
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JULIANA WERCHAJZER

**ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS DO GENE
MITOCONDRIAL CITOCROMO C OXIDASE E
CARACTERIZAÇÃO DE NINHOS DE
Trachymyrmex tucumanus FOREL, 1914
(HYMENOPTERA, FORMICIDAE)**



Rio Claro
2010

JULIANA WERCHAJZER

ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DO GENE MITOCONDRIAL
CITOCROMO C OXIDASE E CARACTERIZAÇÃO DE NINHOS DE
Trachymyrmex tucumanus FOREL, 1914 (HYMENOPTERA,
FORMICIDAE)

Orientador: Prof. Dr. Odair Correa Bueno

Co-orientador: Dr. Eduardo Arrivabene Diniz

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
Campus de Rio Claro, para obtenção do grau
de bacharel em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2010

591 Werchajzer, Juliana
W484a Análises das sequências do gene mitocondrial citocromo c oxidase e
caracterização de ninhos de *Trachymyrmex tucumamus* Forel, 1914
(Hymenoptera : Formicidae) / Juliana Werchajzer. - Rio Claro : [s.n.],
2010
52 f. : il., figs., tabs., fots.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Odair Correa Bueno
Co-Orientador: Eduardo Arrivabene Diniz

1. Zoologia. 2. Artini. 3. Filogenia. 4. Estrutura. 5. DNA. 6. Molecular.
I. Título.

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Odair pela paciência, amizade e calma com a qual me orientou durante toda a graduação.

Ao Du, pela ajuda imprescindível em todos os trabalhos, pela disposição incondicional, bom humor, paciência e amizade.

Ao Prof. Dr. Vanderlei, Rodrigo e Cynara, pelo apoio na parte molecular.

À Marcela, Ita, Amanda, Sandrinha, Joqueta, Meg, Necis e a todo pessoal do CEIS, por me proporcionarem ótimos momentos e sempre me ajudarem em tudo que precisei.

À Pamy e Manu, com quem passei grande parte do meu tempo nos últimos 5 anos, pela amizade sincera, pelas risadas, cafezinhos, quebra-galho, enfim, tudo que uma verdadeira amizade traz de bom. Desejo a vocês muito sucesso nessa nova fase e vou sentir muita falta da nossa “equipe”!

À Naty, a quem eu considero minha irmã mais nova, pela amizade incondicional, pela boa convivência, companhia e, principalmente, por ter me acompanhado nos programas “gordinhos” e engordado comigo na faculdade.

À Salms e Cazuzza, meus grandes amigos, pelas boas risadas, tardes de fofocas, por me ajudarem a “desligar” das coisas de vez em quando e ver o mundo de uma forma melhor. A faculdade não teria sido a mesma sem vocês!

À Moyra, que mesmo com nossos horários diferentes, sempre me proporcionou boas conversas, risadas e ótimas dicas de alimentação saudável.

À Descolada, uma amiga não tão freqüente, mas muito querida, com quem eu tenho uma identificação natural e que sempre me deixa de bom humor!

Ao CBN 2006, pelas ótimas quartas-feiras, saídas de campo, problemas de matrícula que resolvermos juntos... Vocês fizeram os maus momentos parecerem bons e os bons momentos, excelentes! Obrigada por ajudarem a tornar essa fase da minha vida especial.

Aos meus amigos de São Paulo, Yellow, Clau, Alon, Arão, David, Regina, Rubens e a todos os outros, pelo apoio e amizade, e por sempre me lembrarem que eu tenho um bom lugar para onde voltar.

À Romy, Melissa, Rico, Michel e Cíntia, minha família do coração, por terem me acolhido como uma filha/irmã e por todo o carinho, confiança e atenção que sempre me deram.

À minha mãe, que eu amo tanto, sempre guerreira, sempre me ensinando alguma coisa, sempre tentando me dar um dinheirinho... Passamos por muitas coisas nestes cinco anos e agradeço por ter segurado a barra em momentos tão difíceis, pela preocupação e pelo enorme amor.

Ao Israel, Carla e Henrique, que apesar da distância, estiveram constantemente presentes na minha vida, me ajudando e me aconselhando. Agradeço pela preocupação, pelos bons momentos e pelo carinho.

Ao Morris, meu grande amor, a melhor pessoa que eu já conheci nessa vida. Obrigada por tudo, por tudo mesmo, pela paciência nas crises, por fazer da minha vida uma seqüência de bons momentos, únicos e inesquecíveis. Faltam palavras para expressar o quanto você significa pra mim. Amo muito e estamos juntos nessa até o final!

High Hopes

**“Next time your found, with your chin on the ground
There is a lot to be learned, so look around”.**

Jimmy Van Heusen / Frank Sinatra

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
1.1. Arquitetura do ninho.....	9
1.2. Análise das seqüências do gene mitocondrial	11
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Coleta, identificação e conservação dos exemplares	14
3.2. Arquitetura do ninho.....	15
3.3. Análise das seqüências do fragmento do gene mitocondrial	15
3.3.1. Extração do DNA (TNES).....	15
3.3.2. Visualização em gel de agarose 1%	17
3.3.3. Amplificação dos fragmentos de DNA por PCR	18
3.3.4. Purificação de produtos por PCR	18
3.3.5. Reação para seqüenciamento do DNA e purificação dos produtos	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1. Arquitetura dos ninhos	21
4.2. Análise das seqüências do gene mitocondrial citocromo c oxidase.....	37
5. CONCLUSÃO.....	44
6. REFERÊNCIAS BILIOGRÁFICAS.....	45

1. INTRODUÇÃO

A tribo Attini é um grupo de formigas exclusivo do Continente Americano e amplamente Neotropical, ocorrendo desde a latitude 40°N até 44°S. Em toda essa área, as espécies só não ocorrem na região andina e em algumas ilhas da América Central (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; WEBER, 1966). Existem cerca de 240 espécies, divididas em 15 gêneros: *Atta*, *Acromyrmex*, *Apterostigma*, *Cyphomyrmex*, *Kalatomyrmex*, *Mycetagroicus*, *Mycetarotes*, *Mycetophylax*, *Mycetosoritis*, *Mycocepurus*, *Myrmicocrypta*, *Paramycetophylax*, *Pseudoatta*, *Sericomyrmex* e *Trachymyrmex* (BOLTON, 1995; BRANDÃO; MAYHÉ-NUNES, 2001; BROWN JR., 2000; KEMPF, 1972; KLINGENBERG; BRANDÃO, 2009).

Uma das características mais intrigantes da tribo é o comportamento de cultivar fungos como fonte de alimento, principalmente para larvas e rainhas, compartilhado por todas as espécies. Essa simbiose se dá com um fungo basidiomiceto, da família Agaricaceae, provavelmente originada a partir de único evento evolutivo, há cerca de 50 milhões de anos (SCHULTZ; MEIER, 1995; WETTERER; SCHULTZ; MEIER, 1998), e que vem sendo amplamente estudada (CHAPELA et al., 1994; GARLING, 1979; MUELLER, 2001; SEAL; TSCHINKEL, 2007; VO; MUELLER; MIKHEYEV, 2009).

O preparo do substrato no qual se desenvolverá o jardim de fungo apresenta um dos aspectos mais marcantes dessa simbiose. Nesse processo, algumas espécies depositam, na superfície do substrato, líquido fecal contendo enzimas proteolíticas necessárias para que o fungo possa utilizar polipeptídeos, provenientes do substrato, compensando uma deficiência metabólica existente nessa espécie de fungo (MARTIN, J.S.; MARTIN, M.M., 1970).

O líquido contém ainda as enzimas pectinase e xilanase, produzidas pelo fungo, que atravessam intactas o aparelho digestório das formigas, sendo utilizadas para

degradar a parede celular do material vegetal (SILVA, 2000). Com exceção de *Atta* e *Acromyrmex*, os demais gêneros utilizam fezes e carcaças de insetos, detritos vegetais e madeira apodrecida como substratos. Esses materiais normalmente já passaram por processos catabólicos, como digestão, infestação microbiana ou decomposição e, por conseqüência, as fontes de nitrogênio na forma polipeptídica encontram-se mais escassas em relação às folhas frescas, estando essas fontes normalmente reduzidas à amônia, aminoácidos, ácido úrico e uréia. Por essa razão, nas espécies basais, há uma necessidade acentuada de adicionar enzimas proteolíticas suplementares a suas culturas de fungo (MARTIN; GIESELMANN; MARTIN, 1973).

O grupo de fungos cultivado pelas Attini intermediárias (*Trachymyrmex* e *Sericomyrmex*) e derivadas (*Atta* e *Acromyrmex*), denominado G1, é caracterizado por crescimento lento e alta capacidade de produzir enzimas que degradam polissacarídeos vegetais. Já os grupos cultivados pelas Attini basais (demais gêneros), denominados G2, G3 e G4, possuem crescimento rápido e baixa produção de enzimas (CHAPELA et al., 1994; DINIZ, 2008; LIMA, 2006; MUNKACSI et al., 2004; SILVA-PINHATI, 2004; VILLESEN et al., 2004). Além disso, os fungos de *Atta*, *Acromyrmex*, *Trachymyrmex* e *Sericomyrmex* produzem estruturas especializadas, os gongilídeos, localizados em estáfilas, que surgem como uma expansão na extremidade de algumas hifas. Essas estáfilas contêm, principalmente, aminoácidos, proteínas e carboidratos e servem de alimento para larvas, rainhas e, em parte, para as operárias, que obtêm os nutrientes líquidos durante o processo de preparo das estáfilas para as larvas (CURRIE, 2001; DINIZ, 2008; HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; MUELLER, 2002; MURAKAMI; HIGASHI, 1997; QUINLAN; CHERRET, 1979; SCHNEIDER, M., 2003; SCHULTZ, 1999).

Além da simbiose com o fungo basidiomiceto, as formigas da tribo Attini apresentam outro tipo de simbiose, com uma bactéria filamentosa, do gênero *Pseudonocardia*. Essa bactéria produz antibióticos que suprimem a infestação de um fungo parasita do gênero *Escovopsis* (CURRIE et al., 1999). A distribuição das bactérias se dá pela cutícula das formigas, ocorrendo na região dorsal e/ou ventral, dependendo da espécie, sendo que sua transmissão é realizada verticalmente, isto é, das operárias adultas para a prole.

O gênero *Trachymyrmex* é em sua maioria Neotropical, ocorrendo também na região Neártica, principalmente ao Sul da Flórida, Texas e Arizona (MAYHÉ-NUNES; BRANDÃO, 2002, 2005, 2007). Apresenta colônias pequenas e operárias monomórficas ou com um leve polimorfismo morfológico (WEBER, 1945, 1979; WILSON, 1971). Esse gênero pode ser considerado como um táxon chave no entendimento das relações filogenéticas e evolutivas da tribo, principalmente em relação as Attini derivadas (BRANDÃO; MAYHÉ-NUNES, 2007). Isso ocorre porque *Trachymyrmex* apresenta características morfológicas e comportamentais intermediárias entre as Attini basais e as derivadas.

Uma das questões mais importantes a serem respondidas sobre a história evolutiva da tribo é a transição das formas ancestrais, que iniciaram o processo de cultivo de fungos, para a aquisição de uma maior especialização nesse cultivo, atualmente encontrada nas formigas cortadeiras (*Atta* e *Acromyrmex*), que inclui o hábito de cultivar o grupo de fungos G1, mais derivado, e a aquisição das estáfilas.

Outro passo evolutivo importante foi o polimorfismo morfológico, tanto entre as operárias, quanto na relação rainha e operárias, que permitiu as Attini derivadas uma otimização na divisão de trabalho e o subseqüente crescimento populacional da colônia.

Dada a importância do gênero *Trachymyrmex* como um táxon intermediário da tribo Attini, estudos comparativos entre espécies do mesmo gênero podem fornecer pistas importantes que auxiliem a elucidar essas e outras questões associadas à evolução da tribo.

1.1. Arquitetura do ninho

A arquitetura de ninhos de insetos sociais, como cupins, vespas sociais, abelhas e formigas tem recebido uma atenção especial por estar intimamente relacionada com manifestações comportamentais dos indivíduos da colônia (SUDD; FRANKS, 1987). No entanto, no caso das formigas da tribo Attini, os estudos tornam-se complexos, visto que a maioria dos ninhos é subterrânea, tornando-os menos acessíveis a observações (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; TSCHINKEL, 2003), embora existam espécies que

construam ninhos superficiais, recobertos com palha, terra e resíduos vegetais (DELLA-LUCIA; MOREIRA, 1993) e outras, sobre árvores, como algumas espécies do gênero *Acromyrmex* (GONÇALVES, 1961).

Geralmente, esses ninhos subterrâneos caracterizam-se pela presença de uma ou mais câmaras internas, que podem apresentar funções variadas, como armazenamento de lixo, cultivo de fungo, cuidado com a prole e rainha. As câmaras são normalmente interligadas por túneis, que se abrem na superfície do solo. Ainda que os componentes básicos dos ninhos subterrâneos sejam relativamente simples, seu arranjo interno pode diferir em diversos fatores, como volume, complexidade e forma, dependendo da espécie, do tamanho e da idade da colônia (HASIOTIS, 2003; TSCHINKEL, 2003).

O jardim de fungo é considerado a porção essencial dos ninhos das Attini, sendo que as câmaras que os contêm geralmente abrigam também a rainha e a prole (WEBER, 1966). A viabilidade desses jardins depende, diretamente, da atividade das operárias e está intimamente relacionada com a coleta de substrato e seu posterior processamento, essenciais para o crescimento do fungo. Os gêneros derivados, *Atta* e *Acromyrmex*, utilizam material vegetal fresco como substrato e possuem um complexo sistema de divisão de trabalho, que lhes permite forragear a longas distâncias, muitas vezes causando danos à agricultura. Consequentemente, vários estudos têm sido desenvolvidos acerca dessas espécies visando, principalmente, seu controle (ANDRADE, 2002; BUENO et al., 2004, 2008; BUENO et al., 2005; CAMARGO et al., 2003; CARLOS, 2008; DELABIE; DELLA-LUCIA; PATRE, 2000; HEBLING et al., 2000; NAGAMOTO; FORTI; RAETANO, 2007; PENAFLORES et al., 2006; SILVA et al., 2003; VERZA et al., 2007; ZANETTI et al., 2003).

Por outro lado, as formigas pertencentes a gêneros basais constroem ninhos menores e utilizam outros tipos de materiais como substrato para seu fungo, como carcaças e fezes de insetos e folhas secas (BRANDÃO; MAYHÉ-NUNES 2007; DINIZ, 2008). Tendo em vista esse hábito, essas formigas não causam grandes danos à agricultura, o que talvez possa explicar o número restrito de trabalhos realizados sobre esses gêneros.

A descrição da arquitetura de ninhos revela alguns aspectos importantes para identificação e estabelecimento das interações da espécie com seu habitat. Para formigas e outros insetos sociais, o ninho pode fornecer um microhabitat que lhes proporcione regulação térmica e de umidade, praticamente independentes do ambiente externo, e que pode ser decisivo para o sucesso da colônia (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; PEETERS; HÖLLDOBLER, 1995). Conforme Sudd (1982), a profundidade do ninho é um fator importante para a manutenção das condições microclimáticas, tendo em vista que a temperatura e umidade variam com a profundidade do solo.

