239-263.
 20. Hernández JV, Jaffé K: **Economic damage caused by leaf-cutting ant populations of *Atta laevigata* (F. Smith) on pine plantations (*Pinus caribaeae* Mor.) and elements for managing of the pest.** *An Soc Entomol* 1995, **24**:287-298.

21. Delabie JHC: **The ant problems of cocoa farms in Brazil.** In *Applied myrmecology: a world perspective*. Edited by Vander Meer RK, Jaffe K, Cedeño A. Boulder, Colorado USA: Westview Press; 1990:555–569.
22. Zanetti R, Zanuncio JC, Souza-Silva A, Mendonça LA, Mattos JOS, Rizental MS: **Efficiency of products for thermonebulization on the control of *Atta laevigata* (Hymenoptera: Formicidae) in eucalyptus plantations.** *Ciênc Agrotec* 2008, **32**:1313-1316.
23. Vasconcelos HL, Cherret JM: **Leaf-cutting ants and early Forest regeneration in central Amazonia: effects of herbivory on the seedling establishment.** *J Trop Ecol* 1977, **13**:357-370.
24. Viana LR, Santos JC, Arruda LJ, Santos GP, Fernandes GW: **Foraging patterns of the leaf-cutter ant *Atta laevigata* (Smith) (Myrmicinae: Attini) in an area of cerrado vegetation.** *Neotrop Entomol* 2004, **33**:391-393.
25. Michels K, Cromme N, Glatzle A, Schultze-Kraft R: **Biological Control of Leaf-Cutting Ants Using Forage Grasses: Nest Characteristics and Fungus Growth.** *J Agron Crop Sci* 2001, **187**:259–267.
26. Ballari SA, Farji-Brener AG: **Refuse dumps of leaf-cutting ants as a deterrent for ant herbivory: does refuse age matter?** *Entomol Exp Appl* 2006, **121**:215–219.
27. Ying GG, Kookana RS: **Persistence and movement of fipronil termiticide with under slab and trenching treatments.** *Environ Toxicol Chem* 2006, **25**:2045–2050.
28. Ambrozin ARP, Leite AC, Bueno FC, Vieira PC, Fernandes JB, Bueno OC, Silva MFGF, Pagnocca FC, Hebling MJA, Bacci M: **Limonoids from andiroba oil and *Cedrela fissilis* and their insecticidal activity.** *J Braz Chem Soc* 2006, **17**:542-547.
29. Vettore AL, Silva FR, Kemper EL, Arruda P: **The libraries that made SUCEST.** *Genet Mol Biol* 2001, **24**:1-7.

30. Durham AM, Kashiwabara AY, Matsunaga FT, Ahagon PH, Rainone F, Varuzza L, Gruber A: **EGene: a configurable pipeline generation system for automated sequence analysis.** *Bioinformatics* 2005, **21**:2812-2813.
31. Huang X, Madan A: **CAP3: A DNA sequence assembly program.** *Genome Res* 1999, **9**:868-877.
32. Conesa A, Gotz S, Garcia-Gomez JM, Terol J, Talon M, Robles M: **Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research.** *Bioinformatics* 2005, **21**:3674-3676.
33. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ: **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.** *Nucleic Acids Res* 1997, **25**:3389-3402.
34. Gene Ontology Consortium: **The Gene Ontology (GO) project in 2006.** *Nucleic Acids Res* 2006, **34**:D322-326.
35. Quevillon E, Silventoinen V, Pillai S, Harte N, Mulder N, Apweiler R, Lopez R: **InterProScan: protein domains identifier.** *Nucleic Acids Res* 2005, **33**:W116-120.
36. Zdobnov EM, Apweiler R: **InterProScan – an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro.** *Bioinformatics* 2001, **17**:847-848.
37. Emanuelsson O, Brunak S, Heijne G, Nielsen H: **Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP, and related tools.** *Nat Protoc* 2007, **2**:953-971.
38. Wang J, Jemielity S, Paolo U, Wurm Y, Gräff J, Keller L: **An annotated cDNA library and microarray for large-scale gene-expression studies in the ant *Solenopsis invicta*.** *Genome Biol* 2007, **8**:R9.
39. The Honeybee Genome Sequencing Consortium: **Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*.** *Nature* 2006, **443**: 931-949.

40. The *Nasonia* Genome Working Group: **Functional and Evolutionary Insights from the Genomes of Three Parasitoid *Nasonia* Species.** *Science* 2010, **327**:343-348.
41. Wagner A: **Energy costs constrain the evolution of gene expression.** *J Exp Zool (Mol Dev Evol)* 2007, **308**:322–324.
42. Zhu F, Xu J, Palli R, Ferguson J, Palli SR: **Ingested RNA interference for managing the populations of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*.** *Pest Manag Sci* 2011, **67**:175–182.
43. Barbosa AEAD, Albuquerque EVS, Silva MCM, Souza DSL, Oliveira-Neto OB, Valencia A, Rocha TL, Grossi-de-Sa MF: **α -amylase inhibitor-1 gene from *Phaseolus vulgaris* expressed in *Coffea arabica* plants inhibits α -amylases from the coffee berry borer pest.** *BMC Biotechnol* 2010, **10**:44.
44. Huvenne H, Smagghe G: **Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review.** *J Insect Physiol* 2010, **56**: 227–235.
45. Ranson H, Claudianos C, Ortellì F, Abgrall C, Hemingway J, Sharakhova MV, Unger MF, Collins FH, Feyereisen R: **Evolution of supergene families associated with insecticide resistance.** *Science* 2002, **298**:179-181.
46. Hodgson E: **Microsomal mono-oxygenases.** In *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology*. Edited by Kerkut GA, Gilbert LC. Oxford: Pergamon Press; 1985:647–712.
47. Ketterer B, Coles B, Meyer DJ: **The role of glutathione in detoxication.** *Environ Health Perspect* 1983, **49**:59-69.
48. Ranson H, Rossiter L, Ortellì F, Jensen B, Wang X, Roth CW, Collins FH, Hemingway J: **Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*.** *Biochem J* 2001, **359**:295-304.

49. Hatton PJ, Cummins I, Cole DJ, Edwards R: **Glutathione transferases involved in herbicide detoxification in the leaves of *Setaria faberi* (giant toxtail).** *Physiol Plant* 1999, **105**:9-16.
50. Hayes JD, Pulford DJ: **The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance.** *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1995, **30**:445-600.
51. Arca P, Hardisson C, Suarez J: **Purification of a glutathione S-transferase that mediates fosfomycin resistance in bacteria.** *Antimicrob Agents Chemother* 1997, **34**:844-848.
52. Karlstrom RO, Wilder LP, Bastiani MJ: **Lachesin: an immunoglobulin superfamily protein whose expression correlates with neurogenesis in grasshopper embryos.** *Development* 1993, **118**:509-522.
53. Harman D: **Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry.** *J Gerontol* 1956, **11**:298-300.
54. Corona M, Hughes KA, Weaver DB, Robinson GE: **Gene expression patterns associated with queen honey bee longevity.** *Mech Ageing Dev* 2005, **126**:1230-1238.
55. Spencer CC, Howell CE, Wright AR, Promislow DE: **Testing an 'aging gene' in long-lived *Drosophila* strains: increased longevity depends on sex and genetic background.** *Aging Cell* 2003, **2**:123-130.
56. Perez-Campo R, Lopez-Torres M, Cadenas S, Rojas C, Barja G: **The rate of free radical production as a determinant of the rate of aging: evidence from the comparative approach.** *J Comp Physiol* 1998, **168**:149-158.
57. Riddiford, LM: **Cellular and molecular actions of juvenile hormone I. General considerations and premetamorphic actions.** *Adv Insect Physiol* 1994, **24**:213-274.

58. Truman, JW, Riddiford, LM: **The origins of insect metamorphosis.** *Nature* 1999, **401**:447-452.
59. Wyatt GR, Davey KG: **Cellular and molecular action of juvenile hormone II. Roles of juvenile hormone in adult insects.** *Adv Insect Physiol* 1996, **26**:1-155.
60. Gillespie JP, Kanost MR, Trenczed T: **Biological mediators of insect immunity.** *Annu Rev Entomol* 1997, **42**:611–643.
61. Ferrandon D, Imler JL, Hetru C, Hoffmann JA: **The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections.** *Nat Rev Immunol* 2007, **7**:862-874.
62. Nichol H, Law JH, Winzerling JJ: **Iron metabolism in insects.** *Annu Rev Entomol* 2002, **47**:535-559.
63. Rodrigues A, Bacci M, Mueller UG, Ortiz A, Pagnocca FC: **Microfungal Weeds in the Leafcutter Ant Symbiosis.** *Microb Ecol* 2008, **56**:604-614.
64. Poulin R, Morand S: *Parasite biodiversity.* Washington: Smithsonian Books; 2004.
65. Jackson DE, Ratnieks FLW: **Communication in ants.** *Curr Biol* 2006, **16**:570-574.
66. Vogt RG: **The molecular basis of pheromone reception: its influence on behavior.** In *Pheromone Biochemistry.* Edited by Prestwich GD, Blomquist GJ. New York: Academic Press; 1987:385-431.
67. Krieger MJB, Ross KG: **Identification of a Major Gene Regulating Complex Social Behavior.** *Science* 2002, **295**:328-332.
68. Kamikouchi A, Morioka M, Kubo T: **Identification of honeybee antennal proteins/genes expressed in a sex- and/or caste selective manner.** *Zool Sci* 2004, **21**:53-62.
69. Flower DR: **The lipocalin protein family: structure and function.** *Biochem J* 1996, **318**:1-14.

70. Ozaki M, Wada-Katsumata A, Fujikawa K, Iwasaki M, Yokohari F, Satoji Y, Nisimura T, Yamaoka R: **Ant nestmate and non-nestmate discrimination by a chemosensory sensillum.** *Science* 2005, **309**:311-314.
71. Forêt S, Wanner KW, Maleszka R: **Chemosensory proteins in the honey bee: Insights from the annotated genome, comparative analysis and expressional profiling.** *Insect Biochem Mol Biol* 2007, **37**:19-28.
72. Todres E, Nardi JB, Robertson HM: **The tetraspanin superfamily in insects.** *Insect Mol Biol* 2000, **9**:581–590.
73. Maecker HT, Todd SC, Levy S: **The tetraspanin superfamily: molecular facilitators.** *FASEB J* 1997, **11**:428–442.
74. Thany SH, Crozatier M, Raymond-Delpech V, Gauthier M, Lenaers G: **Apis α 2, Apis α 7-1 and Apis α 7-2: Three new neuronal nicotinic acetylcholine receptor α -subunits in the honeybee brain.** *Gene* 2005, **344**:125–132.
75. Matsuda K, Buckingham SD, Kleier D, Rauh JJ, Grauso M, Sattelle DB: **Neonicotinoids: Insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors.** *Trends Pharmacol Sci* 2001, **22**:573–580.
76. Siqueira CG, Bacci M, Pagnocca FC, Bueno OA, Hebling MJA: **Metabolism of plant polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of the ant *Atta sexdens* L.** *Appl Environ Microbiol* 1998, **64**:4820-4822.
77. Silva A, Bacci M, Siqueira CG, Bueno OC, Pagnocca FC, Hebling MJA: **Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources.** *J Insect Physiol* 2003, **49**:307-313.
78. Zhou G, Somasundaram T, Blanc E, Parthasarathy G, Ellington WR, Chapman MS: **Transition state structure of arginine kinase: implications for catalysis of biomolecular reactions.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, **95**:8449-8454.

