



COMPARAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DA ESPÉCIE *Atta sexdens* (HYMENOPTERA:FORMICIDAE)

Carla Faine Matos Oliveira¹, Samuel Oliveira Rocha², Cibelle Santos Dias³, Elisa Susilene Lisboa dos Santos⁴, Carlos Bernard Moreno Cerqueira-Silva^{4*}

¹Mestre em Ciências Ambientais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, Bahia, Brasil

²Mestrando em Zootecnia, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, Bahia, Brasil

³Licenciada em Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, Bahia, Brasil

⁴Professor(a) Doutor(a), Departamento de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, Bahia, Brasil (*csilva@uesb.edu.br)

Recebido em: 08/04/2017 – Aprovado em: 10/06/2017 – Publicado em: 20/06/2017
DOI: 10.18677/EnciBio_2017A30

RESUMO

As formigas cortadeiras (*Atta* e *Acromymex*) se destacam tanto como praga agrícola, como pelo potencial modificador de ambientes naturais e antropizados. Considerando a importância ecológica e econômica das formigas cortadeiras, estudos genético-moleculares têm sido realizados com vistas ao entendimento da diversidade e estrutura genética das suas populações. Visando contribuir para o avanço de estudos genéticos para *Atta sexdens*, espécie de mais ampla distribuição do gênero e considerada como principal praga agrícola, objetivou-se comparar a eficiência de seis protocolos de extração de DNA, bem como, testar o uso de diferentes partes do corpo da formiga para a obtenção de DNA genômico para essa espécie. Os resultados revelam que três protocolos (P1, P4 e P5) foram mais eficientes para a extração de DNA genômico. Além disso, verificou-se a influência da utilização de diferentes partes do corpo da formiga na obtenção de DNA genômico, sendo os tratamentos 'Mesossoma, Pernas e Gáster' e 'Corpo Inteiro', aqueles que possibilitaram a obtenção de maior quantidade e qualidade de DNA. Este estudo comprova a eficiência de três protocolos de extração dentre os seis que foram testados para *A. sexdens*, podendo-se utilizar o Corpo Inteiro da formiga, retirando apenas o Gáster para a maceração, caso o destino do material extraído seja para estudos com marcadores moleculares dominantes.

PALAVRAS-CHAVE: Formiga cortadeira, genética molecular, inseto social.

COMPARISON OF PROTOCOLS FOR THE EXTRACTION OF GENOMIC DNA OF THE SPECIES *Atta sexdens* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

ABSTRACT

Leaf-cutting ants (*Atta* and *Acromymex*) stand out as both agricultural plague and their potential modifier of natural and anthropized environments. Considering the ecological and economic importance of leaf-cutting ants, genetic-molecular studies

have been carried out with a view to understanding the diversity and genetic structure of their populations. Aiming to contribute to the advancement of genetic studies for *Atta sexdens*, a species with the broadest distribution of the genus and considered as the main agricultural pest, the objective was to compare the efficiency of six DNA extraction protocols, as well as to test the use of different parts of the ant body to obtain genomic DNA for this species. The results show that three protocols (P1, P4 and P5) were more efficient for extracting genomic DNA. In addition, the influence of the use of different parts of the ant body on obtaining genomic DNA was verified, being the treatments 'Mesosoma, Legs and Gaster' and 'Full Body', those that enabled the obtaining of greater quantity and quality of DNA. This study proves the efficiency of three extraction protocols among the six that were tested for *A. sexdens*, using the whole body of the ant, only removing the gaster for maceration, if the destination of the extracted material is for studies with dominant molecular markers.

KEYWORDS: leaf-cutting ant, molecular genetics, social insect.

INTRODUÇÃO

As formigas constituem um grupo de sucesso dentre os animais invertebrados, sendo parte desse grupo conhecido como formigas cortadeiras (Myrmicinae: Attini) (WARD et al., 2014), cuja distribuição abrange a região Neotropical (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990). As formigas cortadeiras compreendem os gêneros *Atta* e *Acromyrmex* que ao longo de milhões de anos desenvolveram o hábito de cultivar fungos (WARD et al., 2014). Para tanto, estas formigas, em geral desempenham a sua atividade forrageadora em busca de folhas, flores e frutos, os quais são cortados e levados para a colônia para serem utilizados como substrato pelo fungo simbiote.