Algumas espécies do gênero *Trachymyrmex* já tiveram as arquiteturas de seus ninhos descritas (ARAÚJO; DELLA-LUCIA; MAYHÉ-NUNES, 2002; LIZIDATTI, 2006; WEBER, 1937, 1941, 1945, 1946), sendo que geralmente apresentam ninhos subterrâneos, pequenos ou médios, e evidentes, já que normalmente possuem uma entrada adornada por uma torre de terra e material vegetal. Nesse sentido, a descrição da arquitetura dos ninhos de *Trachymyrmex tucumanus* pode colaborar no estabelecimento de um padrão arquitetônico para o gênero e futuras comparações com espécies basais e derivadas poderão auxiliar na elucidação da questão evolutiva que se refere ao estabelecimento das grandes densidades populacionais em colônias de *Atta* e *Acromyrmex*.

1.2. Análise das seqüências do gene mitocondrial

Desde o seqüenciamento do primeiro organismo procarionte, a bactéria *Haemophilus influenzae* (FLEISCHMANN et al., 1995), já chega a centenas o número de organismos vivos que possuem parte de seu DNA analisado. Nesse contexto, o DNA mitocondrial, descoberto em 1960, vem sendo constantemente utilizado como ferramenta molecular que auxilia na caracterização de táxons e na resolução de relações filogenéticas, em conjunto com outros instrumentos, como morfologia, comportamento e biologia.

Esse genoma, de herança exclusivamente materna, constitui-se de uma molécula de DNA pequena, de 16-20kb, de fita dupla e circular, estabilizada por ligações covalentes, com 37 genes (MORITZ; DOWLING; BROWN, 1987), além de alguns espaçadores

intergênicos (AVISE, 2000) e de uma região com numerosas ligações A+T em invertebrados (AVISE et al., 1987). Também se distingue por apresentar uma estrutura simples, desprovida de repetições, transposons, íntrons ou pseudogenes.

Geralmente, o genoma mitocondrial dos animais possui dois RNA's transportadores (tRNA) de leucina – um, com anticódon UAG, traduz os dois códons da família CUN; outro, com anticódon UAA, traduz os dois códons da família UUR (HIGGINS et al., 2003). Em insetos, sabe-se que esse último anticódon está localizado entre os genes das enzimas citocromo oxidase I e citocromo oxidase II (SIMON et al., 1994).

Estudos com espécies da tribo Attini (BACCI Jr. et al., 2009; KRONAUER; HÖLLDOBLER; GADAU, 2004; MARTINS Jr. et al 2007; ORTIZ, 2007) mostram que a região com espaçador intergênico (IGS), localizada entre os genes do DNA mitocondrial (mtDNA) codificadores das enzimas citocromo oxidase I (COI) e o RNA transportador de leucina (Leu-tRNA), é muito variável dentro da tribo, além de ser caracterizado por altas taxas de A+T e baixos índices de homoplasia, o que permite sua utilização como um marcador molecular na detecção de diversidade biológica e evolução de subespécies (BACCI Jr. et al., 2001). Por outro lado, as regiões COI, COII e Leu-tRNA são altamente conservadas, facilitando o alinhamento das seqüências.

O maior conhecimento do gênero *Trachymyrmex* é essencial para a elucidação taxonômica e evolutiva das Attini superiores (MAYHÉ-NUNES; BRANDÃO, 2002, 2005, 2007) e recentes análises filogenéticas indicam possível parentesco de *Trachymyrmex* como o grupo irmão dos gêneros derivados *Atta* e *Acromyrmex* (BACCI Jr. et al., 2009; BRADY et al., 2006; RABELING, 2007).

Por essa razão, as informações obtidas a partir do seqüenciamento de um fragmento de mtDNA que compreende os genes da citocromo oxidase I, um espaçador intergênico (IGS), Leu-tRNA e citocromo oxidase II da espécie *T. tucumanus* podem fornecer dados importantes que, posteriormente, colaborem com a elucidação dessa questão evolutiva e no estabelecimento das relações filogenéticas dentro do gênero, uma vez que a identificação taxonômica de *Trachymyrmex* muitas vezes pode ser difícil e laboriosa.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos realizar a descrição da arquitetura de ninhos da espécie *Trachymyrmex tucumanus*, bem como a análise de resultados de seqüenciamento de um fragmento de DNA mitocondrial que compreende os genes da citocromo oxidase I, um espaçador intergênico (IGS), RNA transportador de leucina e citocromo oxidase II, de forma a relacionar os dados obtidos com as informações disponíveis do gênero, na tentativa de esclarecer algumas questões evolutivas do grupo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta, identificação e conservação dos exemplares

Para a caracterização da arquitetura de ninhos foram escavados sete ninhos de *Trachymyrmex tucumanus*, entre os meses de abril e maio de 2010, distribuídos pela região da Universidade Estadual Paulista – Campus Rio Claro. As populações utilizadas para descrição da arquitetura são aqui denominadas População 1 a 7. Para as análises do mtDNA foram coletas operárias das sete populações escavadas, além de outro ninho, denominado População 8, que não foi utilizado nas análises de arquitetura. As coordenadas geográficas das populações encontram-se na Tabela 1.

Após a escavação, as operárias foram mantidas em álcool 70%, em congelador, para evitar degradação do material genético.

<i>Trachymyrmex tucumanus</i>	Coordenadas
População 1	S 22° 23' 39.2" W 47° 32' 30.8"
População 2	S 22° 23' 39.2" W 47° 32' 30.8"
População 3	S 22° 23' 35.3" W 47° 32' 40.9"
População 4	S 22° 23' 35.3" W 47° 32' 40.9"
População 5	S 22° 23' 32.5" W 47° 32' 40.6"
População 6	S 22° 23' 45.7" W 47° 32' 33"
População 7	S 22° 23' 45.7" W 47° 32' 33"
População 8	S 22° 23' 45.7" W 47° 32' 33"

Tabela 1: Localização das populações de *Trachymyrmex tucumanus* coletadas na Universidade Estadual Paulista – campus Rio Claro.

3.2. Arquitetura do ninho

Antes da escavação, foram medidas as larguras e comprimentos das torres de entrada dos ninhos, além da aplicação de talco neutro nos olheiros, com auxílio de uma “bomba tamanduá”, conforme metodologia descrita por Araújo, Della-Lucia e Mayhé-Nunes (2002), para demarcação das câmaras e túneis.

Em seguida, os ninhos foram escavados, primeiramente através da abertura de uma vala em seu entorno, prosseguindo com escavações para o interior e para baixo, de forma que as câmaras e túneis foram gradualmente expostos. Para cada ninho foram registradas as quantidades de câmaras, bem como suas medidas de profundidade, comprimento, altura e largura, além do comprimento dos túneis.

O conteúdo das câmaras de fungo foi recolhido para mensuração de seu volume, em laboratório. Também foi determinado o tamanho populacional de cada ninho pela quantificação da população de operárias, além de larvas e pupas, quando possível.

3.3. Análise das seqüências do fragmento do gene mitocondrial

A análise das seqüências do fragmento de DNA mitocondrial que compreende os genes da citocromo oxidase I, um espaçador intergênico (IGS), RNA transportador de leucina e citocromo oxidase II foi feita a partir da coleta de operárias adultas das oito colônias. As etapas para a análise foram constituídas por:

3.3.1. Extração do DNA (TNES)

Foi utilizado o protocolo Amersham Pharmacia Biotech Inc., envolvendo as seguintes etapas:

Lise:

- Resfriamento da solução de TNES no gelo por 5 minutos;
- Adição de 50µl de solução TNES em um eppendorf de 1,5ml. Inserção do material biológico dentro do tubo, seguido de maceração com uma ponteira com a ponta previamente fechada em chama;
- Acréscimo de 500µl de solução de TNES;
- Adição de 3µl de proteinase K (20mg/ml) seguido de incubação, por 3 horas, a 55°C, numa incubadora Thermo cell colling & heating block, modelo HB201, Bioer Technology.

A solução TNES é composta por Tris, NaCl, EDTA e SDS. O tampão TRIS é necessário para manter o pH constante durante o processo de extração. SDS é um detergente que promove a lise da membrana celular e, conseqüentemente, liberação do conteúdo citoplasmático, além de desnaturar algumas proteínas e inibir a atividade de enzimas desoxirribonucleases. Já o EDTA, é um ácido que também inibe a atividade da desoxirribonuclease. Por fim, o NaCl é empregado para promover a precipitação de proteínas (MARANHÃO; MORAES, 2003). A adição da proteinase K é feita para remoção das proteínas associadas ao DNA.

Precipitação de proteínas:

- Resfriamento da amostra à temperatura ambiente, seguido de adição de 200µl de NaCl 5M;
- Agitação no vortex por 20 segundos, em alta velocidade;
- Centrifugação a 13000xg, por 7 minutos.

Precipitação de DNA:

- Adição de 600µl de isopropanol 100% em um novo eppendorf de 1,5ml;
- Transferência do sobrenadante com DNA para esse eppendorf. Descarte do eppendorf com o pellet de proteína;
- Inversão do tubo eppendorf por 50 vezes;
- Centrifugação a 13000xg, por 5 minutos;

- Descarte do sobrenadante com o auxílio de uma pipeta automática de 200µl;
- Inversão do eppendorf em papel absorvente;
- Adição de 600µl de etanol 70% e inversão do eppendorf por 30 vezes;
- Centrifugação a 13000xg, por 5 minutos;
- Descarte do etanol, com auxílio de uma pipeta automática de 200µl, sem remoção do pellet de DNA obtido. Inversão do tubo sobre papel absorvente para secagem;
- Secagem em centrífuga a vácuo, por 10 minutos.

Hidratação do DNA

- Adição, ao pellet de DNA, de 30µl de solução TE, contendo o tampão Tris-HCl, que inibe a hidrólise ácida, além de EDTA;
- Armazenamento a -2°C-8°C.

3.3.2. Visualização em gel de agarose 1%

O procedimento de aplicação da amostra em gel de agarose é realizado para verificação da quantidade e da qualidade do DNA obtido. O princípio da eletroforese baseia-se na separação de moléculas por cargas e massas, podendo ser considerado um procedimento analítico, pois caracteriza os fragmentos de DNA, e também preparativo, já que é possível separar os fragmentos obtidos para outros procedimentos, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (DE-SOUZA, 2003). Quando o DNA é extraído com sucesso, a eletroforese deve apresentar uma banda única, representando a amostra de DNA obtida.

Para este procedimento, um marcador molecular foi inserido no gel para comparações com o DNA extraído. A cada amostra, foi aplicado 1µl do corante Blue Green, que emite fluorescência quando submetido à luz UV. Após a aplicação das amostras no gel, deu-se início à corrida, com uma voltagem de 100V. As moléculas negativas se deslocaram para baixo, no sentido do pólo positivo, separando-se por tamanhos, de forma que as menores correm no gel com mais fluidez, pois não ficam

retidas facilmente nos poros formados pelo gel de agarose. No final da eletroferese, o gel foi submetido à luz UV e fotografado.

3.3.3. Amplificação dos fragmentos de DNA por PCR

O princípio básico da PCR, descrito originalmente por Saiki et al. (1988), está na capacidade de multiplicação de uma determinada seqüência a partir de quantidades mínimas de DNA, de modo que ela se torne majoritária na amostra. Para que ocorra a ampliação, é necessária a utilização de primers, uma seqüência de nucleotídeos que se ligam ao DNA e funcionam como uma seqüência iniciadora para a ação da enzima polimerase.

Os primers utilizados para a amplificação de fragmentos de DNA por PCR foram ANT-R e ANT-F (MARTINS Jr. et al., 2007), que amplificam região mitocondrial COI-IGS-LeutRNA-COII, gerando bandas de 600 a 650 pb.

ANT-F 5' ATTCATTCTTATCTTGAAATATTATTTTC 3'
 ANT-R 5' TTCATAAGTTCAGTATCATTGGTG 3'

Foi preparada uma reação utilizando o kit Pure Taq Ready-to-go PCR Beads (GE Healthcare), que continha os nucleotídeos livres para extensão da fita e a enzima Taq polimerase, ao qual foi adicionado 1µl de cada primer, 2µl de cada amostra de DNA obtida na extração e 18µl de água mili-Q. O conjunto de reações foi inserido em um termociclador Veriti – 96 well thermal cycler – Applied Biosystems, que procedeu com ciclos compostos por 3 etapas cada, sendo elas: desnaturação a 94°C (abertura da fita de DNA), anelamento do primer a 48°C e extensão da fita a 68°C.

3.3.4. Purificação de produtos por PCR

Para a purificação dos produtos obtidos por PCR utilizou-se o protocolo da GE Healthcare: Quick Reference Protocol Card – ilustratm GFXtm PCR DNA and Gel Band purification Kit, composto pelas seguintes etapas:

- Captura da amostra: adição de 500µl do tampão de captura tipo 3. Esse tampão retira o DNA da amostra devido à presença de agentes desnaturantes de proteínas e dissolventes de agarose.
- Inserção das amostras em uma coluna GFX MicroSpin, que possui uma membrana de sílica, carregada positivamente, para atrair as moléculas de DNA;
- Centrifugação a 13200xg por 50 segundos e descarte do material coletado;
- Adição de 500µl de tampão de lavagem tipo 1, para retirada de sais e outros componentes contaminantes da membrana de sílica;
- Centrifugação a 13200xg por 60 segundos e descarte do material coletado;
- Adição de 20µl do tampão de eluição tipo 6;
- Incubação à temperatura ambiente por 60 segundos e centrifugação, em seguida, a 13200xg por 80 segundos;
- Armazenamento da solução coletada, contendo o DNA purificado (a -20°C).

O resultado da purificação foi visualizado através de eletroforese em gel de agarose 1% ou por análise em NanoDrop.

3.3.5. Reação para seqüenciamento do DNA e purificação dos produtos

Antes de iniciar o seqüenciamento do DNA foi realizada uma nova purificação para melhor resolução no seqüenciador. Para cada reação foi adicionado 1µl de primer ANT-R ou ANT-F, para obtenção das seqüências de cada fita separada, além de 2µl de BigDye X Terminator® Purification Kit (AB Applied Biosystems), 2µl do tampão Save Money, 5µl de água mili-Q e 1µl de amostra de DNA. O procedimento seguiu com um programa de 30 ciclos, no termociclador, para as etapas de desnaturação (96°C), anelamento do primer (50°C) e extensão da fita (60°C).

Após o término do programa, foi realizada a purificação dos produtos para seqüenciamento, de acordo com o protocolo a seguir:

- Adição de 1µl de EDTA 125mM, 1µl de acetato de sódio 3M e 25µl de etanol 100%;
- Incubação à temperatura ambiente por 15 minutos;
- Centrifugação a 13200xg, por 7 minutos;
- Descarte do líquido e ressuspensão do pellet com 35µl de etanol 75%;
- Centrifugação a 13200xg, por 5 minutos;
- Descarte do líquido e secagem em centrífuga à vácuo por 10 minutos.

