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

PROSPECÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES
E ANÁLISE DA ESTRUTURA POPULACIONAL EM
ATTA LAEVIGATA (FORMICIDAE: ATTINI)

Sérgio Kakazu

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Rio Claro
2012

Sérgio Kakazu

**PROSPECÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES E
ANÁLISE DA ESTRUTURA POPULACIONAL EM *ATTA
LAEVIGATA* (FORMICIDAE: ATTINI)**

Orientador: Prof. Dr. MAURÍCIO BACCI JÚNIOR

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências do Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas (Biologia
Celular e Molecular).

Rio Claro
2012

595.796 Kakazu, Sérgio
K13p Prospecção de marcadores microssatélites e análise da
 estrutura populacional em *Atta Laevigata* (Formicidae: Attini)
 / Sérgio Kakazu. - Rio Claro : [s.n.], 2012
 49 f. : il., figs., gráfs., tabs., mapas

 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
 Instituto de Biociências de Rio Claro
 Orientador: Maurício Bacci Júnior
 Co-Orientador: Alexandra Sanches

 1. Formiga. 2. Attini. 3. Formicidae. 4. Sistemática
 molecular. 5. Formiga praga. 6. Populações genéticas. I.
 Título.

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

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao Prof. Dr. Maurício Bacci Júnior, pela oportunidade de trabalho, orientação, paciência e por todo conhecimento transmitido ao longo desses anos.

À Dra. Alexandra Sanches pela orientação, paciência e otimismo, que, juntamente com a Profa. Dra. Cibele Biondo, tornou esse projeto muito mais agradável.

À FAPESP – Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo suporte financeiro dado a este projeto de Mestrado.

Ao Centro de Estudos de Insetos Sociais (C. E. I. S.), por fornecer a estrutura para o desenvolvimento desse trabalho.

À Profa. Dra. Cibele Biondo, pelas considerações e sugestões ao meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Marco Del Lama, pelo “presente de casamento” que recebo com muito respeito e admiração.

À Profa. Dra. Patrícia Maltempi, pelas sugestões e considerações ao meu trabalho.

Aos colegas, e queridos amigos de laboratório, Joaquim, Cynara, Carol, Cintia, Joana, Milene, Shao, Alexandre, Welliton, Mari e Letícia, pela amizade, ajuda e brincadeiras que tornaram o dia-a-dia no laboratório muito mais prazeroso.

À minha amiga Fabí pela amizade e companheirismo.

Aos amigos e sempre companheiros de república, Tropeço, Gabriel, Perdido, Xaxim, Jack, Pataca e Close-up, pela amizade, anos de convivência e por ser a minha família durante a graduação.

Aos meus grandes amigos Bolinha, Fernando, Fabrício e Rodrigo pela amizade e companheirismo.

A todos os queridos amigos da turma de formandos Bionot 2004, que fizeram parte da melhor fase da minha vida.

Ao casal Thiago Gazoni e Weilan Paixão, pela amizade e companheirismo nas horas alegres e tristes.

Ao meu primo Ricardo Kakazu, pela amizade e pelas conversas de fim de noite.

Não posso deixar de agradecer a minha grande amiga Edmara Nico, pela amizade, pela ajuda na qualificação e defesa e por ser a minha grande companheira no Dj.

Agradeço à minha grande família por todo o amor, apoio e contribuição na minha formação.

Agradeço às minhas queridas irmãs Miriam, Lúcia e Paula, por fazerem parte da minha vida e pelo apoio que sempre me deram.

Agradeço a minha querida sobrinha Julinha, que trouxe uma grande alegria não só a mim, mas a toda nossa família.

Agradeço a minha querida mãe Chiemi, pelo amor incondicional, pela educação e pelo apoio durante toda a minha vida.