Atta sexdens é uma espécie de formiga cortadeira popularmente conhecida como saúva e promove intensa atividade desfolhadora dos vegetais estabelecidos próximos aos seus ninhos, o que leva essas formigas a serem consideradas como “pragas” às culturas agrícolas (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990). Por outro lado, durante a fundação e manutenção do ninho no ambiente estas formigas contribuem para mudanças físico-químicas e biológicas favoráveis ao desenvolvimento vegetal (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990), fato que as transformam em engenheiras dos ecossistemas (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990; LEAL et al., 2014).

Diante da importância ecológica e econômica, as formigas cortadeiras têm sido alvo de estudos associados à biologia, comportamento e genética populacional. No que diz respeito a estudos genéticos moleculares, a utilização de diferentes protocolos de extração de DNA genômico tem se mostrado necessária para a realização das mais diversas técnicas moleculares.

Segundo ASGHAR et al. (2015) a extração do DNA dos insetos pode ser realizada usando desde técnicas moleculares mais simples até as mais avançadas. A seleção da técnica de extração de DNA, independente dos organismos a serem avaliados, depende da amostra estudada, do tempo necessário para a extração, suporte econômico da técnica (devido aos reagentes e equipamentos utilizados na extração) e mais importante, a qualidade do DNA extraído. Neste sentido, comumente são realizados estudos de comparação e otimização de protocolos para extração de DNA (SCALDAFERRI et al., 2013; DALBOSCO et al., 2015; VIANA et al., 2015; ZORTÉA et al., 2016).

Na literatura há registro de diferentes métodos de extração de DNA que têm sido utilizados para formigas cortadeiras (DOYLE & DOYLE, 1990; WALDSCHMIDT et al., 1997). No entanto, há apenas um registro de estudo avaliando protocolos de extração com *A. sexdens* (CARVALHO & VIEIRA 2001) para determinar a eficiência na obtenção de DNA genômico desta espécie. Neste estudo os autores detectaram diferença na qualidade e quantidade do DNA obtido para a subespécie *A. sexdens rubropilosa*. Entretanto, o estudo citado não determinou se existe alguma influência das partes do corpo da formiga utilizadas para obtenção de DNA genômico.

Em relação à fonte de tecido utilizada para extração de DNA genômico de formigas cortadeiras os registros na literatura apontam para o uso de diferentes tecidos, a exemplo da: Cabeça (CARVALHO & VIEIRA, 2001; CANTAGALLI et al., 2013), Cabeça e Mesossoma (REIS et al., 2014) e Corpo Inteiro (GRUTZMACHER et al., 2002; KAKAZU et al., 2013), inexistindo contudo comparação que possibilite justificar a escolha de um tecido em detrimento do outro.

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo comparar a eficiência de seis protocolos de extração de DNA genômico em *Atta sexdens*, bem como testar qual a parte do corpo desta espécie seria mais eficiente para potencializar a obtenção de DNA genômico.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletados espécimes de *Atta sexdens* em colônias localizadas em um fragmento de Floresta Estacional Semidecidual (15°15'S e 040°17'O), popularmente conhecida como “mata de cipó”, localizada nas proximidades da UESB, *campus* de Itapetinga, Bahia. Os espécimes coletados foram armazenados em Ultra-Freezer no Laboratório de Genética Molecular Aplicada - LGMA (UESB, Itapetinga). Para os testes foram utilizados seis protocolos de extração de DNA genômico disponíveis na literatura e já adotados por vários grupos de pesquisas para diferentes espécies vegetais, a saber: SUNNUCKS & HALES (1996), método DOYLE & DOYLE (1990), método modificado por ŠTORCHOVÁ et al. (2000), método modificado por RUSSEL et al. (2010), MOGG & BOND (2003) e BARNWELL et al. (1998). Neste estudo os protocolos acima citados foram identificados respectivamente, como P1, P2, P3, P4, P5 e P6.

Para todos os protocolos foram consideradas a utilização das seguintes partes do corpo como fontes de tecido: ‘Cabeça’ (CB), ‘Mesossoma, Perna e Gáster’ (MPG), e ‘Corpo Inteiro’ (CI). As extrações foram realizadas em duplicatas, sendo utilizada em cada uma das extrações cinco operárias médias de tamanho médio 1,5mm (independente de protocolo e fonte de tecido utilizado). Após serem maceradas em solução tampão (com volume padronizado de 750 µl) o material foi transferido para tubos *eppendorfs* de 2 mL e, por fim, quando já obtido o DNA genômico da espécie, as amostras foram armazenadas em tubos de 1,5 ml a 4º C.