O pellet de DNA obtido foi ressuspensão em solução LOAD e aplicado no seqüenciador 3130 Genetic Analyzer – Applied Biosystems/Hitachi. As seqüências obtidas foram formatadas no programa BioEdit e Clustalw (HIGGINS; BLEASBY; FUCHS, 1992) e as análises de Neighbor-joining (SAITOU; NEI, 1987) e de máxima parcimônia (SCHNEIDER, H.; 2003; SWOFFORD, 1996) foram realizadas através do programa MEGA 4.1 (TAMURA et al., 2007).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Arquitetura dos ninhos

Foram escavados sete ninhos de *Trachymyrmex tucumanus* entre os meses de abril e maio de 2010. O ninho 1, ilustrado na Figura 2, era composto por três câmaras, além da torre de entrada com medidas de largura e comprimento de 0,6x1,0cm (Tabela 2). Possuía profundidade total de 33cm em relação ao solo (Tabela 3). A câmara 1 estava abaixo e praticamente paralela ao orifício de entrada, distanciando dele em 2cm. Apresentava volume de 3,77cm³ e encontrava-se vazia, isto é, sem fungo e sem cria. O túnel de ligação entre a câmara 1 e a câmara 2 possuía comprimento de 4cm. A câmara 2 localizava-se abaixo e levemente à direita da câmara 1, com volume de 78,54cm³ e presença de fungo e cria, representando quase a totalidade do que foi encontrado na colônia. O comprimento do túnel de ligação entre essa câmara e a câmara 3 era de 12cm. A câmara 3, abaixo e levemente à esquerda da câmara 2, possuía volume de 75,40cm³, com pouca cria e fungo. O volume médio das câmaras foi 52,57±42,29cm³ e o volume total de fungo da colônia, 29cm³ (Tabela 3). A população era de 120 indivíduos, sendo 93 operárias, 14 larvas e 21 pupas, quase todas encontradas na câmara 2.

No ninho 2 (Figura 3) foi encontrada uma grande população de alados, com presença de machos e fêmeas. O ninho apresentava torre de entrada medindo 0,8x0,8cm (Tabela 2), três câmaras e profundidade de 73cm em relação ao solo (Tabela 3). A câmara 1 localizava-se abaixo e à esquerda do orifício de entrada, distanciando dele em 12cm, com volume de 112,31cm³ e presença de fungo, operárias e alguns alados. O túnel de ligação entre essa câmara e a próxima possuía 10cm de comprimento. A câmara 2, por sua vez, localizava-se abaixo e à direita da anterior, com volume de 75,40cm³, apresentava pouco fungo, poucas operárias e muitos alados. O

túnel de ligação entre essa câmara e a câmara 3 possuía 36cm de comprimento. Por fim, a câmara 3, com volume de $11,0\text{cm}^3$, não continha fungo, embora abrigasse uma grande população de alados. O volume médio das câmaras foi $66,24\pm 51,27\text{cm}^3$ e o volume total de fungo da colônia, 48cm^3 (Tabela 3). A população era de 405 indivíduos, dividindo-se em 218 operárias, 59 larvas, 60 pupas, 156 alados e 12 pupas aladas.

O ninho 3 (Figura 4) apresentava duas câmaras, profundidade total de 18,8cm (Tabela 3) e ausência da torre de entrada. A câmara 1 distanciava 7cm em relação ao solo e estava abaixo e à esquerda do orifício de abertura do ninho. Possuía volume de $6,28\text{cm}^3$ e apresentava pequena quantidade de fungo, operárias e cria. Distanciava-se da câmara 2 em 4cm. A câmara 2, por sua vez, localizava-se abaixo e levemente à esquerda da câmara 1, com volume de $10,74\text{cm}^3$ e encontrava-se vazia. As duas câmaras apresentaram volume médio de $8,51\pm 3,15\text{cm}^3$. O volume total de fungo encontrado foi 14cm^3 (Tabela 3) e a população era de 29 indivíduos, sendo 21 operárias, 3 larvas e 5 pupas.

O ninho 4 (Figura 5) possuía torre de entrada medindo $0,7\times 0,5\text{cm}$ (Tabela 2), 3 câmaras e profundidade total de 54cm (Tabela 3). A câmara 1, com volume de $57,6\text{cm}^3$, encontrava-se abaixo e à esquerda do orifício de entrada e distanciando dele em 5,5cm. Apresentava a totalidade de volume de fungo encontrado na colônia, que era 19cm^3 (Tabela 3), além de cria e operárias. O túnel de ligação entre as câmaras 1 e 2 possuía 21,5cm de comprimento. A câmara 2 localizava-se abaixo e em posição paralela à anterior, com volume de $3,36\text{cm}^3$. Já a câmara 3 distanciava em 14,5cm da câmara 2, localizava-se abaixo e à esquerda dela e apresentava volume de $11,78\text{cm}^3$. O volume médio das três câmaras foi $24,25\pm 29,19\text{cm}^3$. Em relação à população, foi possível contar apenas o número de operárias, uma vez que a cutícula das larvas e pupas sofreu danos durante a conservação em álcool 70%, o que impossibilitou a sua diferenciação e contagem. O total de operárias foi 149.

No ninho 5 (Figura 6), a torre de entrada estava ausente. O ninho possuía três câmaras e profundidade de 52,5cm (Tabela 3). A câmara 1 distanciava 7,0cm do orifício de entrada e apresentava volume de $47,12\text{cm}^3$. O túnel de ligação entre as câmaras 1 e 2 era de 4,0cm de comprimento. A câmara 2 localizava-se abaixo e à direita da anterior e apresentava volume de $25,13\text{cm}^3$. Já a câmara 3, localizada abaixo e à esquerda da

câmara 2, e praticamente paralela à câmara 1, distanciava 30cm da câmara 2 e com volume de $3,93\text{cm}^3$. O volume total de fungo foi 53cm^3 (Tabela 3) e o volume médio das câmaras, $25,39\pm 21,59\text{cm}^3$. Foram encontradas 68 operárias e a população de larvas e pupas não pôde ser quantificada, pelas mesmas razões apresentadas na descrição do ninho 4.

O ninho 6 (Figura 7) não apresentava torre de entrada. Possuía três câmaras e profundidade de 66cm (Tabela 3). A câmara 1 localizava-se a 8cm do orifício de entrada e apresentava volume de $109,96\text{cm}^3$. O túnel de ligação entre as câmaras 1 e 2 era de 4,5cm de comprimento. A câmara 2, abaixo e à direita da câmara 1, apresentava volume de $75,16\text{cm}^3$. O túnel de ligação entre as câmaras 2 e 3 possuía 37,7cm de comprimento. Já a câmara 3, abaixo e levemente à esquerda da câmara 2, apresentava volume de $20,94\text{cm}^3$. O volume médio das câmaras foi $68,69\pm 44,86\text{cm}^3$ e o volume total de fungo, 52cm^3 (Tabela 3). O total de operárias era 121 indivíduos e a quantificação de larvas e pupas não foi possível.

Por fim, no ninho 7 (Figura 8), no qual encontrava-se ausente a torre de entrada, foram encontradas cinco câmaras, em uma profundidade total de 60cm (Tabela 3). A câmara 1, paralela ao orifício de entrada do ninho e distanciado dele em 2cm, possuía volume de $31,42\text{cm}^3$ e encontrava-se vazia. A câmara 2, abaixo e à esquerda da câmara 1 e distante dela em 3cm, apresentava volume de $84,82\text{cm}^3$, com presença de fungo, cria e operárias. O túnel de ligação entre as câmaras 2 e 3 era de 12cm de comprimento. A câmara 3, abaixo e à direita da câmara 2, continha fungo, cria e operárias, porém, em menor quantidade em relação à câmara 2. Possuía volume de $62,83\text{cm}^3$ e distanciava da câmara 4 em 7cm. A câmara 4, por sua vez, possuía volume de $3,14\text{cm}^3$ e estava vazia. O túnel de ligação entre as câmaras 4 e 5 possuía comprimento de 15cm. Já a câmara 5 também encontrava-se vazia e apresentava $7,23\text{cm}^3$ de volume. O volume médio das câmaras foi $37,89\pm 35,40\text{cm}^3$ e o de fungo, 26cm^3 (Tabela 3). O número total de operárias era 260 e não foi possível quantificar larvas e pupas.

Externamente, todos os ninhos apresentavam um único olheiro e, próximo a ele, um amontoado de lixo no formato de pequenas esferas. Os ninhos 1, 2 e 4 continham uma torre de entrada característica, recobrando o olheiro (Figura 1 - Ninho 4),

geralmente formada por terra e folhas secas, com médias de largura de $0,7 \pm 0,1$ cm e comprimento de $0,5 \pm 0,3$ cm (Tabela 2). O padrão de entrada com um único olheiro, por vezes recoberto pela torre de terra e folhas secas, além do amontoado de lixo, também foi observado para *Trachymyrmex fuscus* (ARAÚJO; DELLA-LUCIA; MAYHÉ-NUNES, 2002). Lizidatti (2006) descreve a presença de torre para *T. holmgreni*, porém, nessa espécie, relata-se também um fosso, semelhante a um olheiro, mas de fundo cego, que não é encontrado em *T. tucumanus*. Em relação a *T. fuscus* e *T. holmgreni*, *T. tucumanus* apresenta as menores dimensões da torre de entrada. A função da torre ainda não está totalmente esclarecida. Mayhé-Nunes e Brandão (2006) colocam que, em Attini basais, a torre pode impedir a entrada de água da chuva nos ninhos. Weber (1945) infere que ela serviria para proteção do ninho contra a perda de umidade, que muitas vezes pode atrapalhar o cultivo do fungo simbiote. Já Lizidatti (2006) hipotetiza a torre como um mecanismo seletor no tamanho do substrato a ser introduzido na colônia.

Tabela 2: Largura e comprimento, em centímetros, das torres de entrada dos ninhos de *T. tucumanus*.

	Largura	Comprimento
Ninho 1	0,6	1,0
Ninho 2	0,8	0,8
Ninho 4	0,7	0,5
Média	0,7	0,8
Desvio Padrão	0,1	0,3



Figura 1: Ninho 4, com torre de entrada característica, indicada pela seta.

Os ninhos escavados apresentavam de 2 a 5 câmaras, sendo que a maioria apresentava 3. O volume médio das câmaras foi $41,73 \pm 37,06 \text{ cm}^3$ (Tabela 3), calculado de acordo com a fórmula de volume de esfera (MOREIRA; FORTI, 1999), representada por: $\frac{1}{6} \pi abc$, com a, b e c referentes, respectivamente, às medidas de comprimento, largura e altura de cada câmara. O padrão de disposição das câmaras era perpendicular, com as câmaras dispostas verticalmente e, por vezes com um leve desvio para esquerda ou para a direita. Arranjo semelhante ocorre também para *T. fuscus* (ARAÚJO, DELLA-LUCIA; MAYHÉ-NUNES, 2002) e *T. holmgreni* (LIZIDATTI, 2006), podendo indicar um padrão existente no gênero. No entanto, são necessários estudos descritivos de arquitetura de ninho com mais espécies para que se possa validar essa hipótese.

Tabela 3: Dimensões, volume de fungo, total de operárias e volume das câmaras dos ninhos escavados de *T. tucumanus*.

Colônia	Altura do ninho (cm)	Volume de fungo (cm ³)	Total de operárias	Volume da câmara (cm ³)	Câmara
Ninho 1	33,0	29,0	93	3,77	C1
				78,54	C2
				75,40	C3
Ninho 2	73,0	48,0	218	112,31	C1
				75,40	C2
				11,00	C3
Ninho 3	18,8	14,0	29	6,28	C1
				10,74	C2
Ninho 4	54,0	19,0	149	57,60	C1
				3,46	C2
				11,78	C3
Ninho 5	52,5	53,0	68	47,12	C1
				25,13	C2
				3,93	C3
Ninho 6	66,0	52,0	121	109,96	C1
				75,16	C2
				20,94	C3
Ninho 7	60,0	26,0	260	31,42	C1
				84,82	C2
				62,83	C3
				3,14	C4
				7,23	C5
Média	51,04	34,43	134,00	41,73	
Desvio padrão	18,98	16,30	82,04	37,06	

As profundidades dos ninhos em relação ao solo variaram de 18,8 a 73cm, com média de 51,04±18,98cm (Tabela 3). Observou-se que, com exceção dos ninhos 3 e 4, o túnel que conduzia à última câmara apresentava uma altura significativamente maior em relação aos demais túneis (Tabela 4). Além disso, com exceção dos ninhos 1, 3 e 4, há uma diminuição progressiva do volume das câmaras conforme elas se distanciam do olheiro (Tabela 3), sendo que, em todos os casos, a última câmara apresentou-se vazia ou com pequena quantidade de fungo e cria.

Nesse contexto, pode-se inferir que a última câmara esteja em construção nos ninhos apresentados, embora essa hipótese não justifique a distância diferenciada em relação às demais câmaras. Também poderia servir como câmara de lixo, porém, em todos os ninhos foi encontrado um montículo de lixo ao lado do olheiro. Além disso, a última câmara foi encontrada vazia ou exaurida em relação a fungo e cria, o que dificulta essa inferência. Uma terceira hipótese seria a última câmara servindo como “câmara de segurança”. Como se observa na Tabela 6, a distância entre a primeira

câmara e a entrada do ninho é, em média, de 3,58cm e, com exceção do ninho 4, a segunda câmara localiza-se, em média, a 18,43cm da entrada do ninho, tendo a medida máxima no ninho 2 (33,5cm) e mínima (15cm), nos ninhos 1 e 5. Essas distâncias, relativamente curtas, implicam em maior vulnerabilidade das câmaras aos fatores ambientais, como temperatura, umidade do solo e precipitações atmosféricas, visto que o gradiente de umidade do solo pode garantir condições microclimáticas para a colônia (SUDD, 1982). Por essa razão, a última câmara poderia servir como uma “câmara de segurança”, que garantiria a integridade da rainha e de parte da colônia em situações adversas, como baixa umidade, altos índices pluviométricos e temperaturas extremas, mas também pouparia a colônia do gasto energético envolvido na construção de ninhos mais profundos.