Agradeço ao meu pai Yoshiaki, por quem nutro um grande respeito e admiração, pela amizade, pelo amor incondicional e por sempre me apoiar até nas horas em que eu estava errado.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

Índice

Resumo.....	01
Abstract.....	02
Introdução e Justificativa.....	04
Objetivos.....	12
Material e Métodos.....	13
Resultados e Discussão.....	27
Conclusão.....	44
Literatura Citada.....	45

Lista de figuras

Figura 1: Árvore filogenética obtida com base no consenso estrito entre as 17 árvores mais parcimoniosas (105 passos) obtidas a partir de 81 caracteres informativos para parcimônia dos *loci* COI, IGS, Leu tRNA e COII de 61 espécimes de *Atta laevigata* e dois de *Atta bisphaerica* (grupo externo). São mostrados os valores de *bootstrap* e o suporte de Bremer (*decay index*), acima e abaixo de cada ramo, respectivamente. CI = 0,8857, HI = 0,1143 e RI = 0,9698 (retirada de VINHA, 2007).....06

Figura 2: Mapa com os pontos de coleta dos 68 indivíduos de *Atta laevigata*: os pontos em azul e vermelho correspondem às linhagens mitocondriais 1 e 2, respectivamente.....13

Figura 3: Valores de delta K (K) obtido a partir da análise no *software Structure*, com aplicação do modelo proposto por Evanno et al. (2005).....31

Figura 4: Análise da estrutura populacional para os 68 indivíduos das duas linhagens mitocondriais pertencentes às regiões Sudeste e Norte. O número de *clusters* pré-definidos (K) está indicado a esquerda de cada gráfico. Cada cor representa um *cluster* e cada indivíduo está representado por uma barra vertical dividindo em componentes coloridos proporcionais à fração do seu genótipo que é atribuída a cada um dos *clusters* pré-definidos. Para K=3, que representa o modelo mais provável (tabela 3), os *clusters* L1, L2 e LN correspondem às cores azul, vermelho e verde, respectivamente.....32

Figura 5: Árvore filogenética preparada com o uso do programa MEGA 3.1, obtida a partir dos *loci* COI, IGS, Leu tRNA e COII de 60 espécimes de *Atta laevigata* e dois de *Atta bisphaerica* (grupo externo), obtida pelo método NJ. As barras horizontais correspondem ao coeficiente de afiliação ou participação de cada indivíduo em relação aos *clusters* L1 (azul), L2(vermelho) e LN (verde).....38

Figura 6: Mapa com os pontos de coleta dos 68 indivíduos de *Atta laevigata*, os pontos em azul, vermelho e verde correspondem aos *clusters* L1, L2 e LN, respectivamente.....40

Lista de tabelas

Tabela 1: Ninhos amostrados de <i>Atta laevigata</i> utilizados no presente trabalho.....	14, 15
Tabela 2: Lista dos 23 locos de microssatélites isolados de <i>Atta laevigata</i>	28
Tabela 3: Caracterização de oito <i>loci</i> microssatélites isolados de <i>Atta laevigata</i> . Número de indivíduos (N), número de alelos (na), heterozigosidade observada (Ho) e esperada (He), valores de P para o teste de <i>Hardy-Weinberg</i> (HW-p) com base em uma amostra de 36 indivíduos da região Sudeste pertencentes à linhagem mitoconrial 2.....	30
Tabela 4: Valores de Ln Pr (X K) para cada um dos possíveis modelos populacionais testados (K=1, 2, 3, 4 e 5) pelo <i>software Structure</i>	31
Tabela 5: Resultado da genotipagem de alguns indivíduos utilizando o <i>primer</i> Alae 16. As linhas em azul e vermelho representam os <i>clusters</i> L1 e L2, respectivamente. As linhas em amarelo representam os indivíduos híbridos. As marcações em negrito representam os alelos exclusivos do <i>cluster</i> L2 presentes nos híbridos.....	35
Tabela 6: Resultado da genotipagem de alguns indivíduos utilizando o <i>primer</i> Alae 24. As linhas em azul e vermelho representam os <i>clusters</i> L1 e L2, respectivamente. As linhas em amarelo representam os indivíduos híbridos. As marcações em negrito representam os alelos exclusivos do <i>cluster</i> L2 presentes nos híbridos.....	36
Tabela 7: Valores estimados de F_{ST} para os pares de <i>clusters</i> formados pelos indivíduos da linhagem mitocondrial 1 da região Sudeste (L1), linhagem mitocondriais 2 da região Sudeste (L2) e das linhagens mitocondriais 1 e 2 da região Norte (LN).....	40
Tabela 8: Número de indivíduos (N), número de Alelos (NA), valores de riqueza alélica, heterozigosidade observada (Ho) e esperada (He) para os <i>locos</i> polimórficos isolados de <i>Atta laevigata</i> , em amostras das linhagens um (L1) e dois (L2) e para a linhagem da região Norte (LN).....	41