A qualidade das extrações foi avaliada em gel de agarose a 1% (m/v) por eletroforese (90 min sob uma corrente elétrica de 90 V) e visualizados com o tampão *Gel Red* (adotando-se as especificações do fabricante) num sistema de documentação fotográfica Kodak, com a incidência de luz UV. Para quantificação da concentração de DNA (ng/ml-1) adotou-se um marcador de peso padrão (DNA Lambda não digerido) nas concentrações de 50, 100 e 200ng de DNA por microlitro. A quantificação espectrofotométrica também foi realizada utilizando o *Biodrop (Whitehead Scientific)* considerando as razões $A_{260/280}$, (onde A_{260} equivale aos valores quantificados de ácidos nucleicos e, A_{280} equivale aos valores proteína nas

amostras analisadas) para estimativa da concentração e da qualidade do DNA obtido.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observada diferença na eficiência dos seis protocolos quanto à quantidade e qualidade do DNA extraído para *Atta sexdens*, bem como se observou influência do tecido utilizado na extração. Os resultados da eletroforese revelam que os melhores protocolos para a extração de DNA genômico, tendo-se como base a quantidade de DNA estimada e o sucesso da extração a partir dos diferentes tecidos, foram P1, P4 e P5 nos quais todos os tecidos (CB, MPG e CI) apresentaram DNA com padrão de banda desejado no gel de agarose (*i.e.*, banda visível e com pouco arraste indicando maior integridade do DNA obtido). Em relação aos protocolos que não se mostraram eficientes para todas as amostras, mas apresentaram extrações de DNA para algumas das partes do corpo, destacaram-se P2 para os tecidos MPG e CI, P3 para os tecidos MPG e CI e também P6 para o tecido CI (Figura 1).

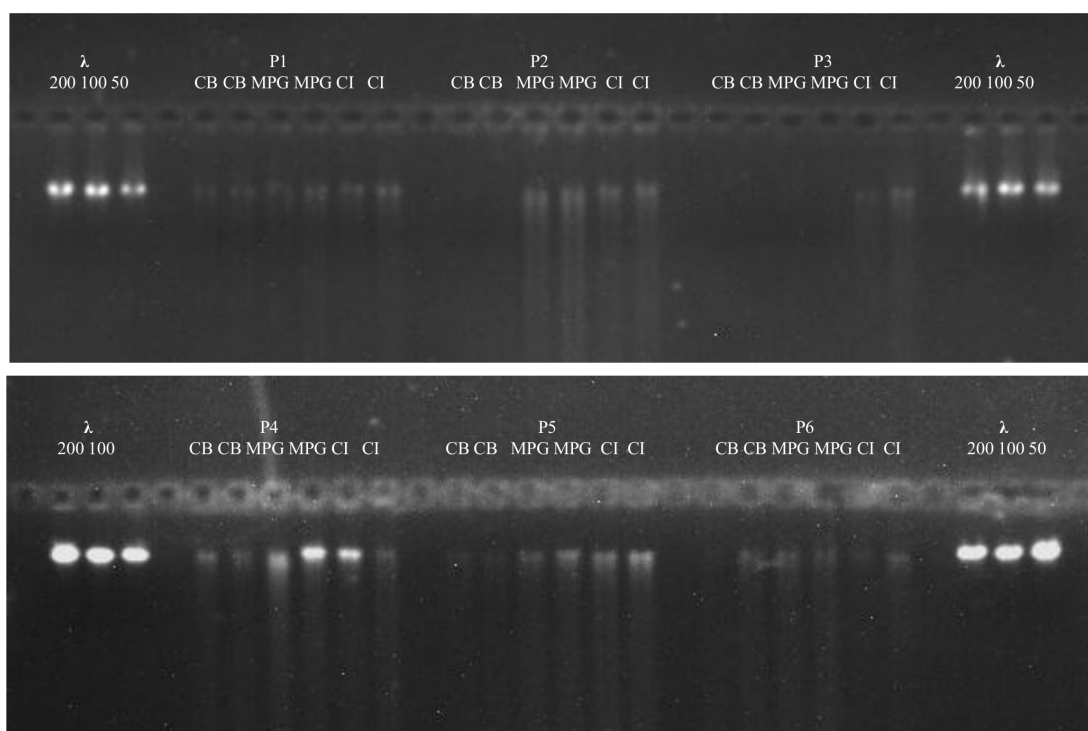


FIGURA 1. DNA genômico da formiga cortadeira *Atta sexdens* obtido a partir de seis protocolos de extração P1 a P6 que correspondem respectivamente aos protocolos: SUNNUCKS & HALES (1996), método DOYLE & DOYLE (1990), método modificado por STORCHOVA et al. (2000), método modificado por RUSSEL et al. (2010), MOGG & BOND (2003) e BARNWELL et al. (1998). Para a espécie *A. sexdens*, utilizou-se diferentes partes do corpo como fonte de tecido para extração ('CB – 'Cabeça'; MPG – 'Mesossoma, Pernas e Gáster'; CI – 'Corpo Inteiro'). O marcador de peso padrão (DNA Lambda não digerido) foi adotado nas concentrações de 200, 100 e 50 ng de DNA Lambda (Invitrogen).