Os ninhos 1, 3 e 4, porém, não apresentaram o padrão descrito acima. O ninho 3, que possuía somente duas câmaras, apresenta volume de fungo e número de operárias inferior aos demais (Tabela 3). Isso pode indicar que o ninho esteja no início de sua fase de construção ou até mesmo, em declínio por morte da rainha, uma vez que ela não foi encontrada durante as escavações. O ninho 4, por sua vez, apesar de também apresentar 3 câmaras, possui o maior túnel ligando as câmaras 1 e 2 e não as câmaras 3 e 4, como os demais (Tabela 4). Além disso, a câmara com menores dimensões é a câmara 2 e não a câmara 3 (Tabela 3). Desta forma, ele apresenta um padrão distinto do que foi constatado para os demais ninhos. Essa população, em especial, apresentou resultados diferenciados na análise do DNA mitocondrial, que serão descritos mais adiante, podendo indicar uma linhagem à parte das demais populações, o que explicaria parcialmente as discrepâncias encontradas. Já no ninho 1, a disparidade está na dimensão das câmaras que, ao contrário do que foi encontrado para as demais populações, tende a aumentar com a profundidade do ninho, de forma que a terceira câmara possui as maiores dimensões, aproximando-se, neste sentido, do padrão encontrado nas demais espécies do gênero *Trachymyrmex* (ARAÚJO; DELLALUCIA; MAYHÉ-NUNES, 2002; LIZIDATTI, 2006; WEBER, 1945) e na maioria da tribo Attini (FERNANDES-MARIN et al., 2004).

Tabela 4: Altura (cm) dos túneis que interligam as câmaras. C refere-se à câmara.

	Entrada-C1	C1-C2	C2-C3	C3-C4	C4-C5
Ninho 1	2	4	12	-	-
Ninho 2	12	10	36	-	-
Ninho 3	7	4	-	-	-
Ninho 4	5,5	21,5	14,5	-	-
Ninho 5	7	4	30	-	-
Ninho 6	8	4,5	37,7	-	-
Ninho 7	2	3	12	7	15

Foi realizada uma comparação entre os dados obtidos neste estudo e os provenientes dos trabalhos de Araújo, Della-Lucia e Mayhé-Nunes (2002), com *Trachymyrmex fuscus* e de Lizidatti (2006), com *T. holmgreni* (Tabela 5). A média do número de câmaras, para todas as espécies, é 3. Os ninhos de *T. tucumanus* mostraram as menores profundidades máximas, bem como a menor média de profundidade da primeira câmara. Isso pode indicar que a espécie seja mais tolerante aos efeitos de fatores abióticos, como temperatura e umidade do solo, pois, além de os ninhos serem encontrados exclusivamente em áreas abertas, a primeira câmara, com fungo e cria em alguns ninhos, apresenta-se relativamente rasa e, conseqüentemente, mais suscetível às condições climáticas.

Outra diferença importante está nas médias das dimensões das três câmaras. Em *T. holmgreni* e em *T. fuscus* as dimensões das câmaras tendem a aumentar, conforme aumenta sua altura em relação ao solo, sendo que a câmara 3 é a que possui maiores dimensões, para as duas espécies. Já para *T. tucumanus*, há uma diminuição nas dimensões das câmaras conforme aumenta a profundidade em relação à entrada do ninho, de forma que a última câmara é a menor (com exceção do ninho 1). Isso reforça a hipótese de que, para *T. tucumanus*, a terceira câmara tenha uma função diferenciada. Em um estudo sobre o estabelecimento de ninhos de alguns gêneros da tribo Attini, Fernandez-Marin et al. (2004) coloca que, em geral, a primeira câmara é relativamente menor em Attini, facilitando a manutenção da higiene necessária para o estabelecimento do jardim de fungo. Tal inferência não foi verificada em *T. tucumanus*, que talvez possa ser explicada pela diferença entre as idades dos ninhos analisados nos estudos, levando-se em consideração que nesse estudo a maioria dos ninhos estaria em estágio maduro e, na pesquisa citada, os ninhos eram recém fundados.

Tabela 5: Dimensões comparadas dos ninhos de *Trachymyrmex tucumanus*, *T. holmgreni* e *T. fuscus*. N corresponde ao número de ninhos escavados em cada trabalho.

	<i>Trachymyrmex tucumanus</i> (n=7)	<i>Trachymyrmex holmgreni</i> (n=4) Lizidatti, 2006	<i>Trachymyrmex fuscus</i> (n=7) Araújo; Della Lucia; Mayhé-Nunes, 2002
Número de Câmaras	3	3	3
Profundidade da 1ª Câmara (cm)	3,58	7,8	5,2
Dimensões da 1ª Câmara (cm)	4,9 X 3,6 X 4,7	4,6 X 3,7 X 2,6	4,4 X 3,6 X 3,03
Dimensões da 2ª Câmara (cm)	4,5 X 3,6 X 4,8	7,4 X 5,4 X 4,8	11,0 X 12,0 X 7,0
Dimensões da 3ª Câmara (cm)	4,0 X 2,5 X 4,7	10,9 X 8,1 X 5,4	23,0 X 19,0 X 12,0
Profundidade máxima do ninho (cm)	33 a 73	99 a 130	111 a 208

Relacionando o modelo encontrado para *Trachymyrmex tucumanus* neste estudo e os modelos descritos para *Atta* sp., por Mariconi (1970), pode-se observar em *Atta* sp. um grande aumento na complexidade estrutural, que engloba aspectos como número de câmaras (1027 em *Atta* sp. e 3 para *T. tucumanus*), quantidade de entradas (múltiplas para *Atta* sp. e única para *T. tucumanus*) e distribuição das câmaras (câmaras dispersas, com funções de armazenamento de lixo e cultivo de fungo, para *Atta* sp.).

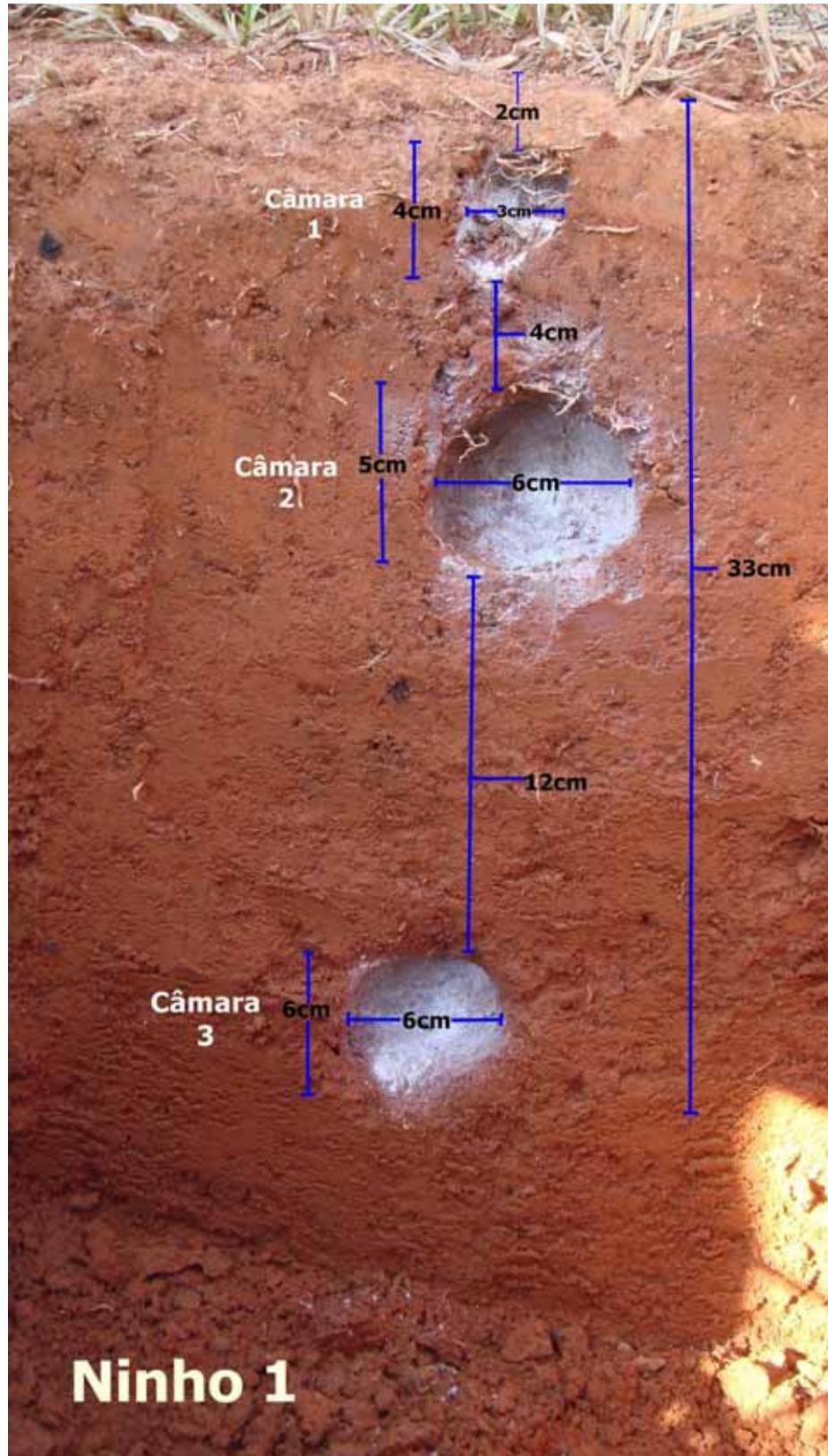


Figura 2: Ninho 1 – vista interna das câmaras marcadas com talco neutro.

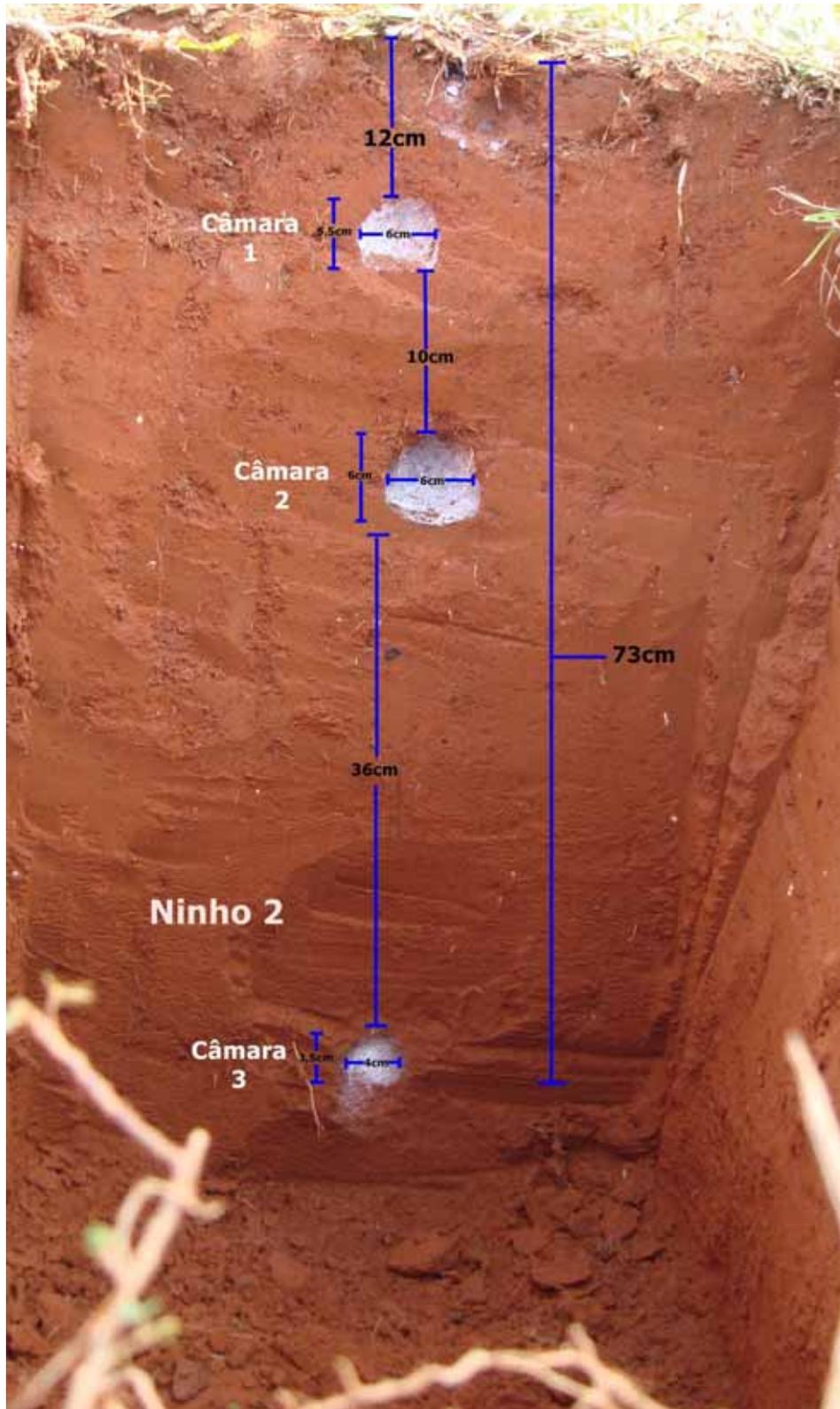


Figura 3: Ninho 2 – vista interna das câmaras marcadas com talco neutro.

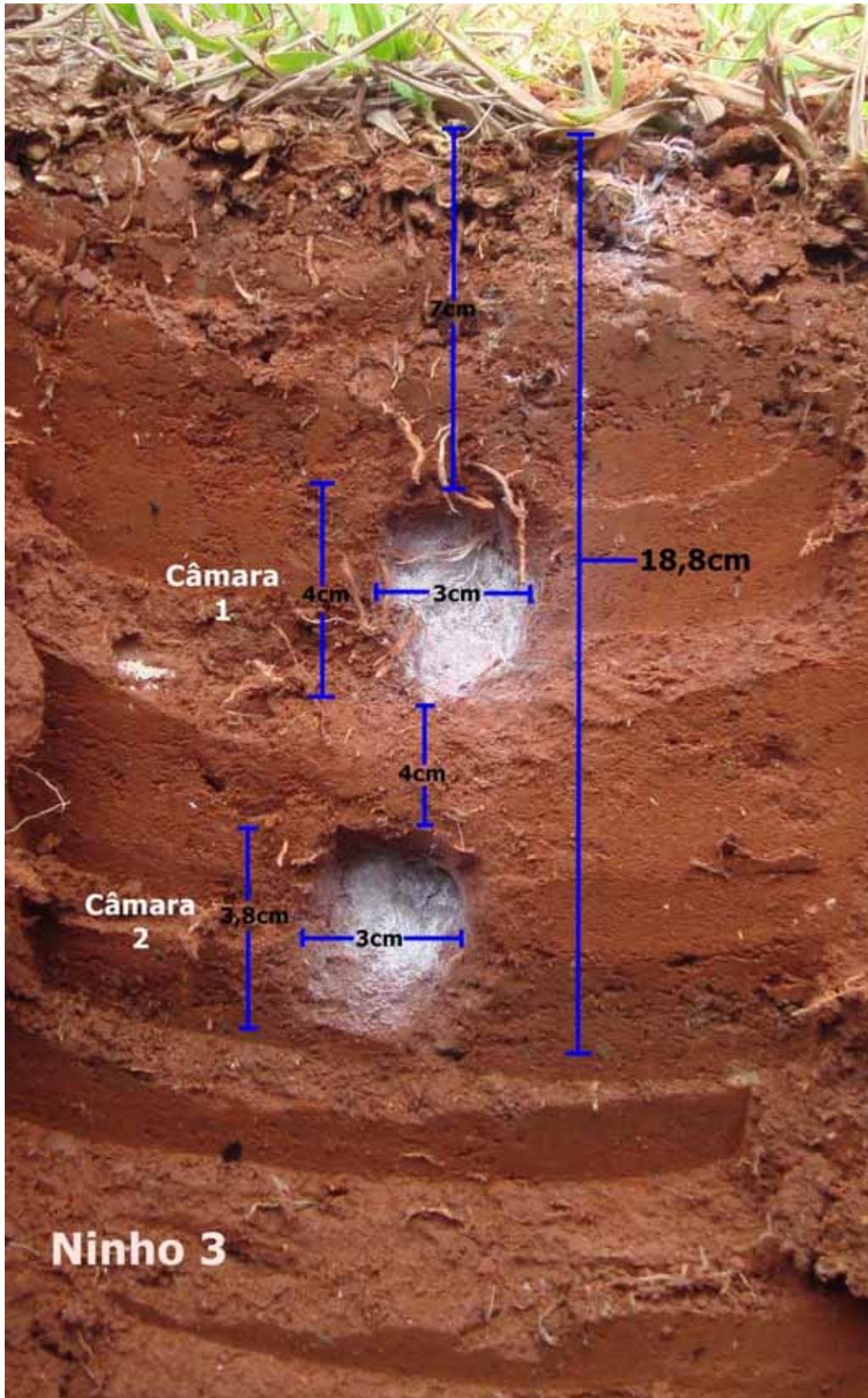


Figura 4: Ninho 3 – vista interna das câmaras marcadas com talco neutro.