79. Brown AE, Grossman SH: **The mechanism and modes of inhibition of arginine kinase from the cockroach (*Periplaneta americana*)**. *Arch Insect Biochem Physiol* 2004, **57**:166-177.

Tables

Table 1 - EST processing.

Sequence	Number	%
Reads	4,482	100.00
Filtered by quality	1,241	27.69
Filtered by size	38	0.85
High-quality (after filtering)	3,203	71.46
Unique Sequences (US)	2,006	100.00
Singlets	1,666	83.05
Contigs*	340	16.95

*Contigs were composed by 1,537 reads.

Table 2 - Contigs with high read number in the *Atta laevigata* cDNA library.

Contig	Reads	Rate*	Best hit (organism)	Function ⁺
311	123	76.9	COX I (<i>Myrmica rubra</i>)	1
235	52	32.5	Similar to paramyosin CG5939-PA (<i>Apis mellifera</i>)	2
183	47	29.4	ATP synthase F0 subunit 6 (<i>Camponotus sayi</i>)	1
037	43	26.9	COX III (<i>Bombyx mandarina</i>)	1
294	40	25.0	Similar to muscle protein 20 CG4696-PA (<i>Apis mellifera</i>)	2
056	30	18.8	COX II (<i>Atta colombica</i>)	1
330	30	18.8	Actin-5 (<i>Bactrocera dorsalis</i>)	2
289	25	15.6	Similar to limpet CG32171-PD (<i>Apis mellifera</i>)	3
337	20	12.5	Muscle LIM protein (<i>Nasonia vitripennis</i>)	3
273	19	11.9	Cytochrome b (<i>Formica pratensis</i>)	1
268	14	8.8	Similar to muscle LIM protein at 84B (<i>Apis mellifera</i>)	3
046	14	8.8	Similar to CG5023-PA (<i>Apis mellifera</i>)	3
015	13	8.1	Troponin I (<i>Apis mellifera</i>)	2
116	12	7.5	Similar to muscle LIM protein at 84B (<i>Apis mellifera</i>)	3
069	11	6.9	NADH dehydrogenase subunit 4 (<i>Harpisquilla harpax</i>)	1
328	10	6.3	AGAP005400-PA (<i>Anopheles gambiae</i>)	3

* Number of reads divided per 1.6 which is the mean number of reads (3,203) per US (2,006).

⁺**1.** ATP synthesis coupled to redox reactions in mitochondria (273 reads). **2.** Muscle or cytoskeleton structure (135 reads). **3.** Transcription regulatory processes through homeobox or signaling proteins (95 reads).

Table 3 - Candidate genes for the control of pest leafcutter ants.

Process [GenBank Acc*]	Description	US
Antixenobiosis [JI332418-JI332429, JI332686-JI332710]	Cytochrome P450 activity	25
	Cell detoxification	12
Development and longevity [JI332430- JI332440, JI332711-JI332736]	Development, growth and differentiation	18
	Oxidative stress protection	13
	Juvenile hormone binding and synthesis	6
Immunity and resistance to pathogens [JI332441-JI332452, JI332737-JI332761]	Immune response	29
	Serine protease inhibitor	4
	Melanization and pathogen encapsulation	4
Communication [JI332453-JI332457, JI332762-JI332767]	Pheromone / odorant binding and transport	11
Signaling [JI332458, JI332459, JI332768-JI332773]	Generation and stability of signaling	6
	Acetylcholine receptor	2
Behavior [JI332460, JI332461, JI332774-JI332782]	Courtship and behavior	5
	Learning and memory	3
	Others	3
Polysaccharide metabolism [JI332462, JI332463, JI332783]	Glycogen and starch degradation	3
Intermediary metabolism [JI332464, JI332465]	Arginine kynase activity	2
Total		146

*Transcriptome Shotgun Assembly database.

Figures

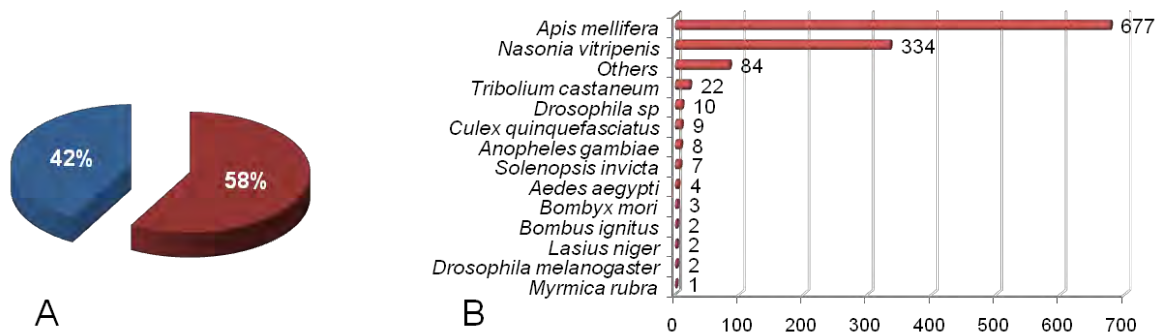


Figure 1 - Summary of Blastx search results for *Atta laevigata* gene sequences.

(A) Percent of *Atta laevigata* sequences with significant matches (red, Blastx E-value $\leq 10^{-5}$) and non-significant matches (blue) in the GenBank. (B) Number of best hits found in different biological species.

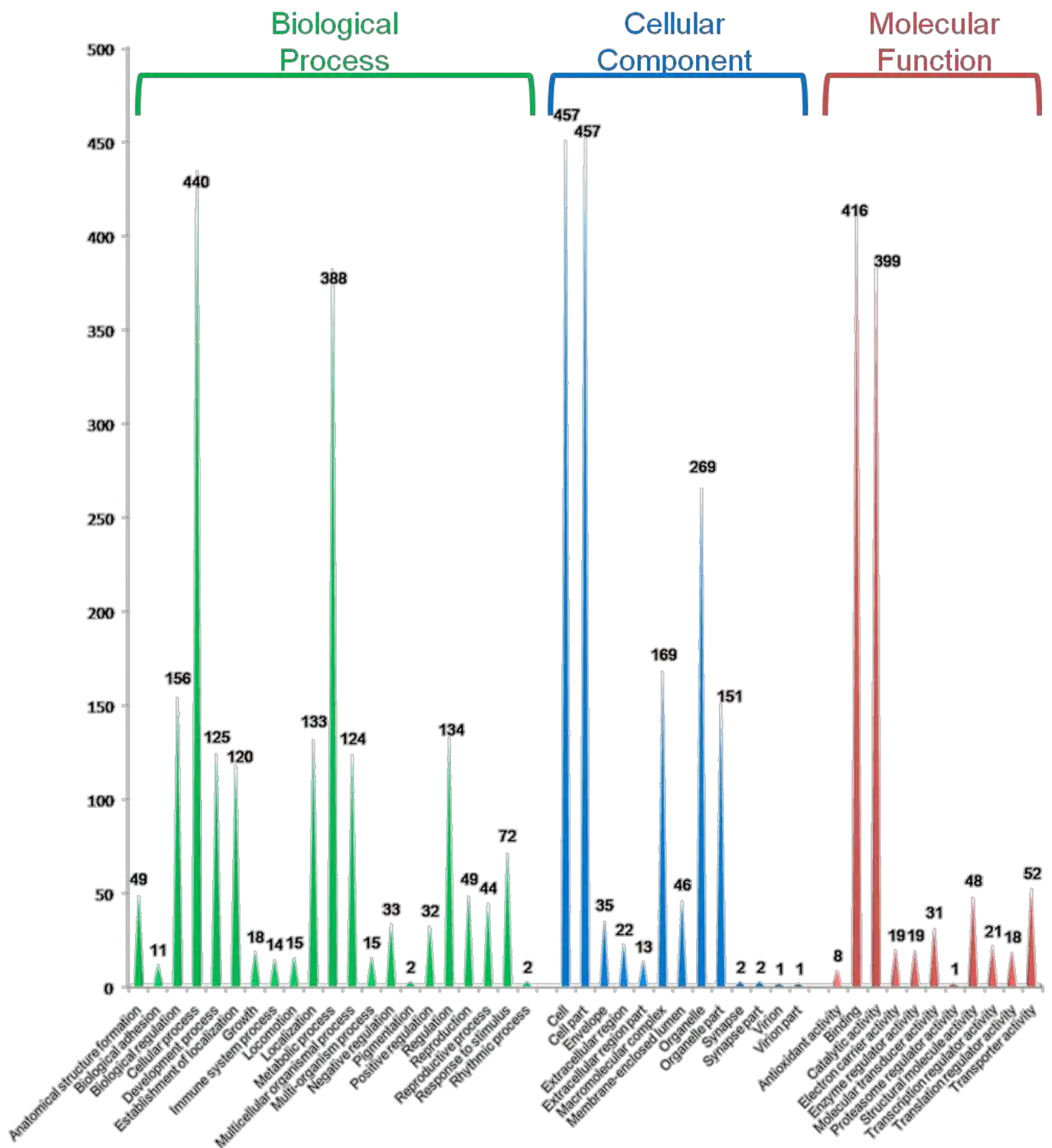


Figure 2 - Distribution of GO terms.

The graphic displays the GO terms at level 2 for each category.