Os protocolos de extração de DNA aplicados no presente estudo vem sendo utilizados em extrações de DNA genômico de plantas com diferentes finalidades (CERQUEIRA-SILVA et al., 2014; DALBOSCO et al., 2015; SANTOS et al. 2015; ZORTÉA et al., 2016; ROCHA et al., 2016) e com exceção do Protocolo 2, não haviam sido testados para espécies de animais, tampouco havia registro de comparação entre estes em relação aos diferentes tecidos utilizados para a obtenção de DNA genômico de formigas cortadeiras.

Ao utilizar os seis protocolos de extração deste estudo, porém com a espécie de planta *Croton linearifolius* (Euphorbiaceae), SCALDAFERRI et al. (2013) registraram o P1 como o menos eficiente e os demais protocolos como satisfatórios para a extração de DNA de *C. linearifolius*. Tal contraste é explicado, ao menos em parte, pelas variações entre o material biológico utilizado nesses dois estudos, sendo natural a existência de compostos secundários distintos entre tecidos de vegetais e de insetos.

Os seis protocolos testados, no presente estudo, apresentaram técnicas de extração mais econômicas, variando a composição das soluções tampão: Dodecil Sulfato de Sódio 'SDS 10%' (P1), Brometo de Cetil Trimetil de Amônia 'CTAB' 5% (P2), 'Manitol' (P3), Sorbitol (P4), 'SDS 0,7% e Cloreto de sódio 'NaCl' (P5), e por fim 'CTAB' 2% (P6).

Os melhores protocolos de extração foram P1, P4 e P5 (SDS 10%, Sorbitol, e 'SDS e NaCl', respectivamente), seguido dos demais protocolos P2, P3 e P6 ('CTAB', 'Manitol', e 'CTAB e NaCl', respectivamente) que foram menos indicados para extração de DNA de *Atta sexdens*. A diferença na qualidade de extração observada em relação aos protocolos utilizados pode ser explicada em parte pelos tipos de reagentes e soluções que as compõem, sendo que a solução tampão tem importância fundamental no rompimento da membrana celular dos tecidos animais utilizados. O 'SDS' e o 'CTAB' são compostos orgânicos com propriedades surfactantes (aniônicas) usado para ajudar a lise celular. Além disso, o 'SDS' pode agir também desnaturando proteínas.

Esses dados corroboram em parte com os resultados obtidos por CARVALHO & VIEIRA (2001), pois um dos protocolos indicados por estes autores apresentou solução tampão composto por 'SDS'. Em relação ao protocolo com menor qualidade na extração de DNA, (DOYLE & DOYLE, 1990), este era composto pela solução tampão 'CTAB', utilizada nos protocolos P2 e P6 do presente trabalho. Segundo CARVALHO & VIEIRA (2001), a concentração de 'CTAB' utilizada no tampão (5%) pode ter sido inadequada para a extração de DNA de *Atta sexdens rubropilosa*. Corroborando com os resultados obtidos neste estudo, os protocolos que se mostraram menos adequados para a extração de DNA de *Atta sexdens* foram os protocolos que apresentaram em sua composição solução tampão contendo 'CTAB' (2% e 5%) e, além disso, o protocolo que continha em sua composição a substância 'Manitol'.

GRUTZMACHER et al. (2002) mesmo não encontrando diferença quanto à obtenção de DNA genômico entre os quatro protocolos que testaram para *Acromyrmex heyeri*, indicaram preferencialmente o uso de protocolos com baixo custo, rapidez, praticidade e menor agressividade ao meio ambiente (priorizando a ausência ou redução de produtos tão tóxicos, como é o caso do fenol, presente em muitos protocolos de extração de DNA). Portanto, se faz necessário na etapa de extração de DNA genômico a avaliação do custo-benefício que cada protocolo pode oferecer, a fim de minimizar os impactos negativos gerados com as diferentes

aplicações das técnicas de extrações de DNA genômico realizadas para várias espécies.