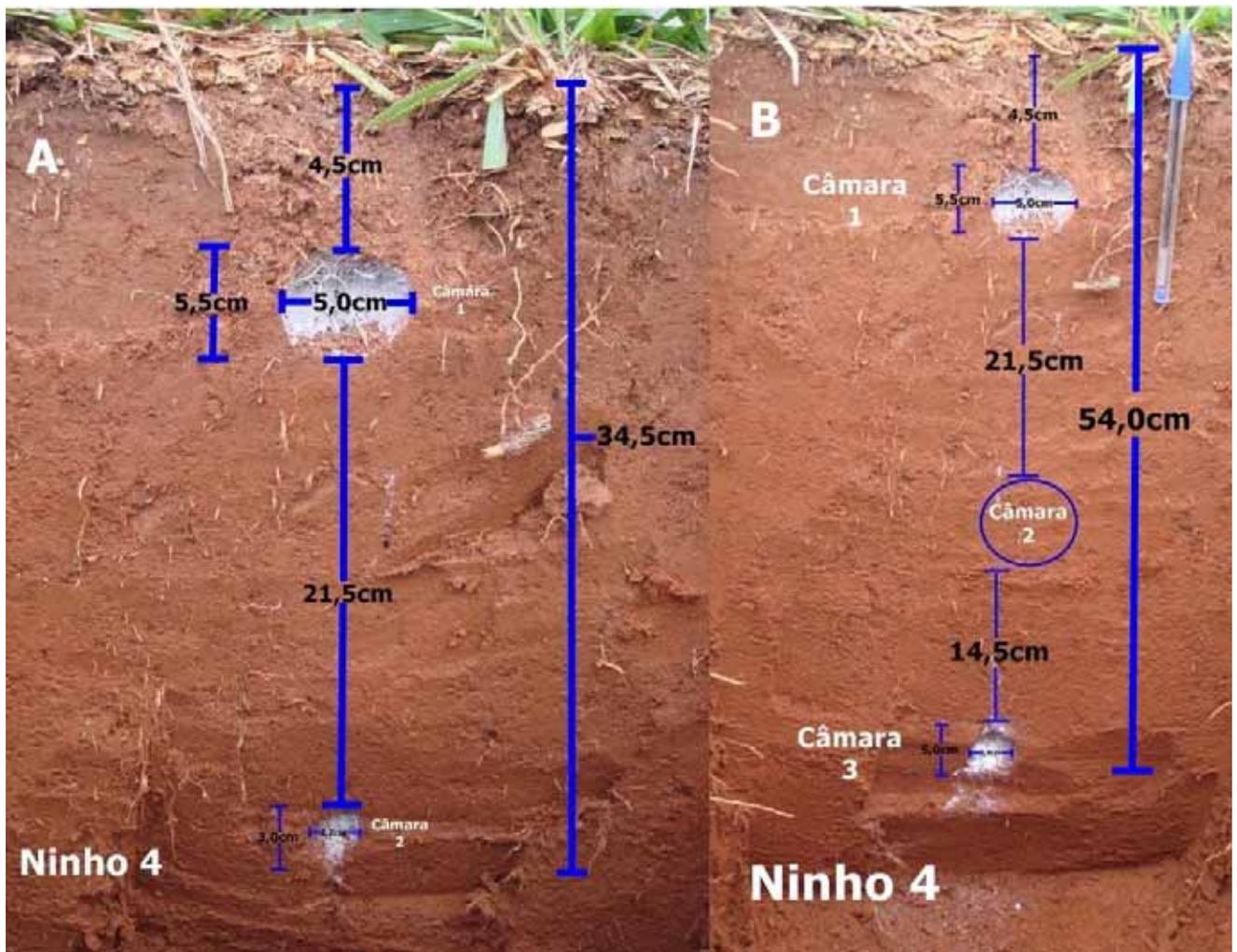


Figura 5: Ninho 4 – vista interna das câmaras marcadas com talco neutro. A) Câmaras 1 e 2. B) Câmaras 1 e 3, com montagem da localização da câmara 2.

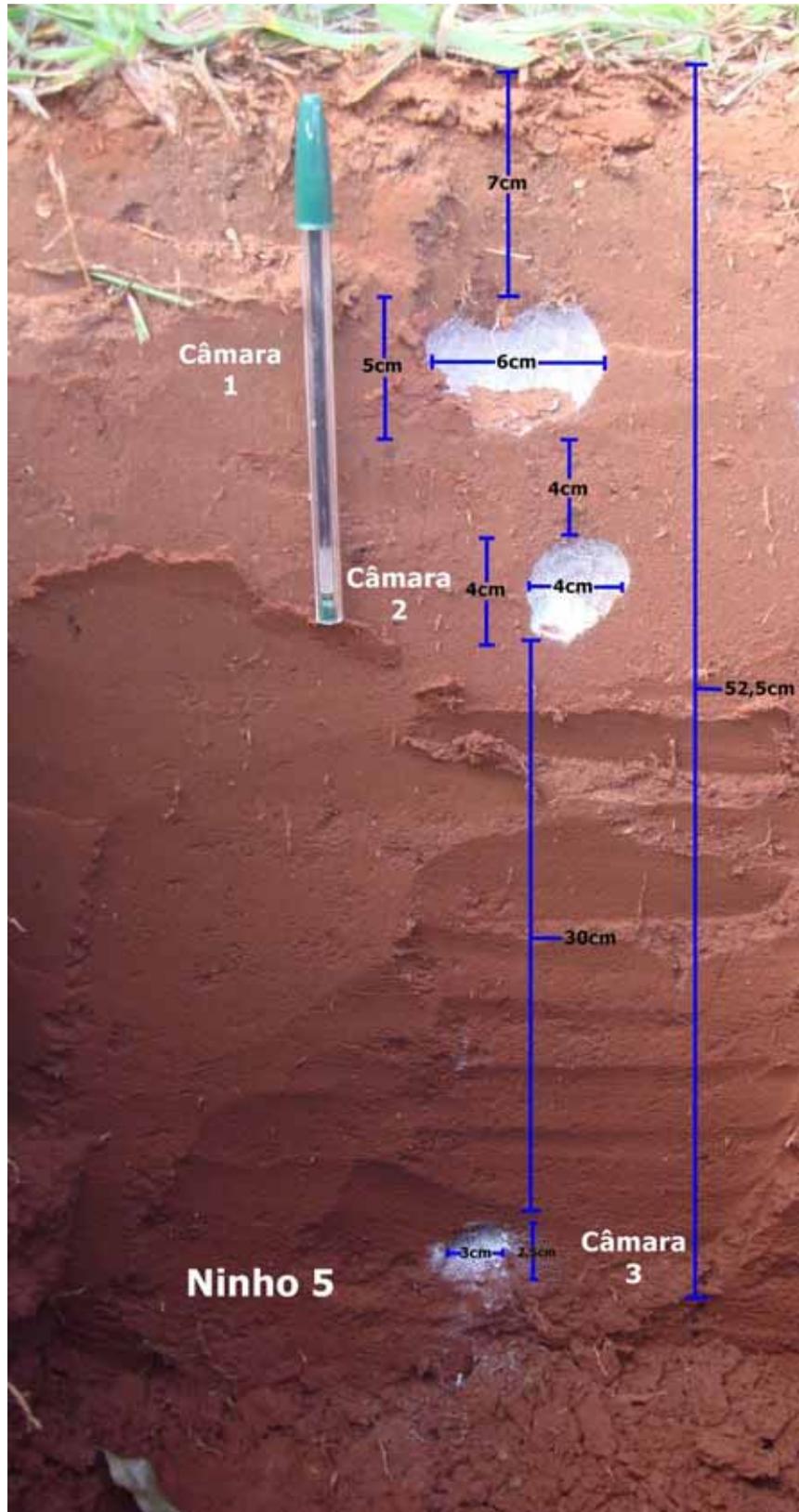


Figura 6: Ninho 5 – vista interna das câmaras marcadas com talco neutro.

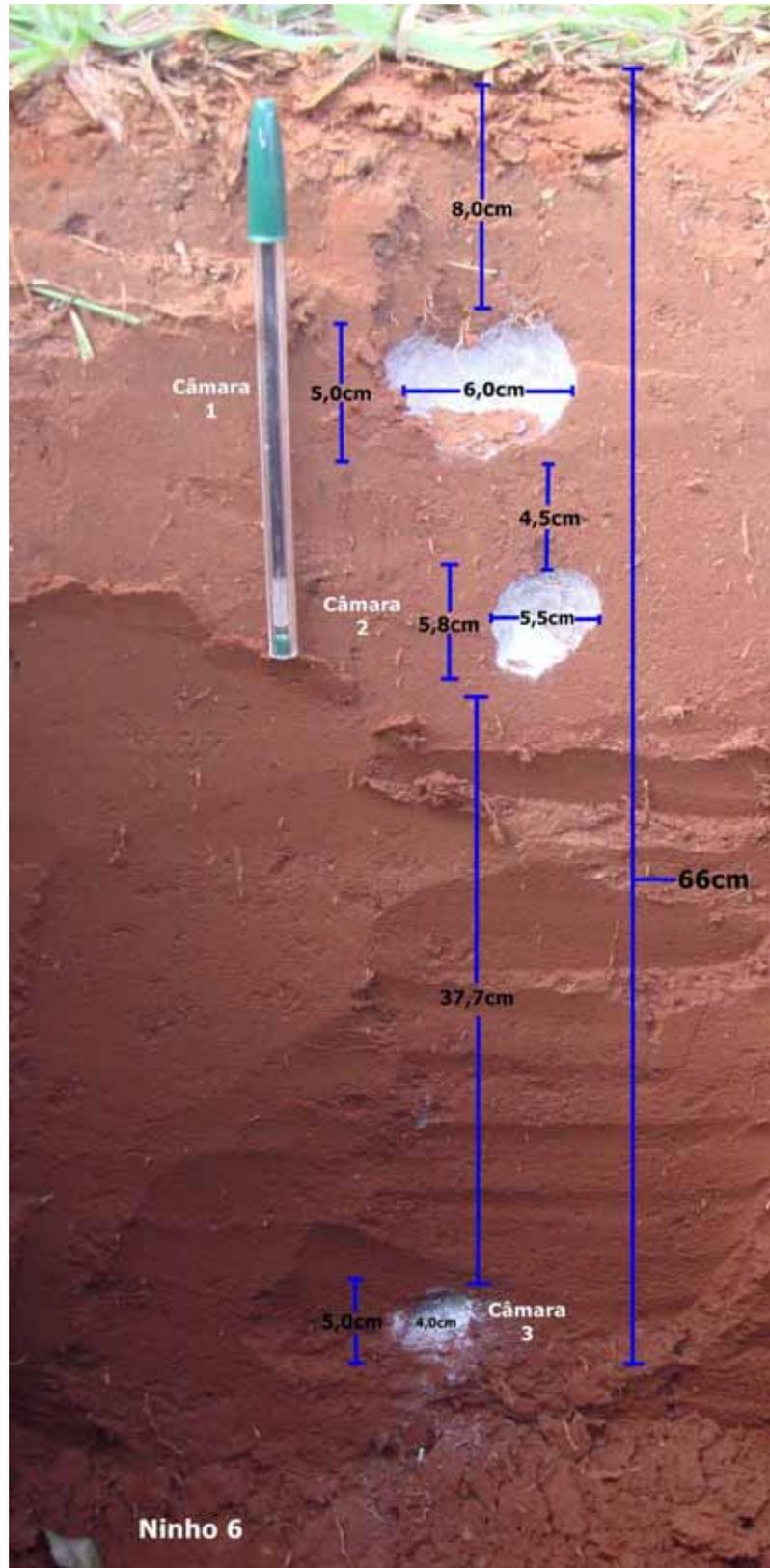


Figura 7: Ninho 6 – vista interna das câmaras marcadas com talco neutro.