Resumo

Estudos recentes realizados no Laboratório de Evolução Molecular, Centro de Estudos de Insetos Sociais, Instituto de Biociências, UNESP – Campus Rio Claro, Brasil, evidenciaram a existência de duas linhagens de *Atta laevigata*, caracterizadas por marcadores mitocondriais, como clados irmãos dentro do grupo *Atta*, sugerindo isolamento reprodutivo e monofilia recíproca, resultantes de uma especiação recente. Portanto, *Atta laevigata* parece ser formada por dois pools gênicos distintos, cada um deles pertencente a uma possível espécie biológica distinta. Um alto grau de variação morfológica dificulta a diferenciação das duas prováveis espécies pela análise dos espinhos das operárias, que são os caracteres informativos à Taxonomia usualmente utilizados. Ainda que haja caracterização de genes mitocondriais, as informações filogenéticas moleculares resultantes dizem respeito somente à matrilinearidade, sendo necessária uma caracterização molecular por marcadores co-dominantes, como os microssatélites (SSRs), para testar a hipótese de ausência de fluxo gênico resultante de uma especiação recente. Na presente Dissertação de Mestrado, microssatélites foram isolados, amplificados e tiveram seu polimorfismo analisado para, a seguir, testar a existência de fluxo gênico entre as duas matrilinearidades. Nós apresentamos os resultados da construção de uma biblioteca enriquecida com SSRs e o desenho de *primers* para 23 locos microssatélites, para os quais protocolos de PCR foram otimizados e permitiram caracterizar o polimorfismo desses marcadores. Em 36 indivíduos da região Sudeste pertencentes à linhagem mitocondrial 2, oito *loci* apresentaram padrões de amplificação satisfatórios incluindo SSRs com tri e dinucleotídeos. Dois a

dezesseis alelos por *locus* foram encontrados e a heterozigosidade esperada variou de 0,07 a 0,94. A amplificação heteróloga desses *loci* em outra espécie de *Atta*, *A. robusta*, rendeu resultado positivo. Um dos *locus* microssatélites apresentou desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg e déficit de heterozigotos e, portanto, não foi utilizado para as demais análises. Os demais sete locos foram utilizados para a análise populacional de 68 indivíduos das duas matrilineagens e mostraram que, na região Norte, na Floresta Amazônica, há fluxo gênico entre os indivíduos das linhagens mitocondriais distintas, mas que este fluxo gênico é muito raro e praticamente inexistente entre as mesmas linhagens na região Sudeste, onde provavelmente está ocorrendo um processo de especiação.