Para o grupo dos insetos, ASGHAR et al. (2015) apontam as técnicas Chelex, Chargswitching, DNAzol e prepGEM como mais rentáveis por fazer uso de pequeno número de reagentes, por haver menor necessidade de gestão de resíduos e propiciar a extração rápida com obtenção de DNA (entre 10 - 40 min). Apesar da relação custo-benefício das técnicas apontadas pelos autores, estudos com formigas cortadeiras fazem uso de técnicas de extração ainda mais simples e menos custosas, porém com maior gasto de tempo para extração de DNA genômico de *A. sexdens*.

Conforme os tratamentos utilizados neste estudo, é possível indicar, ao menos nas condições testadas, o uso do tecido MPG, seguida pelo uso do tecido CI, como sendo os mais adequados para extração de DNA em *Atta sexdens*. Embora as partes MPG e CI tenham sido os tecidos com maior qualidade de DNA, ressalta-se a necessidade de retirada do Gáster quando o objetivo do estudo envolver o sequenciamento e/ou estudo de polimorfismo baseado em marcadores arbitrários (não espécie-específicos). Esse cuidado é necessário para evitar que possíveis contaminações presentes no Gáster do indivíduo (restos de alimentos) possam levar a falhas na genotipagem. Como todas as formigas cortadeiras (*Atta* e *Acromyrmex*) possuem morfologia corporal muito similar entre si (BACCARO et al., 2015), certamente os resultados apresentados quando à melhor parte do corpo para fazer extração de DNA também podem ser aplicados às demais espécies de cortadeiras.

Considerando os resultados de quantificação espectrofotométrica, realizada com o *Biodrop*, observou-se resultados diferentes em relação aos protocolos com maior e menor concentração estimada de DNA, tendo o protocolo três apresentado valores da razão A_{260}/A_{280} igual a 2.13 (para CB), enquanto o protocolo seis apresentou valor igual a 9.56 (para CB) (Tabela 1).

A existência de impurezas de natureza proteica e de ácidos nucleicos foi observada nas extrações realizadas, visto que os protocolos apresentaram valores de A_{260}/A_{280} inferiores ou maiores que 1.8 (Tabela 1). As amostras que apresentaram contaminação por proteínas foram P1 (MPG), P4 (MPG e CI) e P6 (CI). Todas as amostras com valores maiores que 1.8 e próximos a 2.0 apresentaram presença de RNA (CB: P1, P2, P3, P4, P5; MPG P6; CI P2). As amostras mais puras pertenceram aos protocolos P1 (CI = 1.85), P2 (MPG = 1.85) e P5 (MPG = 1.89, CI = 1.84), pois obtiveram média próxima a 1.8.

As estimativas de contaminantes podem ser justificadas devido à ausência de Proteinases e Rnases nas soluções de extração adotadas nos protocolos testados. A presença de proteínas nas amostras analisadas, pós-extração, também foi observada no estudo realizado por VIANA et al. (2015), que utilizaram oito protocolos de extração para a palmeira Babassú (*Orbignya phalerata*) e encontraram variação na pureza das amostras entre os protocolos testados.

A presença de resíduos de RNA, e mesmo de proteínas, em amostras que serão utilizadas para estudos de diversidade com marcadores moleculares, via de regra, não se apresenta como limitação. Além do que, testes preliminares de amplificação, comumente realizados em estudos dessa natureza, poderão confirmar em cada caso, a necessidade de uso de Rnases. A ausência de influência de tais contaminantes em reações de PCR foi verificada por SCALDAFERRI et al. (2013).

TABELA 1. Média geral da quantificação espectrofotométrica das extrações realizadas com seis protocolos (*descrição) utilizando os diferentes tecidos da espécie *Atta sexdens*: Cabeça (CB), Mesossoma, Pernas e Gáster (MPG), Corpo Inteiro (CI). Para a obtenção desses valores foram realizadas três leituras em cada repetição (fonte de tecido x protocolo) e posteriormente calculou-se a média. Considerou-se o valor de absorvância das razões $A_{260/280}$ para estimativa da pureza das amostras.