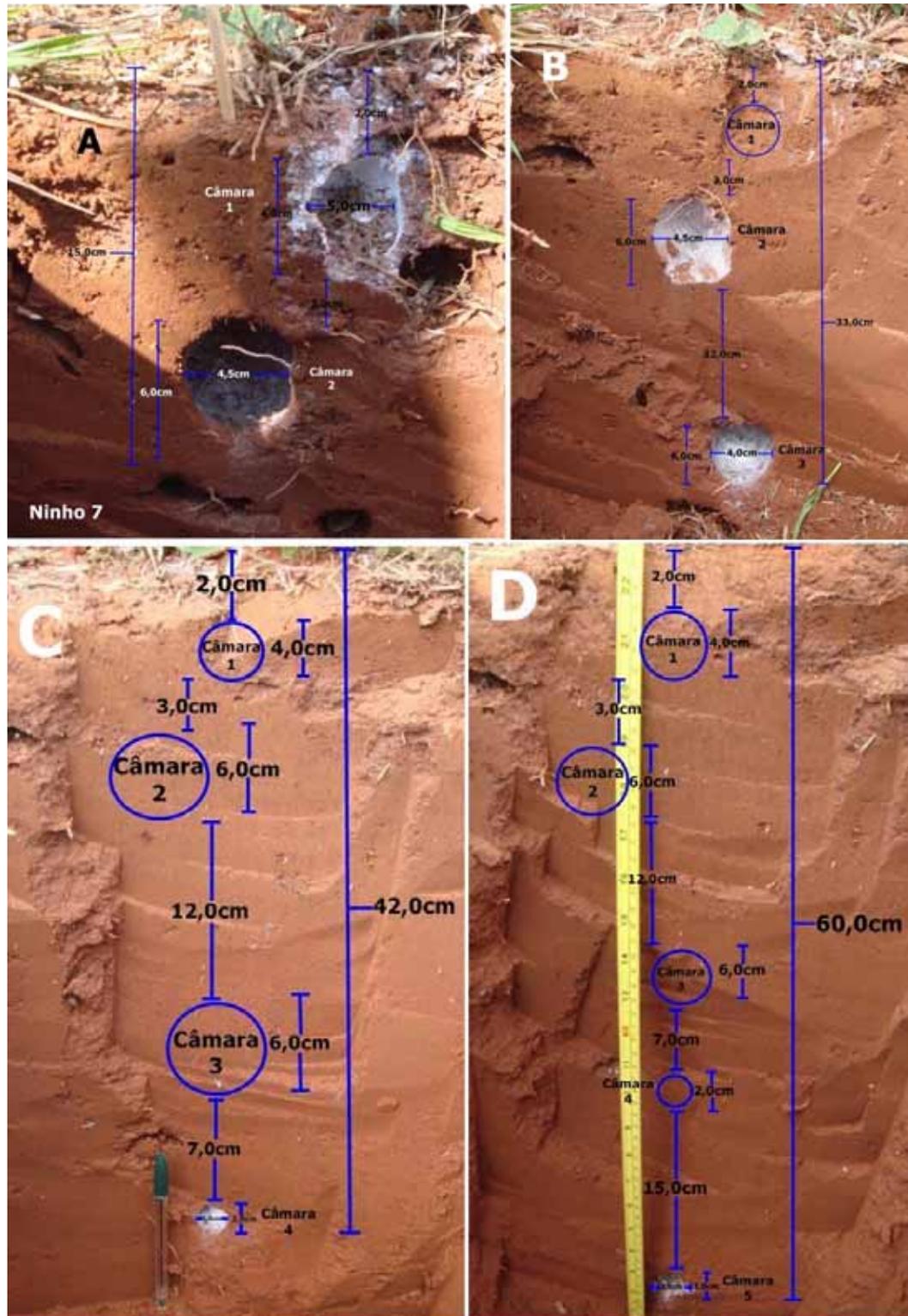


Fig. 8: Ninho 7 – A) Câmaras 1 e 2; B) Câmaras 2 e 3 e reconstituição da câmara 1; C) Câmara 4 e reconstituição das câmaras 1, 2 e 3; D) Reconstituição do ninho completo.

4.2. Análise das seqüências do gene mitocondrial citocromo c oxidase

Foi realizada a extração do DNA genômico, de acordo com o protocolo descrito, de oito populações, sendo que as populações 1 a 7 foram utilizadas também para descrição da arquitetura dos ninhos neste trabalho. A extração das populações 1 e 2 foi realizada em duplicata, com um indivíduo por extração, aqui denominadas 1a, 1b, 2a e 2b. As demais extrações foram realizadas uma única vez, com um indivíduo por população. Pela análise dos géis de agarose 1% (Figura 9), conclui-se que foram obtidas bandas com material genômico suficiente para dar prosseguimento à PCR.

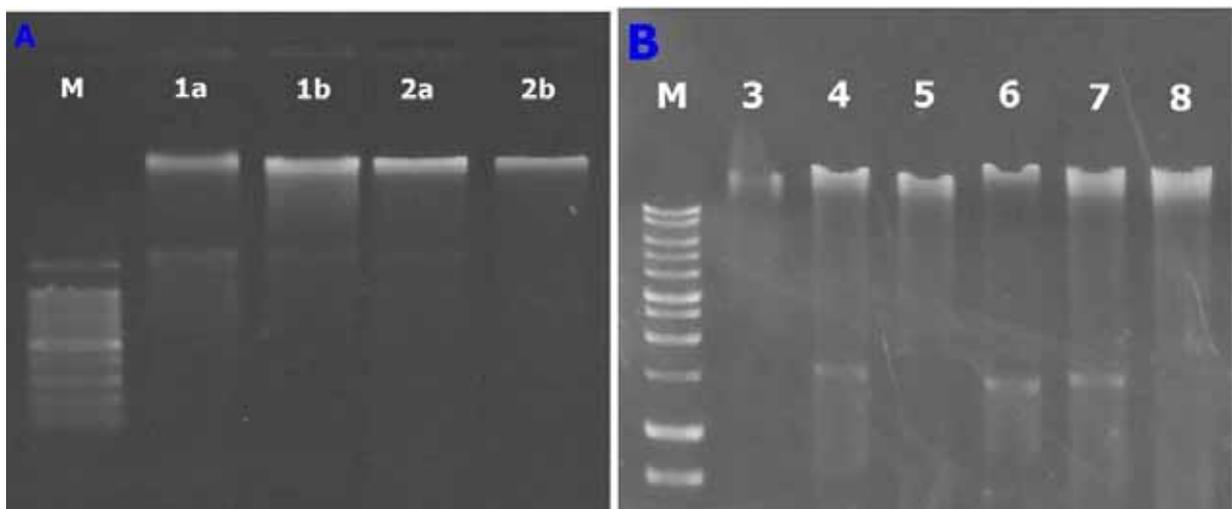


Figura 9: Fotografia dos géis de agarose 1% obtidos a partir da extração de DNA de *Trachymyrmex tucumanus*. A letra M indica o marcador molecular. A) Extração das populações 1 e 2, em duplicata. B) Extração das populações 3 a 8.

As reações de PCR com o primer selecionado foram realizadas com êxito (Figura 10) e procedeu-se, então, a purificação dos produtos da PCR. Para dar continuidade aos protocolos de seqüenciamento, as amostras 1a, 1b, 2a e 2b foram submetidas em gel de agarose 1% (Figura 11) e a verificação das amostras restantes (3 a 8) foi feita através de NanoDrop (Tabela 6).

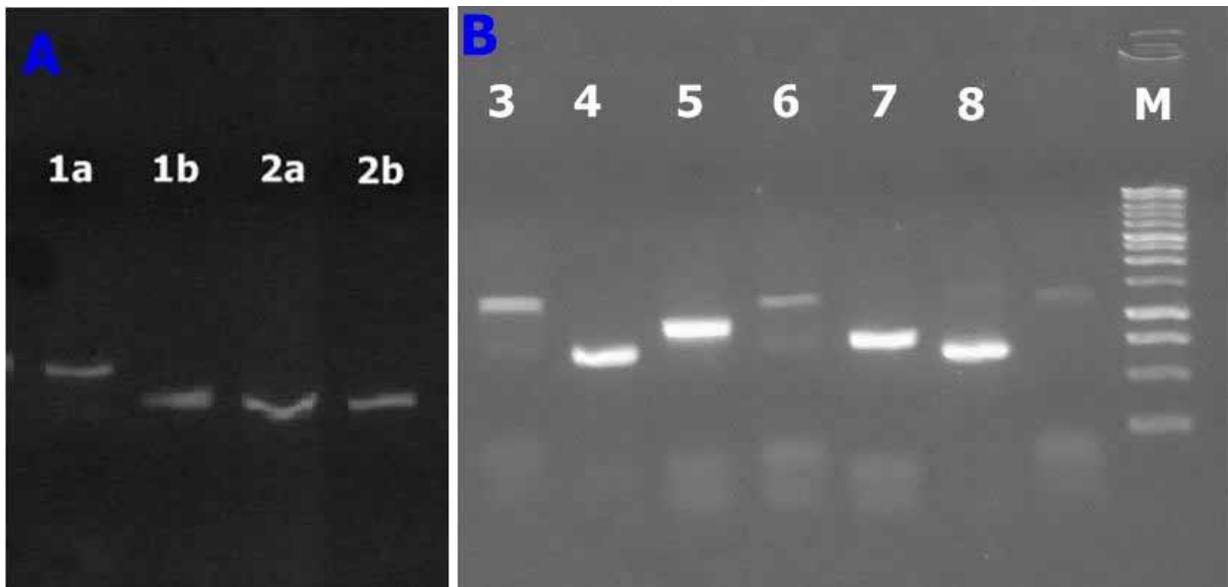


Figura 10: Fotografia dos géis de agarose 1% com o material genético extraído de *Trachymyrmex tucumanus*. A letra M indica o marcador molecular. A) Amplificação das populações 1 e 2, em duplicata. B) Amplificação das populações 3 a 8.

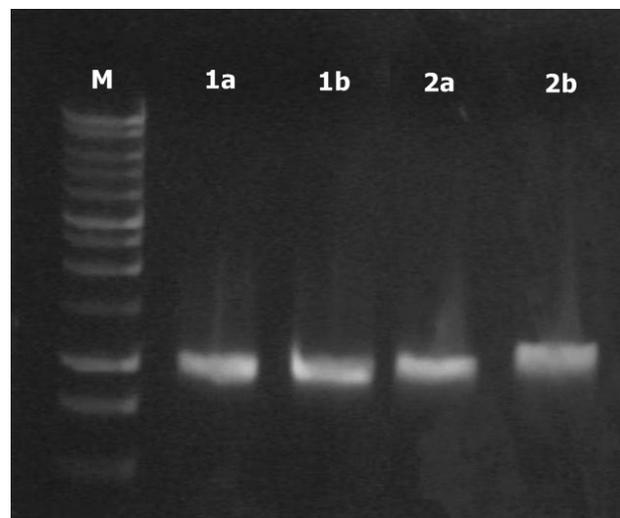


Figura 11: Fotografia do gel de agarose 1% obtido pela purificação dos produtos da PCR, para as amostras 1 e 2. A letra M indica o marcador molecular.

Tabela 6: Quantificação do mtDNA obtido após a purificação dos produtos da PCR das amostras 3 a 8.

Amostra	Quantidade de DNA (μ l)
3	3,4
4	5,7
5	26,3
6	20,4
7	6,5
8	22

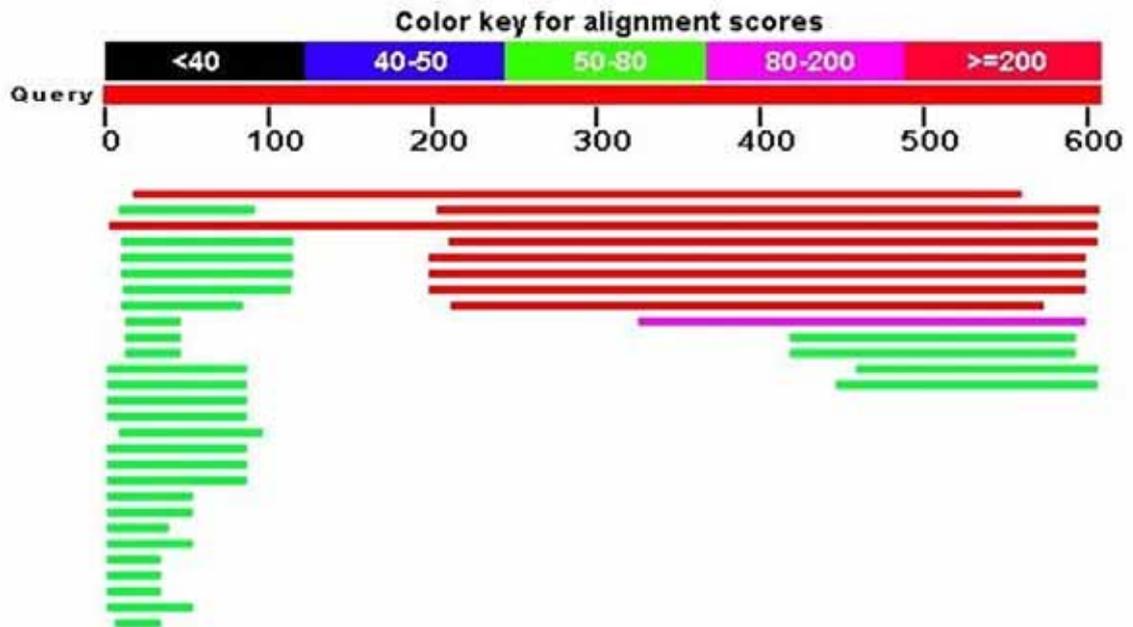
Todas as amostras foram submetidas ao seqüenciamento, produzindo seqüências entre 607 e 613 pares de bases. Foram escolhidas as seqüências 1a e 2a das populações em duplicata. As populações 3 e 7 não foram utilizadas neste estudo pois geraram seqüências de apenas uma das fitas do DNA. As seqüências obtidas foram alinhadas através do programa BioEdit e, em seguida, foram geradas seqüências consenso por intermédio do programa Clustalw (HIGGINS; BLEASBY; FUCHS, 1992) que, por sua vez, foram submetidas à análise de BLAST, no NCBI. Todas as seqüências, com exceção daquela referente à população 4, apresentaram resultados semelhantes ao mostrado na Figura 12, que representa as conformações obtidas para a população 1.

De acordo com a Figura 12 pode-se observar que a maior proximidade, de 88%, se dá com *Trachymyrmex zeteki*, com baixo valor de e-value ($2e-123$), confirmando a similaridade entre as seqüências. *Atta cephalotes* aparece com o segundo valor de proximidade, com identidade de 77% e e-value de $3e-172$. No entanto, o percentual de alinhamento entre as seqüências é baixo (66%), provavelmente correspondendo às regiões conservadas do fragmento do mtDNA. As demais formigas não demonstram altos valores de identidade, nem e-value baixos como os citados acima, além de não fazerem parte da tribo Attini. Apenas uma espécie de *Trachymyrmex* (*T. zeteki*) apresentava o fragmento de mtDNA analisado nesse trabalho depositado no GenBank, o que impossibilitou a construção de uma árvore filogenética exclusiva do gênero, que seria muito relevante para averiguar as relações de parentesco de *T. tucumanus* com as demais espécies do gênero. Portanto, optou-se em trabalhar com as relações entre as populações selecionadas neste estudo. Pesquisas posteriores, com a extração do fragmento do mtDNA que inclui as regiões das enzimas COI-LeutRNA-IGS-COII para as demais espécies de gênero *Trachymyrmex* poderão ser úteis no estabelecimento de

relações de parentesco dentro do gênero e, futuramente, das relações com os demais gêneros da tribo Attini.