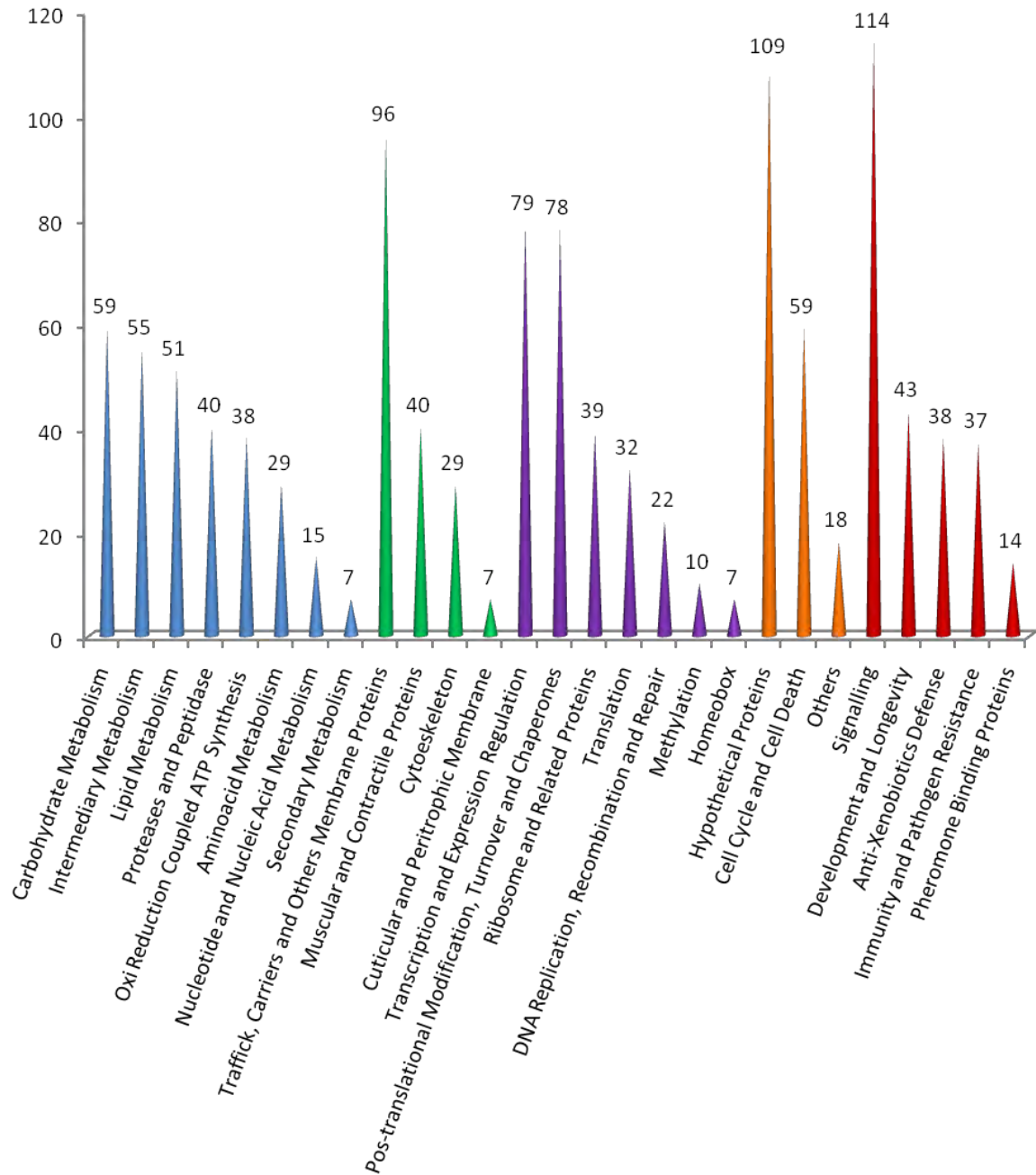


Figure 3 - Functional classification of *Atta laevigata* genes.

The graphic displays the 1,165 US grouped in 27 functional categories. The colors represent major functions: blue – metabolism, green – structural, - purple – regulation, orange – other, red – control candidates.

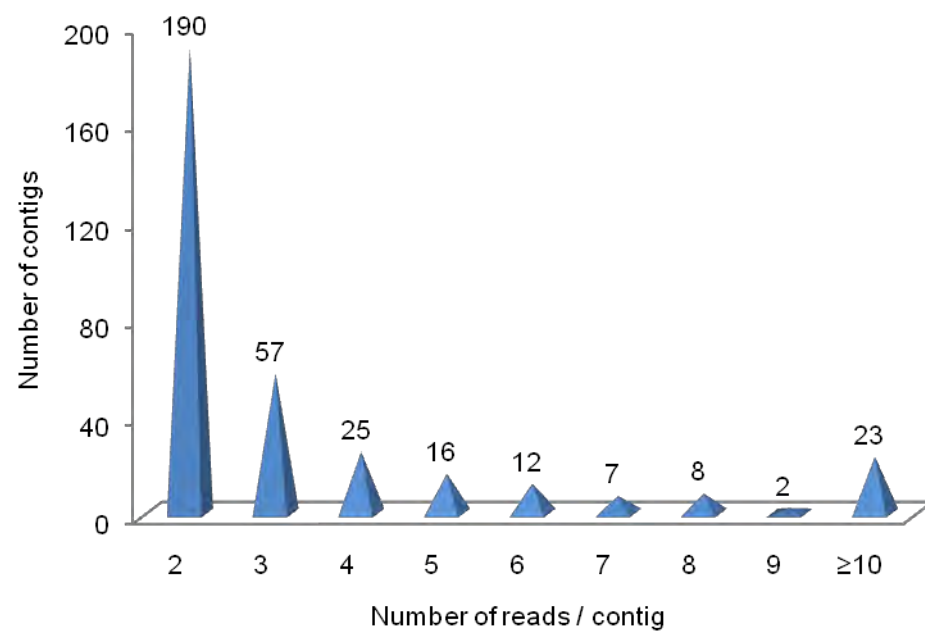


Figure 4 - Contig amount as function of number of reads per contig.

The graphic shows the number of reads used in the assembly of the 340 contigs.

Capítulo 2

Genoma mitocondrial da formiga cortadeira *Atta laevigata* (Formicidae: Attini)

INTRODUÇÃO

A mitocôndria é conhecida como a “fonte de energia celular”, mas sabe-se que seu papel vai muito além do suprimento de energia, influenciando e participando em vários processos dentro da célula, como manutenção do potencial redox, metabolismo intermediário, produção de espécies reativas de oxigênio e disparo do processo de apoptose (SCHEFFLER, 2008).

O papel de mutações no DNA mitocondrial em desordens e doenças humanas foi demonstrado a partir dos trabalhos de Wallace e colaboradores (1988) e Holt e colaboradores (1988) e o acúmulo dessas alterações nos mitogenomas está sendo responsabilizado por processos de envelhecimento e senescência (CRIMI; RIGOLIO, 2008).

Inúmeros trabalhos envolvendo biofísica, biologia celular, genética e fisiologia têm sido publicados mostrando que apesar de papéis funcional e biológico conservados e da origem única a partir de uma eubactéria simbiote, a organização estrutural do genoma mitocondrial é altamente diversa entre eucariotos e sua evolução apresenta tendências bem divergentes em algumas linhagens (BURGER et al., 2003; SCHEFFLER, 2008).

O DNA mitocondrial animal tem sido amplamente utilizado em estudos populacionais, evolutivos e filogenéticos (BOORE et al., 1995; BOORE et al., 1998; BOORE; BROWN, 1998; CHIOTIS et al., 2000; HU et al., 2004; SIMON et al., 2006; LAVROV, 2007; DOWTON et al., 2009; PIGANEAU; EYRE-WALKER, 2009), provando sua utilidade como marcador para sistemática. As vantagens para esse uso relacionam-se ao grande número de cópias por célula, pouca recombinação, alta taxa mutacional, haploidia e herança predominantemente materna (AVISE et al., 1987; MORITZ et al., 1987; SIMON et al., 2006). Além disso, atualmente é mais fácil obter sua sequência, apresenta conteúdo gênico conservado e permite comparações diretas entre diferentes estudos (SIMON et al., 2006).

Um grande e rápido aumento no número de mitogenomas sequenciados (CUROLE; KOCHER, 1999) foi incentivado por esse interesse crescente em

reconstruções filogenéticas utilizando genomas mitocondriais, juntamente com os avanços nas tecnologias e diminuição dos custos de sequenciamento de DNA. Até o momento, 2473 genomas mitocondriais completos de distintas espécies foram publicados, dentre os quais 227 são de insetos, sendo 18 de himenópteros (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, acesso em janeiro de 2011) e somente três são provenientes de espécies de formigas *Solenopsis* (GOTZEK et al., 2010) e um proveniente da formiga *Pristomyrmex punctatus* (HASEGAWA et al., não publicado).

Apesar da importância e utilidade do DNA mitocondrial, algumas limitações técnicas têm impedido a geração de dados de mitogenomas de alguns grupos de organismos e tipos específicos de tecidos (JEX et al., 2010). A superação de muitos desses obstáculos, como aplicabilidade para animais bem pequenos e utilização de materiais e equipamentos comuns aos laboratórios de biologia molecular (ZHANG; HUANG, 2008), tem sido possível utilizando-se amplificação por PCR longo aliada ao sequenciamento dos *amplicons* obtidos por *primer walking* (JEX et al., 2010).

O presente trabalho teve como objetivo a descrição do genoma mitocondrial de *Atta laevigata*, primeiro mitogenoma descrito para a tribo Attini, obtido por sequenciamento de ESTs e *primer walking*.

MATERIAL E MÉTODOS

A partir do sequenciamento de 4704 clones de uma biblioteca de cDNA construída de operárias e soldados de *A. laevigata* (Capítulo 1), as sequências parciais dos seguintes genes mitocondriais foram obtidas: *COI*, *COII*, *ATPase 6*, *COIII*, *ND5*, *ND4*, *Cytb* e *ND1*, totalizando 7576 pb. Essas sequências foram alinhadas com o mitogenoma de *Apis mellifera* (Figura 1), utilizando BioEdit (HALL, 1999) para verificação das regiões faltantes e montagem de estratégias para obtenção do mtDNA completo.

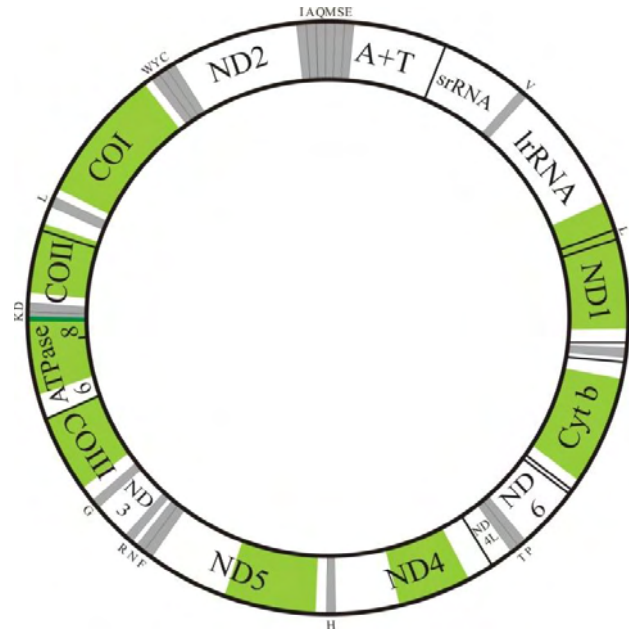


Figura 1 – Mapa do genoma mitocondrial de *A. mellifera* (adaptado de CROZIER; CROZIER, 1993), destacando as regiões mitocondriais obtidas por sequenciamento de ESTs de *A. laevigata* (verde, 46% do mitogenoma de *A. mellifera*).

O restante do mitogenoma foi obtido por *primer walking*. Um soldado foi utilizado para extração de DNA (MARTINS et al., 2007) e *amplicons* (tamanho variando de 200 a 2400 pb) gerados em 23 reações separadas de partes do mtDNA foram sequenciados.