Protocolo 1					Protocolo 2				
Tecido	Absorbância				Tecido	Absorbância			
	A_{260}	A_{280}	$A_{260/280}$	ng/ μ l		A_{260}	A_{280}	$A_{260/280}$	ng/ μ l
CB	0,18	0,12	1.92	136,63	CB	0,10	0,06	2.01	90,84
MPG	0,09	0,25	1.71	50,64	MPG	0,16	0,10	1.85	126,17
CI	0,24	0,15	1.85	184,07	CI	0,79	0,37	1.97	729,83
Protocolo 3					Protocolo 4				
Tecido	Absorbância				Tecido	Absorbância			
	A_{260}	A_{280}	$A_{260/280}$	ng/ μ l		A_{260}	A_{280}	$A_{260/280}$	ng/ μ l
CB	0,02	0,01	2.13	2650,32	CB	0,02	0,01	2.05	20,95
MPG	0,02	0,02	2.11	15,68	MPG	0,02	0,01	1.77	11,51
CI	0,03	0,02	1.82	20,24	CI	0,04	0,03	1.68	991,03
Protocolo 5					Protocolo 6				
Tecido	Absorbância				Tecido	Absorbância			
	A_{260}	A_{280}	$A_{260/280}$	ng/ μ l		A_{260}	A_{280}	$A_{260/280}$	ng/ μ l
CB	0,04	0,01	2.10	51,50	CB	-0,02	-0,03	9.57	2.367,6
MPG	0,26	0,21	1.89	209,68	MPG	0,02	0,00	2.04	48,30
CI	0,28	0,18	1.84	215,37	CI	0,15	0,09	1.65	141,41

*Descrição dos Protocolos: P1-SUNNUCKS & HALES (1996); P2-Método DOYLE & DOYLE (1990); P3-Método modificado por STORCHOVA et al. (2000); P4-Método modificado por RUSSEL et al. (2010); P5-MOGG & BOND (2003); P6- BARNWELL et al. (1998).

Em síntese, de acordo com a quantificação espectrofotométrica analisada para todas as amostras, os melhores protocolos (citando-os na categoria decrescente a partir do melhor valor quantificado na extração) foram P1, P2, P5, P4, P3 e P6. Corroborando em grande parte os dados obtidos para a análise feita a partir do gel de eletroforese, onde foi observado como melhores protocolos P1, P4 e P5. Ao avaliar a fotografia do gel de agarose, comparativamente com os dados espectrofotométricos, observou-se que as amostras CB e MPG de P3, e CB de P2 não permitiram visualização no gel apesar dos valores de absorvância serem significativos (CB= 2.13 e MPG=2.11, P3; CB= 2.01, P2), o que pode ser explicado porque apesar da presença de ácidos nucleicos, as amostras encontravam-se degradadas impedindo que houvesse a formação de marcas, sendo possível visualizar apenas o arraste no gel. Esse mesmo resultado pode ser observado para a amostra CB de P6, cujo valor de absorvância A_{260}/A_{280} foi igual a 9.56.

No geral, considera-se que a amostra do tecido CI pertencente aos protocolos P1, P2, P3 e P5, que por sua vez, correspondem à metade dos protocolos utilizados neste estudo, apresentaram valores da razão A_{260}/A_{280} entre 1.8 e 2.0 e por isso a análise espectrofotométrica confirma as boas condições de extração de DNA para a espécie *Atta sexdens* já indicada pela análise do gel.

CONCLUSÕES

A eficiência diferenciada dos protocolos foi confirmada, sendo possível, a despeito da possibilidade de uso de diferentes protocolos, indicar preferencialmente o protocolo SUNNUCKS & HALES (1996), seguido dos protocolos Método modificado por RUSSEL et al. (2010) e MOGG & BOND (2003) para extração de DNA em *Atta sexdens*. Não foi constatada a necessidade de separar partes do corpo para a extração, sendo possível, ao menos para os protocolos selecionados a utilização do Corpo Inteiro da formiga, para obtenção de melhor DNA genômico de *A. sexdens*.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), BA, Brasil, pela infraestrutura fornecida para a condução dos experimentos, à FAPESB (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia) pela concessão da bolsa de estudo aos três primeiros autores.

REFERÊNCIAS

ASGHAR, U.; MALIK, M.F.; ANWAR, F.; JAVED, A.; RAZA, A. DNA extraction from insects by using different techniques: A Review. **Advances in Entomology**, v.3, p.132-138, 2015. Disponível em: <http://file.scirp.org/pdf/AE_2015082615372116.pdf>. DOI: <http://dx.doi.org/10.4236/ae.2015.34016>

BACCARO, F.B.; FEITOSA, R.M.; FERNANDEZ, F.; FERNANDES, I.O.; IZZO, T.J.; SOUZA, J.L.P.; SOLAR, R. **Guia para o gênero de formigas do Brasil**. Editora Inpa – Manaus, 2015. Disponível em: <https://ppbio.inpa.gov.br/sites/default/files/Livro_Formigas_2015_0.pdf>.