Figura 12: Resultados gerados no NCBI, com a ferramenta BLAST, para a sequência obtida a partir da população 1 de *Trachymyrmex tucumanus*

Sequences producing significant alignments:						
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AF016075.1	Trachymyrmex zeteki cytochrome oxidase I (COI) gene, partial c	451	451	88%	2e-123	82%
FU169434.1	Atta cephalotes isolate SES040123-08 cytochrome oxidase subun	281	281	66%	3e-72	79%
AF147041.1	Anonychomyrma sp. ACBN.1 cytochrome c oxidase subunit I (CC	265	265	99%	3e-67	75%
AY519425.1	Myrmecocystus mexicanus isolate 2 cytochrome oxidase subunit	215	215	65%	3e-52	77%
FU253253.1	Myrmecaria sp. O3 cytochrome oxidase subunit I gene, partial cds	209	209	65%	1e-50	77%
FU253252.1	Myrmecaria sp. O2 cytochrome oxidase subunit I gene, partial cds	209	209	65%	1e-50	77%
FU253251.1	Myrmecaria sp. O1 cytochrome oxidase subunit I gene, partial cds	209	209	65%	1e-50	77%



Dentre os métodos utilizados para construção de árvores filogenéticas estão as matrizes de distância ou análises de estados de caráter. O método de matrizes de distância baseia-se na transformação de uma matriz de caracteres em uma matriz de distância. Para tanto, podem ser usados os métodos de UPGMA, Quadrados Mínimos (LS, *least squares*), Evolução Mínima (ME, *minimum evolution*) e Agrupamento de Vizinhos (NJ, *neighbor-joining*). Os métodos de análises de estados de caráter, por sua vez, utilizam as análises de Máxima Parcimônia (MP, *maximum parsimony*), Máxima Verossimilhança (ML, *maximum likelihood*) e Inferência Bayesiana (IB, *Bayesian Inference*) (SCHNEIDER, H., 2003).

O método de neighbor-joining (SAITOU; NEI, 1987) baseia-se na reconstrução de árvores filogenéticas a partir de dados de distância evolutiva, com o princípio de encontrar pares de táxons que minimizem o comprimento total dos ramos da árvore. Pressupõe que as espécies com menores distâncias entre si sejam mais proximamente relacionadas (RIDLEY, 2006) e pode ser utilizado para inferir similaridade entre haplótipos. Na Figura 13 está representada a árvore de neighbor-joining para as populações de *T. tucumanus*. Observa-se que, de acordo com os resultados, há a formação de três agrupamentos.

O agrupamento A, aproximando as populações 2 e 8, é sustentado por um alto valor de bootstrap (>50), o que aumenta a confiabilidade dessa aproximação. O agrupamento B é caracterizado por uma politomia que abrange as populações 1, 5 e 6. Porém, o baixo valor de bootstrap (<50) indica baixa confiabilidade na separação com o grupo A, que deve ser confirmada por outros métodos, como o de máxima parcimônia. Por fim, há a separação da população 4 das demais. Esses resultados podem demonstrar a existência de variabilidade genética na espécie *Trachymyrmex tucumanus*, mesmo em populações próximas, podendo indicar, inclusive, separação em linhagens. No entanto, para confirmar essa hipótese, são necessárias análises de fluxo gênico para verificar a troca de genes entre as linhagens, além de estudos com populações de regiões distintas.

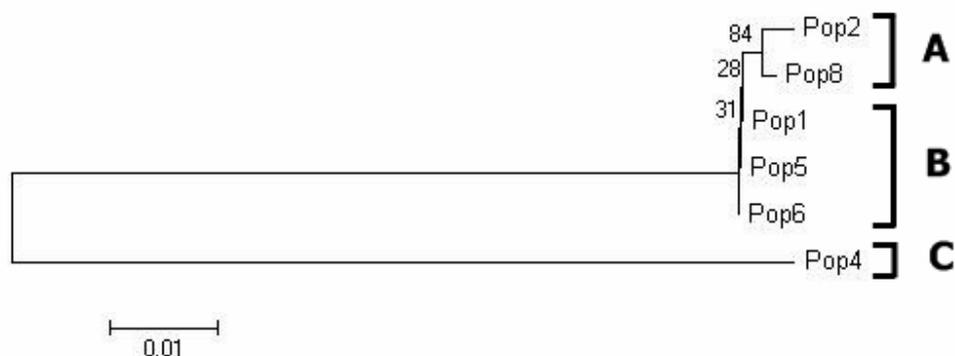


Figura 13: Árvore gerada pelo método Neighbor-joining, usado para comparação entre as seqüências obtidas no trabalho.

Foi realizada a análise pelo método de máxima parcimônia, utilizando como grupos externos alguns táxons estudados por Wetterer, Schultz e Meier (1998), em seu trabalho sobre filogenia da tribo Attini. Sete espécies foram selecionadas (Tabela 7),

dividas em: uma espécie não pertencente à tribo Attini, mas proximamente relacionada a ela (*Wasmannia auropunctata*) (SCHULTZ; MEIER, 1995); duas espécies basais, pertencentes à tribo Attini (*Mycocepurus goeldii* e *Apterostigma collare*); duas espécies intermediárias da tribo (*Trachymyrmex zeteki* e *Sericomyrmex amabilis*) e duas espécies derivadas (*Atta cephalotes* e *Acromyrmex volcanus*).

Tabela 7: Espécies de formigas e respectivos códigos de acesso no GeneBank utilizadas como grupos externos, baseado no trabalho de Wetterer, Schultz e Meier, 1998.

Nome da Espécie	Código de acesso (GeneBank)
<i>Acromyrmex volcanus</i>	AF016015.1
<i>Apterostigma collare</i>	AF016013.1
<i>Atta cephalotes</i>	AF016016.1
<i>Mycocepurus goeldii</i>	AF016017.1
<i>Sericomyrmex amabilis</i>	AF016022.1
<i>Trachymyrmex zeteki</i>	AF016025.1
<i>Wasmannia auropunctata</i>	AF016026.1

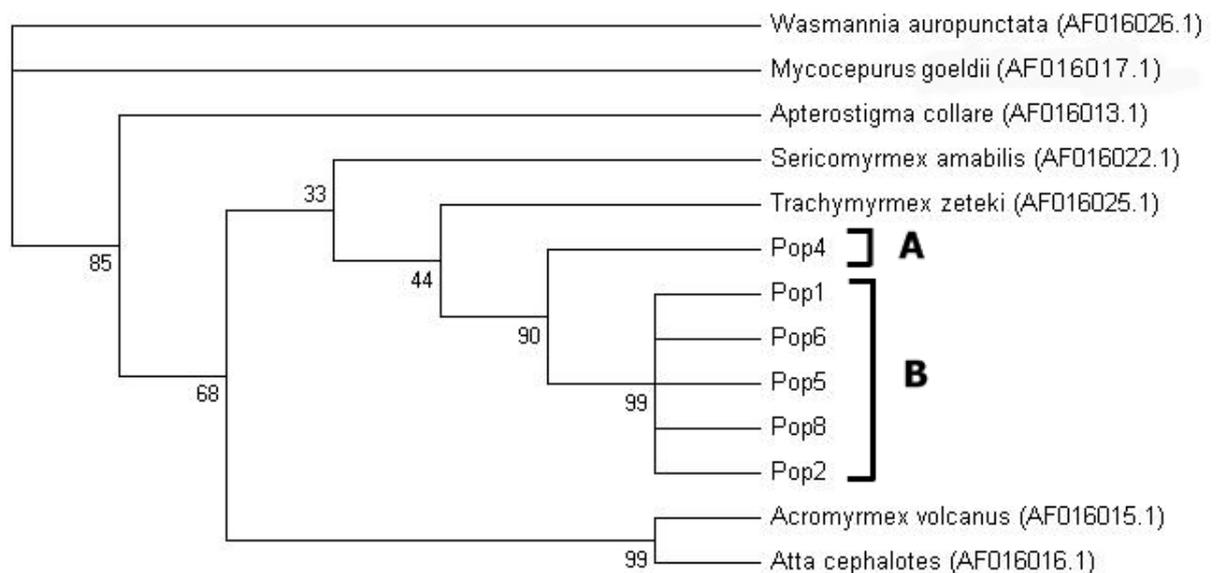


Figura 14: Árvore gerada pelo método de máxima parcimônia com valores de bootstrap usado para comparação entre as sequências obtidas no trabalho e grupos externos.

A árvore resultante da análise de máxima parcimônia (Figura 14) sugere que as populações de *T. tucumanus* estudadas formam dois grupos: um constituído por uma politomia formada por cinco populações (indicado com a letra B na árvore filogenética) e um segundo grupo composto de uma única população (letra A). Os resultados confirmam a separação da população 4 (bootstrap com valor máximo) das demais populações de *T. tucumanus*, corroborando com os dados obtidos na análise de neighbor-joining (Figura 13). Somando-se essas informações àquelas obtidas nas análises de arquitetura de ninho, pelas quais observa-se um padrão distinto da População 4 em relação às demais, a hipótese de que essa população seja uma linhagem diferenciada dentro da espécie é reforçada. Entretanto, são necessários estudos que englobem caracteres morfológicos e outras análises filogenéticas para substanciar essa colocação.

A separação entre as populações 1, 2, e 5 com 2 e 8, provenientes das análises de neighbor-joining, foram desconsideradas nos resultados de máxima parcimônia. O bootstrap, que indicava a consistência dessa divisão, era baixo (<50) e, aliado aos dados obtidos com a árvore de máxima parcimônia, pode-se inferir que tal divisão não existe nas populações estudadas. Porém, o bootstrap de proximidade entre as populações 2 e 8 é alto e, embora as análises de máxima parcimônia não tenham separado as populações em clados distintos, pode-se concluir que há uma semelhança mais acentuada entre elas em relação às demais populações, mas não com diferenças suficientes para colocá-las em um clado separado.

As demais inferências obtidas pelas análises de máxima parcimônia estão de acordo ao proposto na literatura para a filogenia da tribo Attini (BRADY et al., 2006; SCHULTZ; BRADY, 2008; SCHULTZ; MEIER, 1995; WETTERER; SCHULTZ; MEIER, 1998). As populações de *T. tucumanus* relatadas neste trabalho se relacionam mais intimamente com *T. zeteki* e o grupo formado pelas *Trachymyrmex* encontra relações próximas com *Sericomyrmex*. Todas populações de *T. tucumanus*, bem como *T. zeteki*, apresentam posição filogenética intermediária no cladograma, entre as Attini basais (*M. goeldii* e *A. collare*) e as derivadas (*Acromyrmex volcanus* e *Atta cephalotes*), que vem ao encontro dos dados já publicados a respeito dessas relações filogenéticas (BACCI Jr. et al., 2009; BRANDÃO; MAYHÉ-NUNES, 2007; RABELNG, 2007).

5. CONCLUSÃO

Este estudo atendeu aos objetivos de descrever a arquitetura dos ninhos de *Trachymyrmex tucumanus* e de extração do fragmento do gene mitocondrial que engloba os genes da citocromo oxidase I, um espaçador intergênico (IGS), RNA transportador de leucina e citocromo oxidase II, trazendo contribuições para um melhor entendimento da espécie.

Os ninhos de *T. tucumanus* apresentam entrada única, geralmente coberta por uma torre de terra e material vegetal seco. Internamente são formados, em sua maioria, por três câmaras, dispostas verticalmente, por vezes com um leve desvio para esquerda ou para direita, e separadas por túneis. As duas primeiras câmaras encontram-se relativamente perto da entrada do ninho, sendo que a segunda câmara está a uma altura média de 18,43cm. A terceira câmara se dispõe separada da segunda por um longo túnel e com dimensões inferiores em relação às demais, o que pode lhe conferir uma função diferenciada. A profundidade máxima dos ninhos variou entre 33 e 73cm.

As análises do fragmento do DNA mitocondrial confirmaram os dados filogenéticos disponíveis na literatura e, aliadas às de arquitetura de ninhos, levantaram a hipótese de uma possível separação em duas linhagens distintas, dentro da espécie.

Mais estudos direcionados à filogenia, morfologia, ecologia e comportamento, englobando outras espécies do gênero *Trachymyrmex* se fazem necessários para que se possam estabelecer padrões e relações de parentesco dentro do gênero de forma mais criteriosa. Também seria interessante uma pesquisa que focasse na análise de variabilidade genética entre diferentes populações de *Trachymyrmex tucumanus* para elucidar questões sobre divergências genéticas de populações geograficamente distintas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, A.P.P. *Biologia e Taxonomia comparada das subespécies de Acromymex subterraneus FOREL, 1893 (Hymenoptera, Formicidae) e contaminação das operárias por iscas tóxicas*. 2002. 168f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas/Zoologia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.
- ARAÚJO, M. S.; DELLA-LUCIA, T.M.C.; MAYHÉ-NUNES, A. J. Caracterização dos ninhos e atividade forrageadora de Trachymyrmex fuscus Emery (Hymenoptera, Formicidae) em plantio de eucalipto. *Revista Brasileira de Zoologia*, São Paulo, v. 19, n. 2, p. 419-427, 2002.
- AVISE, J.C. *Phylogeography: the history and formation of species*. 2.ed. Harvard University Press, Cambridge e London, 2000. 447p.
- AVISE, J.C. et al. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, California, v. 18, p. 489–522, 1987.
- BACCI Jr., M. et al. Phylogeny of leafcutter ants in the genus *Atta* Fabricius (Formicidae: Attini) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Amsterdam, v. 51, p. 427–437, 2009.
- BACCI Jr., M. et al. A molecular marker for evolution studies of closely related specimens of higher Attini ants. In: *Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 30º*, 2001, Caxambu, *Livro de resumos...*Caxambu, 2001.
- BOLTON, B. *A new general catalogue of ants of the world*. Harvard University Press, Cambridge e London, 1995, 504p.
- BRADY, S. G. et al. Evaluating alternative hypotheses for the early evolution and diversification of ants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Washington, v. 103, p. 18172–18177, 2006.
- BRANDÃO, C. R. F.; MAYHÉ-NUNES, A. J. A phylogenetic hypothesis for the Trachymyrmex species groups, and the transition from fungus-growing to leaf-cutting in the Attini. In: SNELLING, R. R.; FISHER B. L.; WARD P. S. (Eds) *Advances In Ant Systematics (Hymenoptera: Formicidae): Homage To E. O. Wilson – 50 Years Of*

Contributions. Memoirs of the American Entomological Institute, Florida, v. 80, p. 72-88, 2007.

BRANDÃO, C. R. F.; MAYHÉ-NUNES, A. J. A new fungus-growing ant genus, Mycetagroicus, with the description of three new species and comments on the morphology of the Attini (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, California, v. 38, p. 667-698, 2001.

BROW JR., W. Diversity of ants. In: AGOSTI, D.; MAJER, J. D.; ALONSO, A. E.; SCHULTZ, T. R. (Eds). *Ants: standard methods for measuring and monitoring biodiversity*. Washington, Smithsonian Institution Press, p. 45-79, 2000.

BUENO, F.C. et al. Toxicity of Cedrela fissilis to Atta sexdens rubropilosa (Hymenoptera: Formicidae) and its symbiotic fungus. *Sociobiology*, Califórnia, v. 45, n. 2, p. 389-399, 2005.

BUENO, O.C. et al. Utilização de alimentos pelas formigas cortadeiras. In: VILELA E.F.; SANTOS, I.A.; SCHOEREDER, J.H.; SERRÃO, J.E.; CAMPOS, L.A.O.; LINO-NETO, J. (Eds.) *Insetos Sociais da biologia à aplicação*, Viçosa: Editora UFV, 2008, p. 96-114.