Primers “universais” (SIMON et al., 1994) foram utilizados para obtenção de algumas regiões faltantes. Também foram desenhados *primers* a partir das novas sequências obtidas e de sequências de mitogenomas disponíveis para *Solenopsis* e *Atta cephalotes*. Os *primers* foram desenhados de forma a permitir sobreposição entre os *amplicons* e varredura de todo o genoma (Tabela 1 e Figura 2).

Para as amplificações, o *kit* PureTaq RTG (GE Healthcare) foi utilizado para reações com volume final de 25 μ L e 5 pmol de cada *primer*. O DNA foi diluído 1:10 e 1 μ L foi usado em cada reação. O termociclador foi ajustado para uma desnaturação inicial de 94° C por 3 min, seguida de 35 ciclos de 94° C por 30 seg, temperatura de anelamento variando de 45 a 53° C por 30 seg (dependendo dos *primers* utilizados) e 60° C por 1 min e 30 seg. As amostras foram visualizadas em gel de agarose 1 %, purificadas com o *kit* GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) e quantificadas em NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

As reações de sequenciamento foram feitas utilizando-se BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) em volume final de 10 μ L, sendo 2

μL do premix, 1 μL de tampão de diluição, 3,2 pmol de *primer* e DNA em quantidade recomendada pelo fabricante. O termociclador foi ajustado para uma desnaturação inicial de 96° C por 2 min, seguida de 28 ciclos de 96° C por 45 seg, 50° C por 30 seg e 60° C por 4 min. Os produtos de PCR foram sequenciados em ambas as direções, utilizando sequenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems).

Os produtos de PCR purificados que não geraram sequências de qualidade foram clonados em *Escherichia coli* DH10B, utilizando-se o *kit* CloneJET PCR Cloning Kit (Fermentas), de acordo com recomendações do fabricante. As reações de miniprep foram feitas de acordo com Zhou e colaboradores (1990), visualizadas em gel de agarose 1 % e quantificadas em NanoDrop. As reações de sequenciamento foram preparadas conforme descrição anterior.

Todas as sequências obtidas foram limpas utilizando o sistema de geração de *pipeline* EGene (DURHAM et al., 2005). As sequências foram filtradas por qualidade usando valores phred > 20 e 90% de percentual de identidade mínima na janela. As sequências filtradas obtidas de clones foram mascaradas contra o vetor. Todas foram selecionadas por tamanho (> 100 pb) e montadas utilizando o programa CAP3 (HUANG; MADAN, 1999).

O genoma foi anotado utilizando DOGMA (WYMAN et al., 2004), um pacote de anotação baseado na *web* que faz buscas BLAST contra banco de dados personalizado. Toda anotação gerada foi verificada manualmente. As regiões codificadoras foram submetidas ao ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) e comparadas com o genoma mitocondrial de *Solenopsis invicta* (número de acesso NC_014672) e de outros himenópteros. Os rRNAs foram identificados por comparação com sequências completas de rRNA de *Solenopsis* e *Pristomyrmex punctatus*, usando a ferramenta ClustalW presente no BioEdit.

A identificação dos tRNAs foi validada pelo programa tRNAScan-SE (LOWE; EDDY 1997) (especificando como fonte *mitochondrial/chloroplast DNA* e usando como código genético para predição de isotipos de tRNA o mitocondrial de invertebrados) e pelo programa ARWEN (LASLETT; CANBÄCK, 2008), utilizando os parâmetros com valores *default*.

O conteúdo de AT e a composição de bases de cada posição dos códons foram obtidos pelo programa MEGA 4 (TAMURA et al., 2007).

Tabela 1 – Relação de *primers* utilizados, temperatura de anelamento (Ta) e região de amplificação.

#	Primer	Fonte	Sequência (5'-3')	Ta (°C)	Região
1	ANTF ANTR	MARTINS et al., 2007 MARTINS et al., 2007	ATTCATTCTTATCTTGAAATATTATTTC TTCATAAGTTTCAGTATCATTTGGTG	47	COI_COII
2	C2-J3696 A8-N3931	SIMON et al., 1994 M.L.Lyra (com.pess.)	GAAATTTGTGGAGCAAAATCATAG AATTGGTGCTATTTGAGG	50	COII_ATPase8
3	TL2-J3034 TK-N3785	SIMON et al., 1994 SIMON et al., 1994	AATATGGCAGATTAGTGCA GTTTAAGAGACCAGTACTTG	50	COII_tRNAK
4	SR-J14941 TM-N193	OLIVEIRA et al., 2006 SIMON et al., 1994	AGCCAAAATAAAACTTTA TGGGGTATGAACCCAGTAGC	45	Região controle
5	C2-J3400 COIIFRC	SIMON et al., 1994 Este estudo	ATTGGACATCAATGATATTGA TAACATGAATTCCTGGGAATCC	50	COII_ATPase8_ATPase6_COIII
6	C2-J3696 COIIFRC	SIMON et al., 1994 Este estudo	GAAATTTGTGGAGCAAAATCATAG TAACATGAATTCCTGGGAATCC	50	COII_ATPase8_ATPase6_COIII
7	COIIF atND5N	Este estudo Este estudo	GGATTCACGGAATTCATGTTA TTAACGGTGTGCATATTCCTTACG	50	COIII_NADH3_NADH5
8	atND4J AtCytBN	Este estudo Este estudo	CAGGAGCCTCAACATGAGC CCAAGTAATGAGCCAAAATTG	50	NADH4_NADH4L_NADH6_Cytb
9	AtCytBJ atND1N	Este estudo Este estudo	CCTAATAAACTTGGGGGAGTAAT GATGAGTTAATGTATTATTGTTGA	50	Cytb_NADH1
10	N1J12595-rev LRN13000	Este estudo SIMON et al., 1994	CGTTCTAATAAAGTTAAAATGCTAC TTACCTTAGGGATAACAGCGTAA	50	NADH1_16S
11	N1J12595-rev LRN13889-mod	Este estudo Este estudo	CGTTCTAATAAAGTTAAAATGCTAC TGTAACCTTTTGTATCAGGGTT	50	NADH1_16S
12	LRJ13889-mod at12SN	Este estudo Este estudo	AACCTTGATACAAAAGGTACA AAACTAGGATTAGATACCCTA	50	16S_12S
13	atLRJ at12SN	Este estudo Este estudo	GATTTAAAAGTCGAACAGAC AAACTAGGATTAGATACCCTA	50	16S_12S
14	atND5J atND4N	Este estudo Este estudo	GAGACAGGAGTTGGAGCTGCTA AAAGCTCATGTTGAGGCTCC	45-53	NADH5_NADH4
15	atND2J atCOIN126	Este estudo Este estudo	TCTTCTATTAATCAATCTAGATG ACATGATCTTAATTCTAATCG	47	NADH2_COI
16	atTKJ atA6N	Este estudo Este estudo	CATTAAATGACTGAAAAAGTATTG GGATCAAAAATAGAAAAATAAATTTATTATC	47	tRNAK_ATPase8_ATPase6

17	atA8J atA6N	Este estudo Este estudo	ATACCTCAAATAATACC GGATCAAAAATAGAAAATAAATTTATTATC	47	ATPase8_ATPase6
18	atTGJ atND5N-term	Este estudo Este estudo	GTATAAATATTACATTTAATTTC AGATTATATAGAGTAGTGATAAAC	47	tRNAG_NADH3_NADH5
19	atND4J-beg atND6N	Este estudo Este estudo	GAATAATAATTACACCCCTAAC GAGTATATATAATTTTCTGATC	47	NADH4_NADH4L_NADH6
20	SR-J14941 atND2N	OLIVEIRA et al., 2006 Este estudo	AGCCAAAATAAAACTTTA TGAAAAAGGAGGTATGCCTG	52	Região controle_NADH2
21	at12SJ TM-N193	Este estudo SIMON et al., 1994	TGGATTATCATTTATAAGACAAATTCCTC TGGGGTATGAACCCAGTAGC	52	12S_Região controle_tRNAM
22	TMJ210-mod atND2N	Este estudo Este estudo	AGGGTATGAACCTAGTAGCTT TGAAAAAGGAGGTATGCCTG	50	tRNAM_NADH2
23	at12SJ atTWN	Este estudo Este estudo	TGGATTATCATTTATAAGACAAATTCCTC GGTTAATAGTTTAAATTTAAC	47	12S_Região controle_tRNAM

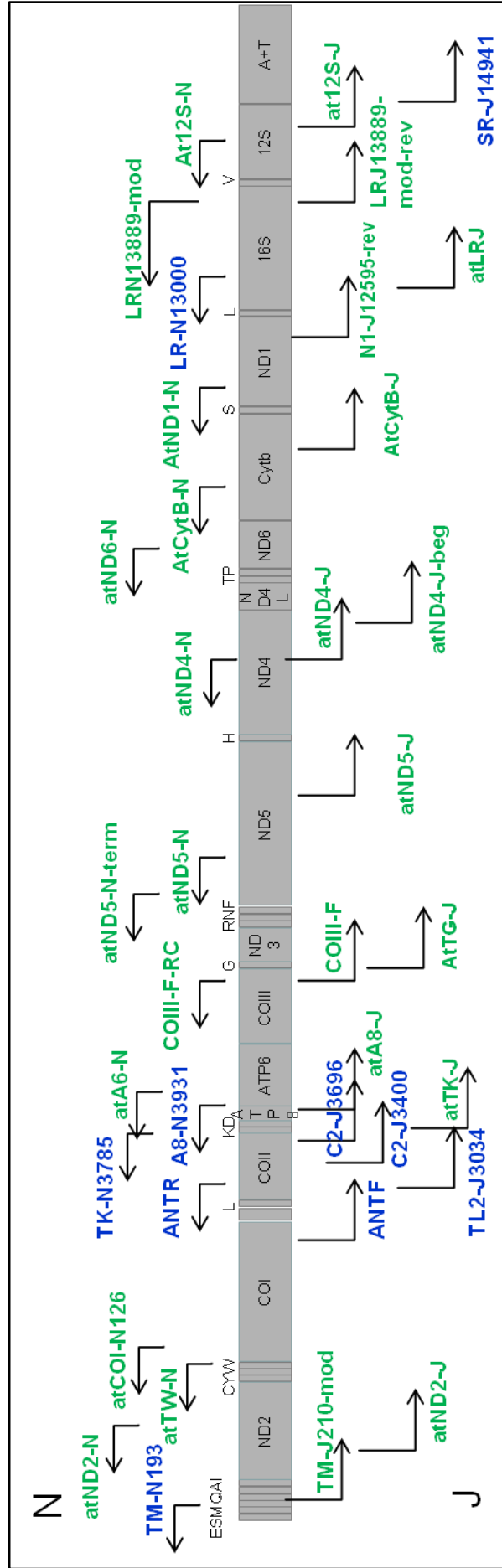


Figura 2 – Mapa do mitogenoma de *A. laevigata*, destacando as regiões de anelamento dos primers utilizados. A figura mostra as regiões de anelamento dos primers desenhados para esse estudo (verdes) e dos provenientes da literatura (azuis). Desenho: Cynara de Melo Rodvalho e Mariana Lúcio Lyra.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primer walking

Todas as 23 combinações de *primers* apresentadas geraram fragmentos (Tabela 2), apesar de nem todos possuírem o tamanho esperado e gerarem sequências de boa qualidade, mesmo após clonagem.