Abstract

Recent studies performed at the Laboratory of Molecular Evolution, Centre for the Study of Social Insects, Biosciences Institute, UNESP - Rio Claro, Brazil, evidenced the existence of two lineage of *Atta laevigata*, characterized by mitochondrial markers, as sister clades within the group *Atta*, suggesting reproductive isolation and reciprocal monophyly as a result of a recent speciation. Therefore, *Atta laevigata* appears to be formed by two distinct gene pools, each belonging to a potential distinct biological species. A high degree of morphological variation difficult the differentiation of the two potential species by analysis of the spines of workers, which are usually informative characters to the Taxonomy. The molecular phylogenetic information from mitochondrial genes reflects only the matrilineage, being necessary a molecular characterization of

co-dominant marker, such as microsatellites (SSR) to test the hypothesis of absence of gene flow resulting from a recent speciation. In this Dissertation, microsatellites were isolated, amplified, analyzed for their polymorphism, and used to test gene flow between the two matrilineages. We present the results of the construction of a library enriched with SSRs and design of primers for 23 microsatellite loci for which PCR protocols were optimized and used to characterize the polymorphism of these markers. In 36 individuals from the Southeast region and belonging to the mitochondrial lineage 2, eight loci showed satisfactory amplification patterns including SSRs with tri- and dinucleotides. Two to sixteen alleles per locus were found and the expected heterozygosity ranged from 0.07 to 0.94. The amplification of heterologous loci in another species of *Atta*, *A. robusta*, yielded positive result. One of the microsatellite loci showed significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium and deficit of heterozygotes and therefore it was not used for other analyzes. The remaining seven loci were used to analyze a population of 68 individuals from two matrilineages and showed that, in the north, in the Amazon rainforest, there is gene flow between individuals of distinct mitochondrial lineages, but that gene flow is very rare and practically non-existent between the same lineages in the Southeast, which is probably going a process of speciation.

Introdução e Justificativa

Atta laevigata como modelo de estudo em especiação

Atta laevigata foi selecionada como organismo modelo do presente Projeto de Mestrado porque:

1. Constitui populações mendelianas às quais se aplicam os conceitos e ferramentas moleculares para identificação do isolamento reprodutivo;
2. É formada por duas matrilineagens simpátricas, identificáveis através de análises moleculares de marcadores mitocondriais.

Estudos recentes realizados no Laboratório de Evolução Molecular, Centro de Estudos de Insetos Sociais, Instituto de Biociências, UNESP – Campus Rio Claro, Brasil, indicaram que *Atta laevigata* apresenta forte estruturação geográfica, para a qual clados proximamente relacionados de haplótipos de genes mitocondriais são recuperados a partir de populações locais, sendo possível prever a localidade geográfica de cada espécime a partir da determinação de sua sequência de DNA mitocondrial. À forte estruturação geográfica sobrepõe-se uma estruturação genealógica: duas matrilineagens, caracterizadas por marcadores mitocondriais, como clados irmãos dentro do grupo *Atta*, utilizando nossa base de dados de genes mitocondriais (Figura 1) (VINHA, 2007). Para esse estudo foi usada uma região do DNA mitocondrial muito apropriada para a detecção de diferenciação e estudos evolutivos de populações de *Atta laevigata*. Trata-se do espaçador intergênico (IGS), localizado entre os genes mitocondriais codificadores do Citocromo-oxidase I (COI) e de RNA transportador de Leucina (Leu tRNA), que possui grande variação entre espécies e subespécies de formigas attíneas e é caracterizado por apresentar um alto conteúdo de A/T (adenina/ timina) e grande robustez, sendo utilizado como um marcador molecular que permite encontrar padrões de diversificação biológica e

evolução de subespécies de *Atta sexdens*, permitindo inferências filogenéticas (BACCI et al., 2001).

Estes resultados sugerem monofilia recíproca entre as duas linhagens, resultantes de uma especiação recente. Portanto, *Atta laevigata* parece ser formada por dois *pools* gênicos distintos, cada um deles pertencente a uma possível espécie biológica distinta.