BUENO, O.C. et al. Activity of sesame leaf extracts to the leaf-cutting ant Atta sexdens rubropilosa (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, Califórnia, v. 44, n. 3, p. 511-518, 2004

CAMARGO, R.S. et al. Post-selection and return of foraged material by Acromyrmex subterraneus brunneus (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, Califórnia, v. 42, n. 1, p. 93-102, 2003.

CARLOS, A. A. *Influência da polpa cítrica, do óleo e de fungos filamentosos na atividade de iscas tóxicas à Atta sexdens rubropilosa (Hymenoptera, Formicidae)*. 2008. 82f. Tese (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP, Botucatu, 2008.

CHAPELA. I. H. et al. Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi. *Science*, Washington, v. 266, n. 9, p. 1691 – 1694, 1994.

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

CURRIE, C. R. et al. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *Nature*, v. 398, p. 701–704, 1999.

DELABIE, J.H.C.; DELLA-LUCIA, T.M.C.; PATRE, L. Protocolo de experimentação para avaliar a atratividade de novas formulações de iscas granuladas utilizadas no controle das formigas cortadeiras Acromyrmex spp. e Atta spp (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae: Attini) no campo. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, Londrina, v. 29, n. 4, p.1-6, 2000.

DE-SOUZA, M.T. Análise de DNA por eletroforese em gel de agarose. In: AZEVEDO, M.O.; FELIPE, M.S.S; BRIGIDO, M.M.; MARANHÃO, A.Q.; DE-SOUZA, M.T. (Org)s. *Técnicas Básicas em Biologia Molecular*. Brasília: Editora UnB, 2003. p. 111-128.

DELLA-LÚCIA, T. M. C.; MOREIRA, D. D. O. Caracterização dos ninhos. In: DELLA-LÚCIA, T. M. C. (ed.). *As formigas cortadeiras*. Viçosa: Folha de Viçosa, 1993, p. 32-42.

DINIZ, E. A. *Evolução dos comportamentos de preparação do substrato para o cultivo do fungo simbiote e cuidados com a cria, rainha e alados em formigas da tribo Attini (HYMENOPTERA, FORMICIDAE)*. 2008. 93f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Rio Claro, 2008.

FERNANDEZ-MARIN, H. et al. Ecological traits and evolutionary sequence of nest establishment in fungus-growing ants (Hymenoptera, Formicidae, Attini). *Biological Journal of the Linnean Society*, v. 81, p. 39–48, 2004.

FLEISCHMANN et al. Whole-genome random sequencing and assembly of Haemophilus influenzae. *Science*, Washington, v. 269, p. 496-512, 1995.

GARLING, L. Origin of ant-fungus mutualism: a new hypothesis. *Biotropica*, Zurich, v. 11, n. 4, p. 284 – 291, 1979.

GONÇALVES, C. R. O gênero Acromyrmex no Brasil (Hymenoptera: Formicidae). *Studia Entomologica*, Rio de Janeiro, v. 4, p. 113-180, 1961.

HIGGINSS, P.G. et al. The evolution of tRNA^{Leu} genes in animal mitochondrial genomes. *Journal of Molecular Evolution*, New York, v. 57, n. 4, p. 435-445, 2003.

HIGGINSS, P.G.; BLEASBY, A. J.; FUCHS, R. Clustal W: Improved software for multiple sequence alignment. *Computer Applications in the Bioscience*, v. 8, p. 189-191, 1992.

HASIOTIS, S. T. Complex ichnofossils of solitary and social soilorganisms: understanding their evolution and roles in terrestrial paleoecosystems. *Palaeogeogr. Palaeoclimat. Palaeoecol.*, v. 192, p. 259 – 320, 2003.

HEBLING, M.J.A. et al. Effects of leaves of Ipomoea batatas (Convolvulaceae) on nest development and on respiratory metabolism of leaf-cutting ants Atta sexdens L. (Hym., Formicidae). *Journal Applied Entomology*, Berlim, v. 124, p. 249-252, 2000.

HÖLLDOBLER B.; WILSON E. O. *The Ants*. Harvard University Press, Cambridge e London, 1990, 732 pp.

KEMPF, W. W. Catálogo abreviado das formigas da região neotropical (Hymenoptera: Formicidae). *Studia Entomológica*, Rio de Janeiro, v. 15, n.1-4, p. 3-334, 1972.

KLINGENBERG, C.; BRANDÃO, C.R.F. Revision of the fungus growing ant genera Mycetophylax Emery and Paramycetophylax Kusnezov rev. stat., and description of Kalathomyrmex n. gen. (Formicidae: Myrmicinae: Attini). *Zootaxa*, Auckland, v. 2052, p. 1 – 31, 2009.

KRONAUER, D.J.C.; HÖLLDOBLER, B.; GADAU, J. Phylogenetics of the new world honey ants (genus Myrmecocystus) estimated from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, Florida, v. 32, p. 416–421, 2004.

LIMA, P. R. M. *Metabolismo e secreção de despolimerases em fungos simbiotes de formigas atíneas e inibição de pectinases*. 2006. 89f. Tese (Phd) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Rio Claro, 2006.

LIZIDATTI, C.S. *Biologia, arquitetura de ninhos e coleta de substratos no Cerrado por formigas cultivadoras de fungo, Trachymyrmex holmgreni Wheeler, 1925 (Hymenoptera, Formicidae, Attini)*. 2006. 60f. Tese (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, 2006.

MARANHÃO, A.Q., MORAES, L.M.P. Extração e purificação de DNA. In: AZEVEDO, M.O.; FELIPE, M.S.S; BRIGIDO, M.M.; MARANHÃO, A.Q.; DE-SOUZA, M.T. (Org)s. *Técnicas Básicas em Biologia Molecular*. Brasília: Editora UnB, 2003. p. 49-72.

MARICONI, F. A. M. *As Saúvas*. São Paulo, Editora: Agronômica Ceres, 1970, 167 p.

MARTIN, M.M.; GIESELMANN, M.J.; MARTIN, J.S. Rectal enzymes of attine ants. a-amylase and chitinase. *J. Insect Physiol.*, Great Britain, v. 19, p. 1409-1416, 1973.

MARTIN J. S.; MARTIN M. M. The presence of protease activity in the rectal fluid of attine ants. *J. Insect Physiol.*, Great Britain, v. 16, p. 227-232, 1970.

MARTINS Jr., J. et al. Nuclear mitochondrial-like sequences in ants: evidence from Atta cephalotes (Formicidae: Attini). *Insect Molecular Biology*, Oxford, v. 16, n. 6, p. 777-784, 2007.

MAYHÉ-NUNES, A.J.; BRANDÃO, C.R.F. Revisionary studies on the attine ant genus Trachymyrmex Forel. Part 3: The Jamaicensis group (Hymenoptera: Formicidae). *Zootaxa*, Auckland, v. 1444, p. 1-21, 2007.

MAYHÉ-NUNES, A.J.; BRANDÃO, C.R.F. Revisionary notes on the fungus-growing ant genus Mycetarotes Emery (Hymenoptera, Formicidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, São Paulo, v. 50, n.4, p. 463-472, 2006.

MAYHÉ-NUNES, A.J.; BRANDÃO, C.R.F. Revisionary studies on the attine ant genus Trachymyrmex Forel. Part 2: The Iheringi group (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, California, v. 45, n. 2, p. 271-305, 2005.

MAYHÉ-NUNES, A.J.; BRANDÃO, C.R.F. Revisionary studies on the attine ant genus Trachymyrmex Forel. Part 1: Definition of the genus and the Opulentus group (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, California, v. 40, p. 667-698, 2002.

MOREIRA, A. A.; FORTI, L. C. Comparação entre o volume externo e interno de ninhos de Atta laevigata (Hymenoptera: Formicidae). *Revista Árvore*, Viçosa, v. 23, p. 355-358, 1999.

MORITZ, C.; DOWLING, T.E.; BROWN, W.M. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, California, v. 18, p. 269–292, 1987

MUELLER, U. G. Ants versus fungus versus mutualism: ant-cultivar conflict and the deconstruction of the attine ant-fungus symbiosis. *The American Naturalist*, Chicago, v. 160, p. 67-98, 2002.

MUELLER, U. G. The origin of the attine ant-fungus mutualism. *The Quarterly Review of Biology*, Chicago, v. 76, n. 2, p. 169 – 197, 2001.

MUNKACSI, A. B. et al. Convergent coevolution in the domestication of coral mushrooms by fungus-growing ants. *Proceedings of the Royal Society of London*, v. 271, p. 1777-1782, 2004.

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

- NAGAMOTO, N.S.; FORTI, L.C.; RAETANO, C.G. Evaluation of the adequacy of diflubenzuron and dechlorane in toxic baits for leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) based on formicidal activity. *Journal of Pest Science*, Berlim, v. 80, n. 1, p. 9-13, 2007.
- PEETERS, C.; HÖLLDOBLER, B. Reproductive cooperation between queens and their mated workers: the complex live history of an ant with a valuable nest. *Proceedings of the National Academy of Science*, USA, v. 92, p. 10977-10979, 1995.
- PENAFLORES, M.F.G.V. et al. Toxicity of straightchain fatty acids to leaf-cutting ants *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus*. *Sociobiology*, California, v.47, n.3, p. 843-858, 2006.
- ORTIZ, G. Evolução do Sistema Reprodutivo de Formigas da Tribo Attini (Hymenoptera: Myrmicinae): Análise das Espermatecas. 2007. 128f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Rio Claro, 2007.
- QUINLAN, R.J; CHERRETT, J.M. The role of the fungus in the diet of the leafcutting ant *Atta cephalotes*. *Ecol. Entomol*, London, v. 4, p. 151-160, 1979.
- RABELING, C. A review of the North American species of the fungus-gardening ant genus *Trachymyrmex* (Hymenoptera: Formicidae). *Zootaxa*, Auckland, v. 1664, p. 1-53, 2007.
- RIDLEY, M. *Evolução*. 3a. ed. Artmed: Porto Alegre, 2006. 752p.
- SAIKI, R.K. et al. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science*, v. 239, p. 487-491, 1988.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, Chicago, v.4, n.4, p. 406-25, 1987.
- SCHNEIDER, H. *Métodos de análise filogenética: um guia prático*. Ribeirão Preto: Holos Editora e Sociedade Brasileira de Genética, 2003.
- SCHNEIDER, M. O. *Comportamento de cuidado da prole da saúva limão *Atta sexdens rubropilosa* FOREL, 1908 (HYMENOPTERA, FORMICIDAE)*. 2003. 80f. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista – Instituto de Biociências, Rio Claro, 2003.

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

SCHULTZ, T.R. Ants, plants and antibiotics. *Nature*, v. 398, p. 747-748, 1999.

SCHULTZ T.R.; MEIER, R.A. A phylogenetic analysis of the fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini) based on morphological characters on the larvae. *Systematic Entomology*, Oxford, v. 20, p. 337–70, 1995.

SEAL, J.N.; TSCHINKEL, W.R. Complexity in an obligate mutualism: do fungus-gardening ants know what makes their garden grow? *Behavioral Ecology and Sociobiology*, New York, v. 61, p. 1151-1160, 2007.

SILVA, A. et al. Survival of Atta sexdens rubropilosa workes on differents foods sources. *Journal of Insect Physiology*, Oxford, v. 9, p. 307-313, 2003.

SILVA, A. *Participação do fungo Leucoagaricus gongylophorus na produção de enzimas intestinais da formiga Atta sexdens*. 2000. 104p. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista – Instituto de Biociências, Rio Claro, 2000.

SILVA-PINHATI, A. C. O. *Evolução e metabolismo de alguns atíneos (Hymenoptera: Formicidae) e seus fungos (Basidiomycota: Agaricales)*. 2004. 104f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Rio Claro, 2004.

SIMON, C. et al. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial genes sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of Entomological Society of America*, v. 87, p. 651-701, 1994.

SUDD J. H.; FRANKS N. R. *The Behavioural Ecology of Ants*. Chapman and Hall: New York, 1987. 206 pp

SUDD, J.H. Ants: foraging, nesting, brood behavior, and polyethism. In: HERMANN, H.R. (ed). *Social insects*, vol 4. Academic Press: New York, 1982. p 107–155.

SWOFFORD, D.L. *Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods), version 4.0*. Sunderland: Sinauer Associates, 1996.

TAMURA, K. et al. MEGA 4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, Chicago, v. 4, n. 8, p. 1596-1599, 2007. .

- TSCHINKEL, W. R. Subterranean ant nests: trace fossils past and future? *Palaeogeogr. Palaeoclimat. Palaeoecol.*, v. 192, p. 321 – 333, 2003.
- VERZA, S.S. et al. Influence of physical and chemical factors during foraging and culture of the symbiont fungus in *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Insect Science.*, New York, v. 14, p. 295-300, 2007.
- VILLESSEN, P. et al. Evolution of ant-cultivar specialization and cultivar switching in *Apterostigma* fungus-growing ants. *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, Lancaster, v. 58, n. 10, p. 2252-2265, 2004.
- VO, T.; MUELLER, U.G.; MIKHEYEV, A.S. Free-living fungal symbionts (Lepiotaceae) of fungus-growing ants (Attini: Formicidae). *Mycologia*, New York, v. 101, n. 2, p. 206-210, 2009.
- WEBER, N. A. Fungus culturing by ants. In: BATRA, L.R. (Ed.) *Insect – fungus symbiosis: mutualism and comensalis*. Montclair: Akkanhed and Osmum, 1979, p. 77-116.
- WEBER, N. A. Fungus-growing ants. *Science*, Washington, v. 153, p. 587 – 604, 1966.
- WEBER, N. A. The biology of the fungus-growing ants. Part IX. The British Guiana Species. *Revista de Entomologia*, Rio de Janeiro, v. 17, n. 1-2, p. 145-151, 1946.
- WEBER, N. A. The biology of the fungus-growing ants. Part VIII. The Trinidad, B. W. I., Species. *Revista de Entomologia*, Rio de Janeiro, v. 16, n. 1-2, p. 1-88, 1945.
- WEBER, N. A. The biology of the fungus-growing ants. Part VII. The Barro Colorado Island, Canal Zone, species. *Revista de Entomologia*, Rio de Janeiro, v. 12 n. 1-2, p. 118-125, 1941.
- WEBER, N. A. The biology of the fungus-growing ants. Part I. New forms. *Revista de Entomologia*, Rio de Janeiro, v. 7 n. 4, p. 378-407, 1937.
- WETTERER J.K; SCHULTZ T.R; MEIER R.; Phylogeny of fungus-growing ants (tribe Attini) based on mtDNA sequence and morphology. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, Amsterdam, v. 9, n. 1, p. 42–47, 1998.
- WILSON, E.O. *The insect societies*. Cambridge: Harvard University Press, 1971. 548 p.

ZANETTI, R. et al. Level of economic damage for leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) in Eucalyptus Plantations in Brazil. *Sociobiology*, Califórnia, v.42, n.2, p.433– 442, 2003.

Juliana Werchajzer
Aluna

Odaír Correa Bueno
Orientador

Eduardo Arrivabene Diniz
Co-orientador