Tabela 2 – Relação de *primers* utilizados e tamanhos obtidos dos *amplicons*.

Reação	Primers	pb	Reação	Primers	pb
1	ANTF ANTR	761	13	atLRJ at12SN	1798
2	C2-J3696 A8-N3931	244	14	atND5J atND4N	1418
3	TL2-J3034 TK-N3785	983	15	atND2J atCOIN126	1136
4	SR-J14941 TM-N193	1000*	16	atTKJ atA6N	759
5	C2-J3400 COIIIFRC	2393	17	atA8J atA6N	217
6	C2-J3696 COIIIFRC	2415	18	atTGJ atND5N-term	1368
7	COIIIF atND5N	2103	19	atND4J-beg atND6N	1123
8	atND4J AtCytBN	2140	20	SR-J14941 atND2N	2000*
9	AtCytBJ atND1N	1035	21	at12SJ TM-N193	1000*
10	N1J12595-rev LRN13000	882	22	TMJ210-mod atND2N	2000*
11	N1J12595-rev LRN13889-mod	1872	23	at12SJ atTWN	500*
12	LRJ13889-mod at12SN	696			

*Estes tamanhos são aproximados e foram obtidos por géis de agarose corados com GelRed e não pelo sequenciamento do genoma.

Composição do genoma mitocondrial

Até o momento um único *contig* foi obtido e 17920 nucleotídeos (mais de 95% do mitogenoma) foram sequenciados e anotados. Provavelmente, apresenta tamanho total de 18800 pb, calculado tanto pelas estimativas de tamanho das regiões faltantes, como pelo tamanho da sequência mitocondrial de *Atta cephalotes* depositada no GenBank (número de acesso HQ415764, porém ainda não anotada).

O mitogenoma está incompleto na região controle (região rica em AT), a qual apresenta grande dificuldade de amplificação e sequenciamento em Hymenoptera (CASTRO et al., 2006; CAMERON et al., 2008; DOWTON et al., 2009). Os mesmos 13 genes codificadores de proteínas e as duas subunidades ribossomais presentes em outros animais (BOORE, 1999; WALLACE, 2005) foram encontrados e seus tamanhos e localizações estão mostrados na Figura 3 e na Tabela 3. Dos 22 tRNAs comumente presentes em mtDNAs de animais, somente 19 foram identificados.

Tabela 3 – Anotação do genoma mitocondrial de *Atta laevigata* e conteúdo de AT.

Gene	Posição*	Tamanho (pb)	Códon iniciador	Códon finalizador	% AT	IGS**
COI	1-1533	1533	ATG	TAA	70,3	160
tRNAL ₂	1694-1764	71			78,9	0
COII	1765-2431	667	ATT	T	72,6	213
tRNAK	2645-2714	70			82,9	236
tRNAD	2951-3019	69			88,4	167
ATP8	3187-3373	187	ATA	T	84,2	-2
ATP6	3372-3909	538	ATG	T	76,4	227
COIII	4137-4928	792	ATG	TAA	69,8	215
tRNAG	5144-5208	65			93,8	-3
ND3	5206-5562	357	ATA	TAA	79,0	56
tRNAA	5619-5684	66			87,9	85
tRNAR	5770-5843	74			86,5	207
tRNAN	6051-6120	70			82,9	57
tRNAE	6178-6245	68			95,6	-8
tRNAF	(6238-6306)	69			91,3	260
ND5	(6567-7976)	1410	ATA	TAA	78,7	10
tRNAH	(7987-8059)	73			83,6	124
ND4	(8184-9416)	1233	ATA	TAA	79,7	247
ND4L	(9664-9936)	273	ATA	TAG	86,8	14
tRNAT	9951-10020	70			90,0	1
tRNAP	(10022-10094)	73			85,0	84
ND6	10179-10739	561	ATG	TAA	84,0	70
Cytb	10810-11928	1119	ATG	TAA	73,8	257
tRNAS	12186-12255	70			87,1	324
ND1	(12580-13527)	948	ATA	TAA	78,7	417
tRNAL ₁	(13945-14002)	58			79,3	51
16S	(14054-15421)	1368			83,2	95
12S	(15517-15970)	454			82,2	
tRNAI		75			84,0	90
tRNAQ	()	70			80,0	189
ND2		981	ATT	TAA	87,2	8
tRNAW		70			85,7	11
tRNAC	()	70			97,1	118
tRNAY	()	66			84,8	202
Total***		17920			80,6	

* Números de posição referem-se à fita J. Parênteses indicam genes codificados na fita N.

** IGS corresponde às sequências não codificadoras entre dois genes adjacentes. Na tabela, entretanto, os valores indicam o número de nucleotídeos entre o gene da linha correspondente e o próximo gene, podendo ser um valor positivo (presença de IGS) ou números negativos (nucleotídeos que se sobrepõem entre genes adjacentes).

*** Refere-se ao total de nucleotídeos sequenciados e anotados até o momento.

Os três métodos usados para identificação de tRNAs diferiram em sensibilidade e acurácia. ARWEN e DOGMA superestimaram o número de tRNAs, mesmo utilizando COVE *cutoff score* = 30. Ao contrário, tRNAScan não identificou os tRNAs para leucina1, arginina e serina (presente na junção *Cytb-ND1*), mas

identificou dois tRNAs adicionais para serina na mesma posição, porém em orientação oposta de outros tRNAs descritos (*tRNAG* e *tRNAW*). Eles foram considerados falsos positivos por sobreposição com tRNAs presentes em blocos relativamente conservados (junções *COIII-ND3* e *ND2-COI*) de himenópteros em relação ao ancestral pancrustáceo (DOWTON et al., 2009; GOTZEK et al., 2010).

A fita mais (J) conteve a maioria dos genes, codificando 21 genes (nove codificadores de proteínas e 12 tRNAs), enquanto a fita menos (N) codifica os 13 genes restantes (quatro codificadores de proteínas, sete tRNAs e duas subunidades ribossomais).

O conteúdo de AT foi de 80,6 % (Tabela 2), pouco maior que o de *Solenopsis*, mas dentro do padrão encontrado para Hymenoptera (CAMERON et al., 2008; GOTZEK et al., 2010). Diferentes partes do genoma apresentaram seu conteúdo variando de 69,8 % (*COIII*) até 97,1 % (tRNAC).

O conteúdo de nucleotídeos para os genes codificadores é apresentado na Figura 4. A terceira posição do códon foi a que apresentou o maior conteúdo de AT (82,5 %), enquanto a primeira e segunda posições possuíram valores mais baixos (79,8 e 73,3 %, respectivamente), inclusive do que apresentado pelo mitogenoma inteiro. Comparando-se com o mtDNA de *Solenopsis* (GOTZEK et al., 2010), a tendência para T é mantida nas regiões codificadoras, entretanto *Solenopsis* possui maior valor para T na segunda posição do códon, enquanto para *A. laevigata* isso acontece na terceira posição. Outra discrepância refere-se ao conteúdo de G que em *Atta* é menor em todas as posições.

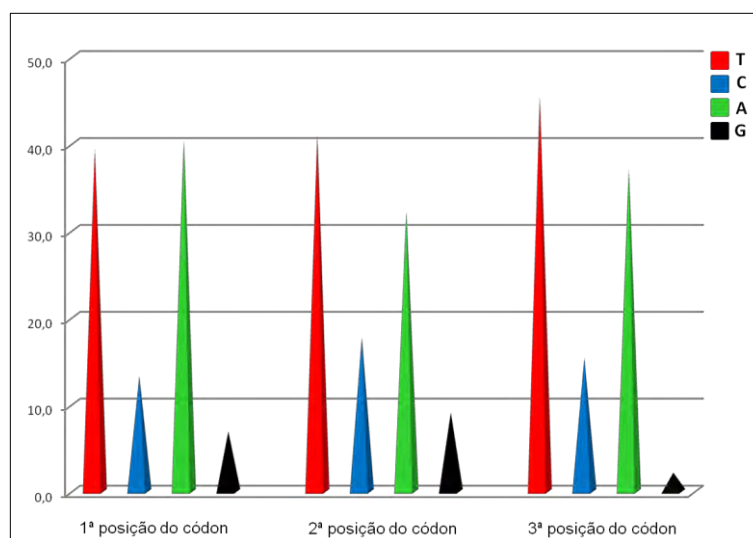


Figura 4 – Média do conteúdo de nucleotídeos em genes codificadores de proteínas. Percebe-se uma tendência para T e A em todas as posições do códon.

Estrutura gênica e organização do genoma

Consistente com outros mitogenomas de himenópteros publicados, o genoma mitocondrial de *A. laevigata* contém os 13 genes codificadores de proteínas e as duas subunidades ribossomais na mesma ordem e direção da sequência hipotética do ancestral pancrustáceo (Figura 5).

Foram identificados 19 tRNAs, sendo que os *tRNAS_L*, *tRNA_V* e *tRNA_M* não se encontram na mesma posição descrita para o mitogenoma ancestral (Figura 5). Como o sequenciamento da região controle ainda não foi possível, não há como afirmar se esses tRNAs migraram para a região flangeadora da região controle ou se foram perdidos. Todavia, com base nos rearranjos ocorridos em *P. punctatus* e *Solenopsis*, provavelmente os *tRNA_M* e *tRNA_V* encontram-se na mesma posição descrita para essas formigas. Apesar das três formigas pertencerem a Myrmicinae, somente *Solenopsis* apresenta a mudança do *tRNA_N* para a junção 12S-ND2, envolvendo, inclusive, uma inversão.

Os rearranjos para os tRNAs *S_L*, *V*, *M* e *N* já foram descritos para outros himenópteros (DOWTON et al., 2009) e podem constituir eventos independentes. Em muitos casos não se sabe a posição de destino do tRNA translocado, ocorreram em taxa distantes de Formicidae, não sendo compartilhadas por outros representantes do grupo em que ocorreram. Apesar de convergências serem consideradas raras (BOORE; BROWN, 1998), Dowton e colaboradores (2009) analisaram 67 rearranjos mitocondriais de Hymenoptera e encontraram que a maioria deles é independentemente derivada e três constituem derivações convergentes.

Rearranjos do genoma mitocondrial são eventos mais comuns entre os invertebrados do que entre vertebrados, bem como tRNAs são mais móveis do que genes codificadores, provavelmente por diferenças de tamanho e diferenças seletivas (DOWTON et al., 2009). Há alguns modelos que explicam os diferentes tipos de rearranjos, como o modelo de duplicação/perda randômica (MORITZ et al., 1987).