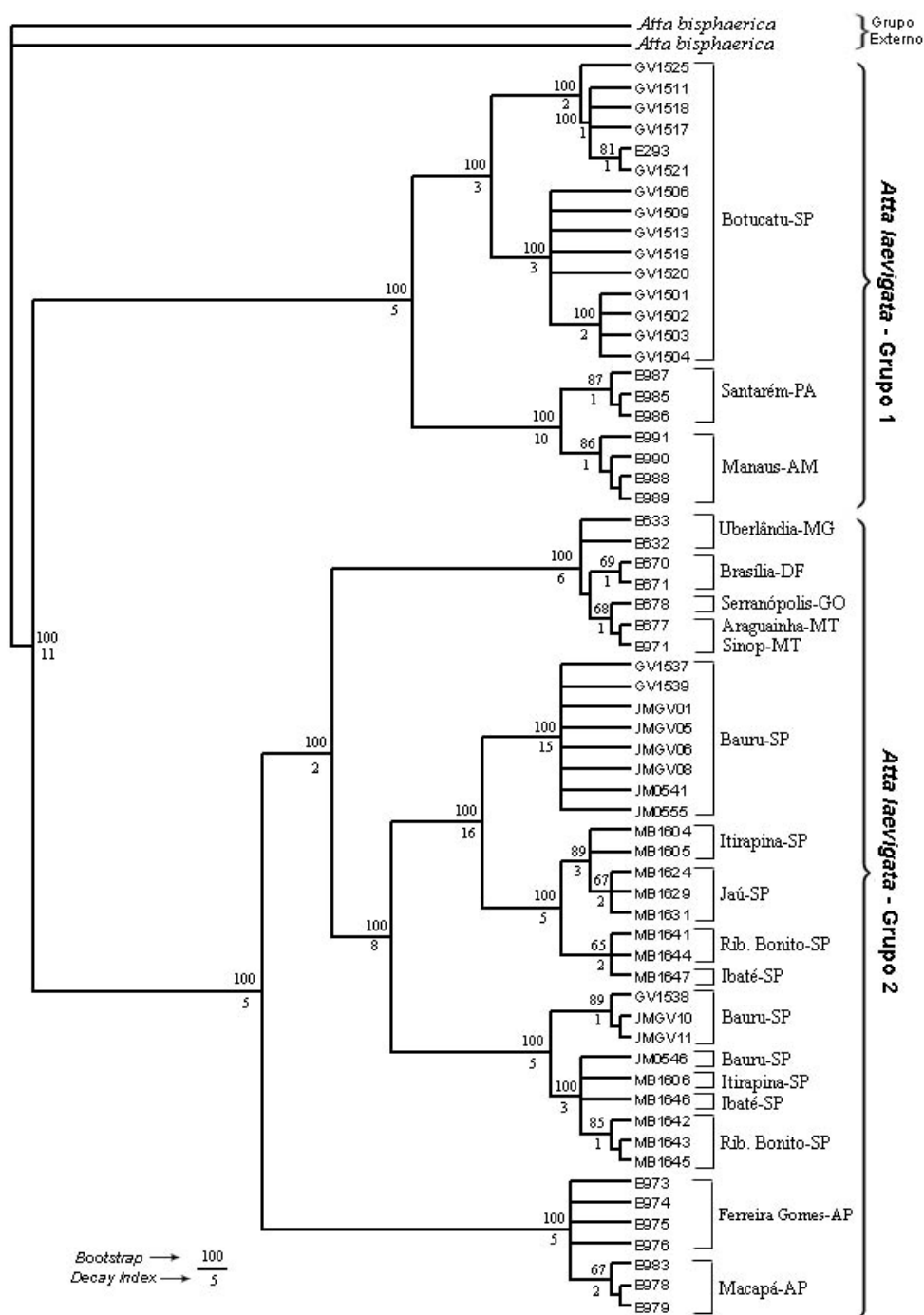


Figura 1: Árvore filogenética obtida com base no consenso estrito entre as 17 árvores mais parcimoniosas (105 passos) obtidas a partir de 81 caracteres informativos para parcimônia dos loci COI, IGS, Leu tRNA e COII de 61 espécimes de *Atta laevigata* e dois de *Atta bisphaerica* (grupo externo). São mostrados os valores de bootstrap e o suporte de Bremer (decay index), acima e abaixo de cada ramo, respectivamente. CI = 0.8857, HI = 0.1143 e RI = 0.9698 (retirada de VINHA, 2007).