BARNWELL, P.; BLANCHARD, A.N.; BRYANT, J.A.; SMIRNOFF, N. Isolation of DNA from the highly mucilaginous succulent plant *Sedum telephium*. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 16, p.133-138, 1998. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1023/A:1007473302551>>. DOI: 10.1023/A:1007473302551

CANTAGALLI, L.; MANGOLIN, C.; RUVOLLO-TAKASUSUKI, M.C. Population genetics of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Acta Biológica Colombiana**, v.18, n.1, p. 179– 190, 2013. Disponível em: <<http://www.scielo.org.co/pdf/abc/v18n1/v18n1a13.pdf>>.

CARVALHO, A.; VIEIRA, L. Determinação das Condições Ótimas para Análises de PCR-RAPD em *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). **Neotropical Entomology**, v.30, n.4, p. 593-600, 2001. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/ne/v30n4/a13v30n4.pdf>>. DOI:<http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2001000400013>

SILVA, C.B.M.C.; SANTOS, E.S.L.; NUNES, O.; VIEIRA, J.G.P.; MORI, G.M.; CORREA, R.X.; SOUZA, A.P. Molecular Genetic Variability of Commercial and Wild Accessions of Passion Fruit (*Passiflora* spp.) Targeting ex Situ Conservation and Breeding. **International Journal of Molecular Sciences**, v.15, p. 22933-22959, 2014.

DALBOSCO, E.Z.; SILVA, C.G.; LOMBERTI, E.A.; MIRANDA, M.A.F.; SILVA, C.A. Otimização do protocolo para extração de dna genômico de *Epidendrum viviparum* Lindl. (Orchidaceae). **Enciclopédia Biosfera**, v.11, p.3236-3243, 2015. Disponível em: <<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2015b/multidisciplinar/Otimizacao.pdf>>

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p. 13-15, 1990. DOI: 10.1007/978-3-642-83962-7_18

GRUTZMACHER, D.D.; ZIMMER, P.D.; OLIVEIRA, A.C.; LOECK, A.E.; FISCHER, S.; ELIAS, A.S.; VARGAS, C.C.J. Comparação De Protocolos Para Extração de DNA de *Acromyrmex heyeri*. **Revista Brasileira Agrocência**, v.8 n.2, p. 165-167, 2002. Disponível em: <<https://periodicos.ufpel.edu.br/ojs2/index.php/CAST/article/view/445/450>>. DOI:<http://dx.doi.org/10.18539/cast.v8i2.445>

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. **The Ants**. Cambridge, MA: Belknap (Harvard University Press), 1990.

KAKAZU, S.; SANCHES, A.; BACCI JR., M. Microsatellite loci characterize in the leaf-cutter ant *Atta laevigata*. **BMC Research Note**, v.6, p.328-331, 2013. Disponível em: <<http://bmcresnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-0500-6-328>>. DOI: 10.1186/1756-0500-6-328

LEAL, I.R.; WIRTH, R.; TABARELLI, M. The multiple impacts of leaf-cutting ants and their novel ecological role in human-modified neotropical forests. **Biotropica**, v.46 , n.5, p. 516–528, 2014. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/263446164_The_Multiple_Impacts_of_Leaf-Cutting_Ants_and_Their_Novel_Ecological_Role_in_Human_Modified_Neotropical_Forests>. DOI: 10.1111/btp.12126

MOGG, R.J.; BOND, J.M. A cheap, reliable and rapid method of extracting high-quality DNA from plants. **Molecular Ecology Notes**, v.3, p. 666-668, 2003. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1471-8286.2003.00548.x/abstract>>. DOI: 10.1046/j.1471-8286.2003.00548.x

REIS, E.; SALOMÃO, T.; CAMPOS, L.; TAVARES, M. Genetic diversity and structure of *Atta robusta* (Hymenoptera, Formicidae, Attini), an endangered species endemic to the restinga ecoregion. **Genetics and Molecular Biology**, v. 37 , n.3, p. 581-586, 2014. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/gmb/v37n3/a15v37n3.pdf>>. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572014000400015>