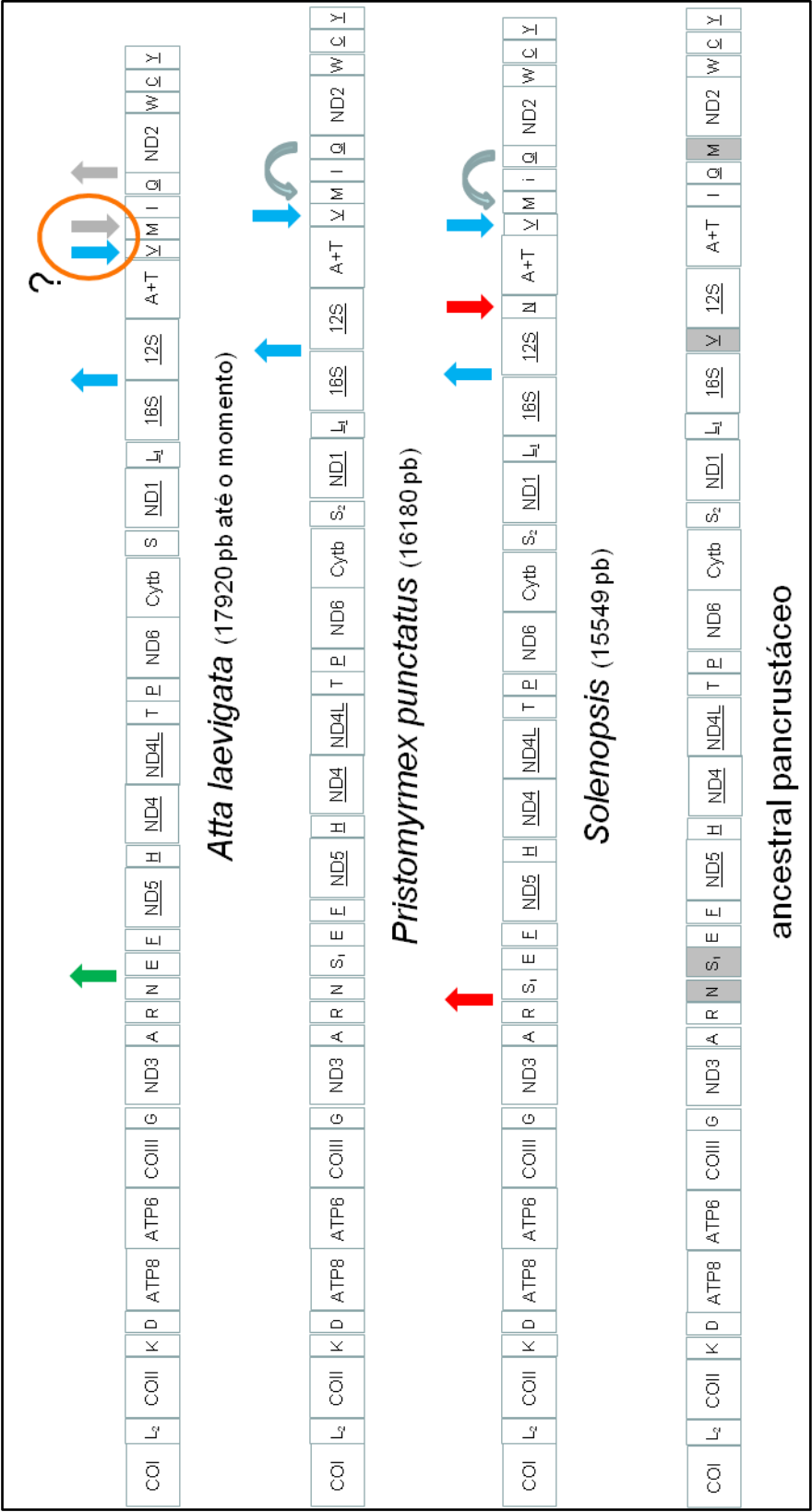


Figura 5 – Organização do genoma mitocondrial de *A. laevigata* comparado aos mitogenomas do ancestral pancrustáceo e de outras formigas. Todos os genes codificadores estão na mesma orientação e posição encontradas em outros himenópteros e na sequência hipotética ancestral. Genes codificados na fita N estão sublinhados. Genes sombreados indicam rearranjos em relação à sequência ancestral. As setas indicam mudanças de posição dos tRNAs em relação ao ancestral pancrustáceo: verde – saída do *tRNA*_{S₁} para posição derivada desconhecida; azul – *tRNA*_V muda da junção 16S-12S para a junção 12S-ND2; cinza – *tRNA*_I-*tRNA*_Q-*tRNA*_M torna-se *tRNA*_M-*tRNA*_I-*tRNA*_Q; vermelho – *tRNA*_N muda do cluster *tRNA*_A-*tRNA*_N-*tRNA*_S-*tRNA*_E-*tRNA*_F para acima do 12S; círculo laranja – provável posição de destino do *tRNA*_V e do *tRNA*_M em *A. laevigata*, com base nos rearranjos ocorridos em *P. punctatus* e *Solenopsis*.

Grande parte dos rearranjos encaixa-se nesse modelo, todavia ele não é capaz de explicar todas as translocações, nem inversões. De qualquer forma, dados de rearranjos gênicos entre as várias espécies de Hymenoptera, com mitogenomas completamente ou parcialmente sequenciados, concordam com a ideia de que diferenças de organização dos genomas são seletivamente neutras (DOWTON et al., 2009). Os rearranjos descritos para o genoma mitocondrial de *A. laevigata*, bem como os identificados nas outras formigas sequenciadas, corroboram essa proposição.

As estruturas preditas dos 19 tRNAs encontrados são apresentadas na Figura 6. Todos os tRNAs possuem a estrutura característica de trevo, exceto o *tRNAL₁* que perdeu uma alça por apresentar o menor conteúdo de nucleotídeos (58). Todos os demais apresentam entre 65 e 75 pb e os anticódons são idênticos aos de *Solenopsis*, exceto para *tRNAN* que possui anticódon GTT, enquanto *Solenopsis* possui ATT.

A região codificadora para *16S* possui 1368 pb. Por estar próxima à região controle, a subunidade menor *12S* não foi completamente sequenciada, devendo faltar entre 300 e 350 nucleotídeos. O alinhamento dessas regiões com as sequências de *Solenopsis* e *P. punctatus* mostrou vários blocos de sequências altamente conservados, sugerindo que as estruturas secundárias estão preservadas. O conteúdo de AT é de 83,2 % para *16S* e de 82,2 % para *12S*, porcentagens semelhantes às de outros himenópteros que normalmente apresentam o conteúdo de AT para as subunidades ribossomais maior do que o mtDNA (CASTRO; DOWTON, 2005; CASTRO et al., 2006).

Os genes codificadores de proteínas são iniciados por ATG, ATA e ATT, códons iniciadores comuns para mitocôndrias de invertebrados. A maioria dos genes termina em TAA e um gene (*ND4L*) termina em TAG. *COII*, *ATPase8* e *ATPase6* não possuem códon de parada completo e terminam em T, de forma que o códon de terminação é completado pela cadeia poliA, fenômeno observado em outros organismos (SCHEFFLER, 2008; COOK, 2005).

Houve a sobreposição de dois nucleotídeos entre *ATPase8* e *ATPase6*, de três nucleotídeos entre *tRNAG* e *ND3* e de oito nucleotídeos entre *tRNAE* e *tRNAF* (Tabela 2), fenômeno também comum para outros genomas mitocondriais (CROZIER; CROZIER, 1993; CASTRO; DOWTON, 2005; CASTRO et al., 2006).

Várias regiões não codificadoras (IGS) foram identificadas ao longo do mitogenoma e somam 4195 pb, com conteúdo de AT de 86 %. A maior delas apresenta 417 pb e localiza-se entre a junção *ND1-tRNAL₁*. Esta grande quantidade de IGS é bem maior do que a encontrada para outros insetos, que normalmente apresentam menos de 50 pb não codificadores, além da região controle (CASTRO et al., 2006).

A junção *COI-COII* apresenta IGS de 160 pb, localizado entre *COI-tRNAL₂*. Em *Apis*, esse espaçador possui 193 pb e encontra-se entre *tRNAL-COII*. Em outras espécies de formigas e abelhas essa região é reduzida ou ausente (CROZIER; CROZIER, 1993), porém tem-se mostrado bastante informativa para estudos evolutivos e filogenéticos (FRANCK et al., 1998; WETTERER et al., 1998; KRONAUER et al., 2004; MARTINS et al., 2007).

Muitos mitogenomas de vários grupos de organismos estão sendo sequenciados e estão mudando alguns conceitos e ideias estabelecidos. Boore (1999) destaca em seu trabalho que a visão de seleção para mtDNAs cada vez mais compactos é refutada por genomas mitocondriais de alguns artrópodos, moluscos e nematódeos contendo grandes quantidades de sequências não codificadoras. *A. laevigata* pertence ao gênero com posição mais apical em relação a grupos taxonômicos próximos dentro da tribo Attini (WETTERER et al., 1998; BACCI et al., 2009) e apresenta grande quantidade de regiões intergênicas não codificadoras, muito mais do que o encontrado para os dois gêneros com mitogenomas sequenciados pertencentes à mesma subfamília. Além disso, tanto para attines (WETTERER et al., 1998), quanto para formigas de mel (KRONAUER et al., 2004), essa região IGS é menor nos grupos basais do que nos mais derivados.

Outra teoria questionada por Boore (1999) refere-se ao modelo de transcrição policistrônico. Talvez ele não seja universal, já que sobreposição de genes é um evento comum entre os mitogenomas, impossibilitando a quebra e geração dos RNAs completos a partir do mesmo transcrito.

Os dados apresentados são de grande importância para a geração de uma base genética para estudos filogenéticos e evolutivos. A finalização do sequenciamento e caracterização do mitogenoma completo serão de grande valia não só para estudos dentro de tribo Attini, mas será uma grande contribuição para entendimento da estrutura, organização e evolução do DNA mitocondrial.

Conclusões e Perspectivas

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O trabalho realizado permitiu a geração de grande número de sequências expressas, descrição do mitogenoma e identificação de genes candidatos para o controle da formiga cortadeira *Atta laevigata*.

Os dados de transcriptoma permitiram o conhecimento de alguns aspectos da expressão gênica dessa formiga: (i) grande parte das sequências ainda não foi caracterizada e não apresenta similaridade com outras já descritas e depositadas nos bancos de dados; (ii) poucos genes são muito expressos e estão relacionados com três processos biológicos básicos; (iii) as sequências foram agrupadas em 27 categorias bastante divergentes com relação à quantidade de genes e ESTs que abrigam e às funções desempenhadas; (iv) alguns desses genes participam de processos biológicos chaves e, por isso, foram considerados alvos promissores para estratégias de controle. Algumas técnicas e abordagens foram sugeridas para estudos mais conclusivos sobre a expressão e comportamento desses genes alvo para o controle dessa formiga praga. Além disso, pretende-se utilizar a técnica de sequenciamento de segunda geração da Illumina para construção de transcriptomas mais completos e abrangentes visando a diferenciação de linhagens e inferências filogenéticas, bem como a caracterização inicial de genomas mitocondriais.

Na caracterização do mitogenoma de *A. laevigata* foi utilizada uma abordagem diferente, na qual sequências obtidas do transcriptoma serviram como ponto de partida para aplicação da técnica de *primer walking*, ao invés do PCR longo. Entretanto, tal metodologia será utilizada para validação das sequências obtidas, confirmando sua origem a partir do mtDNA e não de pseudogenes.

As combinações de *primers* utilizadas serão também testadas em outras formigas Attini, buscando novos marcadores moleculares para melhor classificação e entendimento dos processos evolutivos dentro da tribo.

Existem alguns mitogenomas descritos para Hymenoptera, porém muitas famílias apresentam poucos ou nenhum representante sequenciado. Além disso, existe um déficit de mitogenomas para espécies próximas, impedindo estudos evolutivos em níveis taxonômicos mais baixos. Sendo assim, pretende-se o sequenciamento de mtDNAs de um maior número de espécies de Attini, visando a caracterização de rearranjos genômicos para entendimento e reconstrução de relações filogenéticas.

Referências

REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. D.; KELLEY, J. M.; GOCAYNE, J. D.; DUBNICK, M.; POLYMERPOULOS, M. H.; XIAO, H.; MERRIL, C. R.; WU, A.; OLDE, B.; MORENO, R. F.; KERVALAGE, A. R.; MCCOMBIE, W. R.; VENTER, J. C. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. **Science**, Washington, v. 252, n. 5013, p. 1651-1656, jun. 1991.
- ADAMS, M. D. et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science**, Washington, v. 287, n. 5461, p. 2185-2195, mar. 2000.
- ANJOS, N.; DELLA LÚCIA, T. M.; MAYHÉ-NUNES, A. J. **Guia prático sobre formigas cortadeiras em reflorestamentos**. Ponte Nova: Editora GarffCor. 1998. 97 p.
- AVISE, J. C.; ARNOLD, J.; BALL, R. M.; FERMININGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J. E.; REEB, C. A.; SAUNDERS, N. C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, Palo Alto, v. 18, p. 489-522, nov. 1987.
- 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*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 28, n. 1, p. 79-82, 1995.
- BACCI, M.; SOLOMON, S. E.; MUELLER, U. G.; MARTINS, V. G.; CARVALHO, A. O. R.; VIEIRA, L. G. E.; SILVA-PINHATI, A. C. O. Phylogeny of leafcutter ants in the genus *Atta* Fabricius (Formicidae: Attini) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 51, p. 427-37, 2009.
- BASS, M.; CHERRETT, J. M. Fungal hyphae as a source of nutrients for the leafcutting ant *Atta sexdens*. **Physiol. Entomol.**, v. 20, n. 1, p. 1-6, mar. 1995.
- BOLTON, B.; ALPERT, G.; WARD, P. S.; NASKRECKI, P. **Bolton's catalogue of ants of the world: 1758-2005**. Cambridge: Harvard University Press, 2006.
- BOORE, J. L. Animal mitochondrial genomes. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v. 27, n. 8, p. 1767-1780, 1999.
- BOORE, J. L.; COLLINS, T. M.; STANTON, D.; DAEHLER, L. L.; BROWN, W. M. Deducing the pattern of arthropod phylogeny from mitochondrial DNA rearrangements. **Nature**, London, v. 376, n. 6536, p. 163-165, jul. 1995.
- BOORE, J. L.; LAVROV, D. V.; BROWN, W. M. Gene translocation links insects and crustaceans. **Nature**, London, v. 392, n. 6677, p. 667-668, abr. 1998.
- BOORE, J. L.; BROWN, W. M. Big trees from little genomes: mitochondrial gene order as a phylogenetic tool. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 8, n. 6, p. 668-674, dez. 1998.

BORGMEIER, T. Estudos sobre *Atta* (Hym. Formicidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Tomo 48, 1950.

BOUCK, A.; VISION, T. The molecular ecologist's guide to expressed sequence tags. **Mol. Ecol.**, v. 16, n.5, p. 907-924, mar. 2007.

BURGER, G., GRAY, M. W.; LANG, B. F. Mitochondrial genomes: anything goes. **Trends Genet.**, v. 19, n. 12, p. 709–716, dez. 2003.

CAMERON, R. S. **Distribution, impact and control of the Texas leaf-cutting ant: 1983 survey results**. Texas Forest Service Publication, 1985.

CAMERON, S. L.; DOWTON, M.; CASTRO, L. R.; RUBERU, K.; WHITING, M. F.; AUSTIN, A. D.; DIEMENT, K.; STEVENS, J. Mitochondrial genome organization and phylogeny of two vespid wasps. **Genome**, v. 51, n.10, p. 800–808, out. 2008.

CARREIRO, S. C.; PAGNOCCA, F. C.; BACCI, M.; LACHANCE, M. A.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; RUIVO, C. C. C.; ROSA, C. A. *Sympodiomyces attinorum* sp nov., a yeast species associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 54, pt. 5, p. 1891-1894, set. 2004.

CASTRO, L. R.; DOWTON, M. The position of the Hymenoptera within the Holometabola as inferred from the mitochondrial genome of *Perga condei* (Hymenoptera: Symphyta: Pergidae). **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 34, n. 3, p. 469–479, mar. 2005.

CASTRO, L. R.; RUBERU, K.; DOWTON, M. Mitochondrial genomes of *Vanhornia eucnemidarum* (Apocrita: Vanhorniidae) and *Primeuchroeus* spp. (Aculeata: Chrysididae): evidence of rearranged mitochondrial genomes within the Apocrita (Insecta: Hymenoptera). **Genome**, v. 49, n. 7, p. 752-766, jul. 2006.

CHIOTIS, M.; JERMIIN, L. S.; CROZIER, R. H. A Molecular Framework for the Phylogeny of the Ant Subfamily Dolichoderinae. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 17, n. 1, p. 108–116, out. 2000.

COOK, C. E. The complete mitochondrial genome of the stomatopod crustacean *Squilla mantis*. **BMC Genomics**, v. 6, p. 105, ago. 2005.

CRIMI, M.; RIGOLIO, R. The mitochondrial genome, a growing interest inside an organelle. **Int. J. Nanomedicine**, v. 3, n. 1, p. 51–57, 2008.

CROZIER, R. H.; CROZIER, Y. C. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. **Genetics**, v. 133, n. 1, p. 97-117, jan. 1993.

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

CURRIE, C. R. A community of ants, fungi, and bacteria: A multilateral approach to studying symbiosis. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v. 55, p. 357-380, 2001.

CUROLE, J. P.; KOCHER, T. D. Mitogenomics: digging deeper with complete mitochondrial genomes. **Trends Ecol. Evol.**, v. 14, n. 10, p. 394-398, out. 1999.

DELABIE, J. H. C. The ant problems of cocoa farms in Brazil. In: VANDER MEER, R. K.; JAFFE, K.; CEDEÑO, A. (Eds.). **Applied myrmecology: a world perspective**, Boulder, Colorado: Westview Press, 1990. p. 555-569.

DELABIE, J. H. C.; NASCIMENTO, I. C.; FONSECA, E.; SGRILLO, R. B.; SOARES, P. A. O.; CASIMIRO, A. B.; FURST, M. Biogeografia das formigas cortadeiras (Hymenoptera; Formicidae; Myrmicinae; Attini) de importância econômica no leste da bahia e nas regiões periféricas dos estados vizinhos. **Agrotrópica**, v. 9, n. 2, p. 49-58, 1997.

DOWTON, M.; CAMERON, S. L.; DOWAVIC, J. I.; AUSTIN, A. D.; WHITING, M. F. Characterization of 67 mitochondrial tRNA gene rearrangements in the Hymenoptera suggests that mitochondrial tRNA gene position is selectively neutral. **Mol. Biol. Evol.**, Oxford, v. 26, n. 7, p. 1607-1617, jul. 2009.

DU BUY, H. G.; RILEY, F. L. Hybridization between the nuclear and kinetoplast DNA's of *Leishmania enriettii* and between nuclear and mitochondrial DNA's of mouse liver. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, v. 57, n. 3, p. 790-797, mar. 1967.

DURHAM, A. M.; KASHIWABARA, A. Y.; MATSUNAGA, F. T.; AHAGON, P. H.; RAINONE, F.; VARUZZA, L.; GRUBER, A. EGene: a configurable pipeline generation system for automated sequence analysis. **Bioinformatics**, Oxford, v. 21, n. 12, p. 2812-2813, jun. 2005.

EMBLEY, T. M.; MARTIN, W. Eukaryotic evolution, changes and challenges. **Nature**, London, v. 44, n. 7084, p. 623-630, mar. 2006.

FORTI, L.C. et al. Impacto das mudanças antrópicas na ocorrência de formigas cortadeiras (Hymenoptera, Formicidae). In: SIMPÓSIO DE MIRMECOLOGIA, 26., 2003. p. 141-142.

FOWLER, H. G.; SILVA, V. P.; SAES, N. B. Population dynamics of leaf-cutting ants: a brief review. In: LOFGREN, C. S.; VANDER MEER, R. K. (Eds.). **Fire ants and leaf-cutting ants: biology and management**, Boulder, Colorado: West-View Press, 1986. p. 123-145.

FRANCK, P.; GARNERY, L.; SOLIGNAC, M.; CORNUET, J-M. The origin of West European subspecies of honeybees (*Apis mellifera*): new insights from microsatellite and mitochondrial data. **Evolution**, v. 52, n. 4, p. 1119-1134, ago. 1998.

GARRETTSON, M.; STETZEL, J. F.; HALPERN, B. S.; HEARN, D. J.; LUCEY, B. T.; MCKONE, M. J. Diversity and abundance of understory plants on active and abandoned nests of leaf-cutting ants (*Atta cephalotes*) in a Costa Rican rain forest. **J. Trop. Ecol.**, Cambridge, v. 14, n. 1, p. 17-26, jan. 1998.

GOODISMAN, M. A.D.; ISOE, J.; WHEELER, D. E.; WELLS, M. A. Evolution of insect metamorphosis: a microarray-based study of larval and adult gene expression in the ant *Camponotus festinatus*. **Evolution**, v. 59, n. 4, p. 858-870, abr. 2005.

GOTZEK, D.; CLARKE, J.; SHOEMAKER, D. Mitochondrial genome evolution in fire ants (Hymenoptera: Formicidae). **BMC Evol. Biol.**, v. 10, p. 300, out. 2010.

GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D. T.; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W. M. **Introdução à genética**. 6 ed. Tradução de P.A. Motta. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 856 p.

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

HERNÁNDEZ, J. V.; JAFFÉ, K. Economic damage caused by leaf-cutting ant populations of *Atta laevigata* (F. Smith) on pine plantations (*Pinus caribaeae* Mor.) and elements for managing of the pest. **An. Soc. Entomol.**, v. 24, n. 2, p. 287-298, 1995.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The Ants**. Massachusetts: Belknap Press of Harvard University, 1990. 732p.

HOLT, I. J.; HARDING, A. E.; MORGAN HUGHES, J. A. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. **Nature**, London, v. 331, n. 6158, p. 717-719, fev. 1988.

HU, M.; CHILTON, N. B.; GASSER, R. B. The mitochondrial genomics of parasitic nematodes of socio-economic importance: recent progress, and implications for population genetics and systematics. **Adv. Parasitol.**, v. 56, p. 133–212, 2004.