RUSSELL, A.; SAMUEL, R.; RUPP, B.E.; BARFUSS, M.H.J. Phylogenetics and cytology of a pantropical orchid genus *Polystachya* (Polystachyinae, Vandeeae, Orchidaceae): Evidence from plastid DNA sequence data. **Taxon**, v.59, p. 389- 404, 2010. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Michael_Barfuss/publication/233498181_Phylogenetics_and_cytology_of_a_pantropical_orchid_genus_Polystachya_Polystachyinae_Vandeeae_Orchidaceae_Evidence_from_plastid_DNA_sequence_data/links/0fcfd513e0061e6974000000.pdf>. DOI: 10.2307/25677598

ROCHA, T.O.; FREITAS, J.S.; SANTOS, E.S.L.; SCALDAFERRI, M.M.; OLIVEIRA, C.G.; Cerqueira-Silva, C.B.M. Estimate of diversity and structure genetic in cassatinga (*Croton heliotropiifolius*) based on molecular markers. **African Journal of Biotechnology**, v.15, p.518-523, 2016. DOI: 10.5897/AJB2015.15009
Disponível em <<http://academicjournals.org/journal/AJB/article-abstract/D2C5E6E57773>>

SANTOS, E.S.L.; CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; MORI, G.M.; AHNERT, D.; MELO, D.; PIRES, J.L.; CORREA, R.X.; SOUZA, A.P. Genetic Structure and Molecular Diversity of Cacao Plants Established as Local Varieties for More than Two Centuries: The Genetic History of Cacao Plantations in Bahia, Brazil. **Plos One**, v.10, p. e0145276-, n. 2015. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0145276>> Doi: 10.1371/journal.pone.0145276

SCALDAFERRI, M.M.; FREITAS, J.S. SANTOS, E.S.L.; VIEIRA, J.G.P. et al. Comparison of protocols for genomic DNA extraction from 'velame pimenta' (*Croton linearifolius*), a species native to the Caatinga, Brazil. **African Journal of Biotechnology**, v.12, p. 4761- 4766, 2013. Disponível em: <www.ajol.info/index.php/ajb/article/download/134029/123639. DOI: 10.5897/AJB2013.12182

ŠTORCHOVÁ, H.; HRDLIČKOVÁ, R.; CHRTEK, J.; TETERA, M. An improved method of DNA isolation from plants collected in the field and conserved in saturated NaCl/CTAB solution. **Taxon**, v. 49, p. 79-84, 2000. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Judith_Fehrer/publication/231168415_An_Improved_Method_of_DNA_Isolation_from_Plants_Collected_in_the_Field_and_Conserved_in_Saturated_NaClCTAB_Solution/links/02e7e5236ce9a82188000000/An-Improved-Method-of-DNA-Isolation-from-Plants-Collected-in-the-Field-and-Conserved-in-Saturated-NaCl-CTAB-Solution.pdf>. DOI: 10.2307/1223934

SUNNUCKS, P.; HALES, D.F. Numerous Transposed Sequences of Mitochondrial Cytochrome Oxidase I-II in Aphids of the Genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae). **Molecular Biology and Evolution**, v.13, p. 510-524, 1996. Disponível em: <<http://mbe.oxfordjournals.org/content/13/3/510.full.pdf>>. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025612>

VIANA, J.P.G.; BORGES, A.N.C.; LOPES, A.C.A.; GOMES, R.L.F.; BRITTO, F.B.; LIMA, P.S.C.; VALENTE, S.E.S. Comparison of eight methods of genomic DNA extraction from babassu. **Genetic and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 18003-18008, 2015. Disponível em:
<<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1032404/1/gmr7709.pdf>>. DOI: <http://dx.doi.org/10.4238/2015>.

WALDSCHMIDT, A.M.; SALOMÃO, T.M.F.; BARROS, E.G; CAMPOS, L.A.O. Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). **Brazilian Journal of Genetics**, v.20, p, 421-423, 1997. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-84551997000300011>. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-84551997000300011>

WARD, P.; BRADY, S.; FISHER, B.; SCHULTZ, T. The evolution of myrmicine ants: phylogeny and biogeography of a hyperdiverse ant clade (Hymenoptera: Formicidae). **Systematic Entomology**, p.1-21, 2014. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/syen.12090/pdf>>.DOI: 10.1111/syen.12090

ZORTÉA, K.E.M.; MIKOVSKI, A.I.; CASTRILLON, R.G.; RUZZA, D.A.C.; ROSSI, A.A.B. Estabelecimento de protocolo de extração de DNA para *Eugênia stipitata* mc. vaung, visando estudos moleculares. **Enciclopédia Biosfera**, v.13, p.495-502, 2016. Disponível em: <<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2016b/agrarias/Estabelecimento%20de%20protocolo.pdf>>