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Res.**, v. 9, n. 9, p. 868-877, set. 1999.

JEX, A. R.; HALL, R. S.; LITTLEWOOD, D. T. J.; GASSER, R. B. An integrated pipeline for next-generation sequencing and annotation of mitochondrial genomes. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v. 38, n. 2, p. 522-533, jan. 2010.

KELLER, L. Queen lifespan and colony characteristics in ants and termites. **Insectes Soc.**, Basel, v. 45, n. 3, p. 235–246, 1998.

KRONAUER, D. J. C.; HÖLLDOBLER, B.; GADAU, J. Phylogenetics of the new world honey ants (genus *Myrmecocystus*) estimated from mitochondrial DNA sequences. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 32, n. 1, p. 416–421, jul. 2004.

LASLETT, D.; CANBÄCK, B. ARWEN: a program to detect tRNA genes in metazoan mitochondrial nucleotide sequences. **Bioinformatics**, Oxford, v. 24, n. 2, p. 172-175, jan. 2008.

- LAVROV, D. V. Key transitions in animal evolution: a mitochondrial DNA perspective. **Integr. Comp. Biol.**, Oxford, v. 47, n. 5, p. 734–743, 2007.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2 ed. Tradução de A.A. Simões e W.R.N. Lodi. São Paulo: Sarvier, 1995. 839 p.
- LOWE, T. M.; EDDY, S. R. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v. 25, n. 5, p. 955-964, mar. 1997.
- MANNIATIS, T.; GOODBOURN, S.; FISCHER, J. A. Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. **Science**, Washington, v. 236, n. 4806, p. 1237-1245, jun. 1987.
- MARICONI, F. A. M. **As saúvas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1970. 167 p.
- 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 Mol. Biol.**, v. 16, n. 6, p. 777-784, dez. 2007.
- MITA, K. et al. The genome sequence of silkworm *Bombyx mori*. **DNA Res.**, Oxford, v. 11, n. 1, p. 27-35, fev. 2004.
- MORITZ, C.; DOWLING, T. E.; BROWN, W. M. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, Palo Alto, v. 18, p. 269–292, 1987.
- MOSER, J. C.; NEFF, S. E. *Pholeomyia comans* (Diptera: Milichiidae) an associate of *Atta texana*: larval anatomy and notes on biology. **Z. Angew. Entomol.**, v. 69, p. 343-348, 1971.
- MUELLER, U. G.; SCHULTZ, T. R.; CURRIE, C. R.; ADAMS, R. M. M. The origin of the attine ant-fungus mutualism. **Q. Rev. Biol.**, v. 76, n. 2, p. 169-197, jun. 2001.
- OLIVEIRA, M. T.; ROSA, A. C.; AZEREDO-ESPIN, A. M. L.; LESSINGER, A. C. Improving access to the control region and tRNA gene clusters of Dipteran mitochondrial DNA. **J Med Entomol.**, v. 43, n. 3, p. 636-639, mai. 2006.
- PAGE, R. E. Jr; ERBER, J. Levels of behavioral organization and the evolution of division of labor. **Naturwissenschaften**, v. 89, n. 3, p. 91-106, mar. 2002.
- PIGANEAU, G.; EYRE-WALKER, A. Evidence for variation in the effective population size of animal mitochondrial DNA. **PLoS ONE**, v. 4, n. 2, e4396, 2009.
- PINTO-TOMÁS, A. A.; ANDERSON, M. A.; SUEN, G.; STEVENSON, D. M.; CHU, F. S. T.; CLELAND, W. W.; WEIMER, P. J.; CURRIE, C. R. Symbiotic nitrogen fixation in the fungus gardens of leaf-cutter ants. **Science**, Washington, v. 326, n. 5956, p. 1120-1123, nov. 2009.

ROBINSON, G. E. Development: sociogenomics takes flight. **Science**, Washington, v. 297, n. 5579, p. 204-205, jul. 2002.

RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F. C.; BACCI, M.; HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; PFENNING, L. H. Variability of non-mutualistic filamentous fungi associated with *Atta sexdens rubropilosa* nests. **Folia Microbiol.**, Praga, v. 50, n. 5, p. 421-425, 2005.

SCHEFFLER, I. E. **Mitochondria**. 2nd ed. New York: J. Wiley and Sons, 2008. 462 p.

SCHULTZ, T. R.; BRADY, S. G. Major evolutionary transitions in ant agriculture. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, U. S. A., v. 105, n. 14, p. 5435-5440, abr. 2008.

SCHULTZ, T. R.; MEIER, R. A phylogenetic analysis of the fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini) based on morphological characters of the larvae. **Syst. Entomol.**, v. 20, n. 4, p. 337–370, out. 1995.

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. **J. Insect Physiol.**, v. 49, n. 4, p. 307-313, abr. 2003.

SILVA-PINHATTI, A. C. O.; BACCI, M.; HINKLE, G.; SOGIN, M. L.; PAGNOCCA, F. C.; MARTINS, V. G.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A. Low variation in ribosomal DNA and internal transcribed spacers of the symbiotic fungi of leaf-cutting ants (Attini: Formicidae). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 37, n. 10, p. 1463-1472, out. 2004.

SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, Lanham, v. 87, n. 6, p. 651-701, 1994.

SIMON, C.; BUCKLEY, T. R.; FRATI, F.; STEWART, J. B.; BECKENBACH, A. T. Incorporating molecular evolution into phylogenetic analysis, and a new compilation of conserved polymerase chain reaction primers for animal mitochondrial DNA. **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.**, Palo Alto, v. 37, p. 545–79, dez. 2006.

SIQUEIRA, C. G.; BACCI, M.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, A. O.; HEBLING, M. J. A. Metabolism of plant polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of the ant *Atta sexdens* L. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, n. 12, p. 4820-4822, dez. 1998.

STEINER, W. E. The first records of *Bycra villosa* Pascoe (Coleoptera: Tenebrionidae) in the United States, Central America and Colombia and notes on its association with leaf-cutting ants. **Coleopterists Bulletin**, v. 58, n. 3, p. 329-334, set. 2004.

SUEN, G. et al. The genome sequence of the leaf-cutter ant *Atta cephalotes* reveals insights into its obligate symbiotic lifestyle. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 2, e1002007, fev. 2011.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol. Biol. Evol.**, Oxford, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, ago. 2007.

THE HONEYBEE GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. **Nature**, London, v. 443, n. 7114, p. 931-949, out. 2006.

THE *Nasonia* GENOME WORKING GROUP. Functional and Evolutionary Insights from the Genomes of Three Parasitoid *Nasonia* Species. **Science**, Washington, v. 327, n. 5963, p. 343-348, jan. 2010.

TIAN, H.; VINSON, S. B.; COATES, C. J. Differential gene expression between alate and dealate queens in the red imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae). **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 34, n. 9, p. 937-949, set. 2004.

Tribolium GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. **Nature**, London, v. 452, n. 7190, p. 949-955, abr. 2008.

VASCONCELOS, H. L. Foraging activity of two species of leaf-cutting ants (*Atta*) in a primary Forest of the Central Amazon. **Insectes Soc.**, Basel, v. 37, n. 2, p. 131-145, 1990.

VASCONCELOS, H. L.; CHERRET, J. M. Leaf-cutting ants and early Forest regeneration in central Amazonia: effects of herbivory on the seedling establishment. **J. Trop. Ecol.**, Cambridge, v. 13, n. 3, p. 357-370, mai. 1977.

VIANA, L. R.; SANTOS, J. C.; ARRUDA, L. J.; SANTOS, G. P.; FERNANDES, G. W. Foraging patterns of the leaf-cutter ant *Atta laevigata* (Smith) (Myrmicinae: Attini) in an area of cerrado vegetation. **Neotrop. Entomol.**, Piracicaba, v. 33, n. 3, p. 391-393, mai. 2004.

WALLACE, D. C. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. **Annu. Rev. Genet.**, Palo Alto, v. 39, p. 359-407, 2005.

WALLER, D. A.; MOSER, J. C. Invertebrate enemies and nest associates of the leaf cutting ant *Atta texana* (Buckley) (Formicidae, Attini). In: VANDER MEER, R. K.; JAFFE, K.; CEDEÑO, A. (Eds.). **Applied myrmecology: a world perspective**, Boulder, Colorado: Westview Press, 1990. p. 255-273.

WALLACE, D. C.; SINGH, G.; LOTT, M. T.; HODGE, J. A.; SCHURR, T. G.; LEZZA, A. M. S.; ELSAS, L. J. II; NIKOSKELAINEN, E. K. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. **Science**, Washington, v. 242, n. 4884, p. 1427-1431, dez. 1988.

WANG, J.; JEMIELITY, S.; PAOLO, U.; WURM, Y.; GRÄFF, J.; KELLER, L. An annotated cDNA library and microarray for large-scale gene-expression studies in the ant *Solenopsis invicta*. **Genome Biol.**, v. 8, n. 1, R9, 2007.

WEBER, N. A. **Gardening ants: the Attines**. Philadelphia: The American Philosophical Society, 1972, 146 p.

WETTERER, J. K.; SCHULTZ, T. R.; MEIER, R. Phylogeny of fungus-growing ants (Tribe Attini) based on mtDNA sequence and morphology. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 9, n. 1, p. 42-47, fev. 1998.

WILSON, E. O. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: Atta) I. The overall pattern in *A. sexdens*. **Behav. Ecol. Sociobiol.**, v. 7, n. 2, p. 143–156, 1980.

WIRTH, R.; HERZ, H.; RYEL, R. J.; BEYSCHLAG, W.; HÖLLDOBLER, B. **Herbivory of leaf-cutting ants. A case study on *Atta colombica* in the tropical rain forest of Panama**. Berlin: Springer, 2003.

WOLSTENHOLME, D. R. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. **Int. Rev. Cyt.**, v. 141, p. 173-216, 1992.

WYMAN, S. K.; JANSEN, R. K.; BOORE, J. L. Automatic annotation of organellar genomes with DOGMA. **Bioinformatics**, Oxford, v. 20, n. 17, p. 3252-3255, nov. 2004.

ZANETTI, R.; ZANUNCIO, J. C.; SOUZA-SILVA, A.; MENDONÇA, L. A.; MATTOS, J. O. S.; RIZENTAL, M. S. Efficiency of products for thermonebulization on the control of *Atta laevigata* (Hymenoptera: Formicidae) in eucalyptus plantations. **Cienc Agrotec.**, Lavras, v. 32, n. 4, p. 1313-1316, 2008.

ZHANG, C.; HUANG, Y. Complete mitochondrial genome of *Oxya chinensis* (Orthoptera, Acridoidea). **Acta. Biochim. Biophys. Sin.**, Shangai, v. 40, n. 1, p. 7-18, jan. 2008.

ZHOU, C.; YANG, Y.; JONG, A. Y. Mini-prep in ten minutes. **BioTechniques**, v. 8, n. 2, p. 172-173, fev. 1990.