Há simpatria, caracterizada pela presença lado a lado de ninhos das duas linhagens, em algumas regiões geográficas, como em Botucatu (SP).

À estruturação genealógica sobrepõe-se intensa variação morfológica que torna extremamente difícil a diferenciação das duas espécies pela análise dos espinhos das operárias, que são os caracteres informativos à Taxonomia usualmente utilizados. Inexiste, portanto, morfótipo distinto para as operárias pertencentes a cada uma das prováveis espécies.

Entre as formigas da tribo Attini, estudos filogenéticos baseados em caracteres morfológicos têm tido dificuldades devido a uma acentuada variação existente entre as operárias das diversas espécies que podem apresentar, além de variações no tamanho, diferenças nos caracteres de um tamanho para outro (GONÇALVES, 1961). Em casos como estes a sistemática molecular vem sendo de grande utilidade de modo que a incorporação de dados moleculares aos estudos taxonômicos resultou na caracterização filogenética de alguns gêneros attíneos. Desse modo, no presente trabalho, nós prospectamos e selecionamos microsatélites polimórficos em *Atta laevigata*, de modo a verificar se há fluxo gênico entre as linhagens, já que o fluxo gênico mediado por machos não deve ser desprezado, com objetivo de descrever esta possível nova espécie biológica.

Marcadores microsatélites como ferramenta na estimativa de fluxo gênico

Desde o seu surgimento, a biologia molecular se tornou uma poderosa ferramenta para detectar a variabilidade genética, permitindo, assim, comparar indivíduos, populações ou espécies diferentes (HILLIS et al., 1996). Para estimar a variabilidade gênica são utilizados marcadores moleculares que nos permitem acessar uma ampla gama de informações quanto à estrutura das populações, fluxo

gênico, relações filogenéticas, padrões biogeográficos e análises de paternidade e parentesco (FÉRAL, 2002).

Os marcadores microssatélites ou sequências simples repetidas (SSR - "Simple Sequence Repeats") são sequências curtas, de 1 a 6 pb, repetidas em *tandem* e distribuídas por todo o genoma de eucariotos e procariotos (TAUTZ; RENZ, 1984; TAUTZ, 1989).

Os alelos de um *locus* microssatélite diferem em tamanho devido a variações no número das suas unidades repetitivas. Tal variação é originada principalmente devido a um erro de pareamento durante a replicação do DNA pela DNA polimerase (*slippage*), que pode inserir ou deixar de copiar uma ou mais unidades repetitivas (ELLEGREN, 2004; SCHOLÖTTERER, 1998). Embora tais erros possam ser corrigidos pelo mecanismo de reparo das células, muitos deles permanecem e tornam-se mutações (GRIFFITHS et al., 1999), essas mutações geram um novo alelo com maior ou menor número de unidades repetitivas, o que explica porque os microssatélites são tão variáveis, ou seja, polimórficos (BRUFORD e WAYNE, 1993). Esse alto grau de polimorfismo torna os microssatélites poderosos marcadores moleculares (ZANE et al., 2002) o que proporciona a sua utilização em estudos populacionais, permitindo comparar desde indivíduos a espécies proximamente relacionadas (BROWN et al., 1996).

Atualmente, estão entre os marcadores moleculares mais utilizados e seu sucesso se deve a sua abundância e ampla distribuição no genoma, ao seu alto grau de polimorfismo, a sua herança Mendeliana e por serem multialélicos e co-dominantes, o que permite a identificação dos heterozigotos. Além disso, apresentam uma alta reprodutibilidade e resolução. Estes fatores, aliados ao grande avanço dos métodos de análises estatísticas desenvolvidas para microssatélites,

colocam-nos entre os marcadores moleculares com maior conteúdo de informação de polimorfismo (O'REILLY; WRIGHT, 1995; SCHOLÖTTERER, 1998).

Além de serem intensamente utilizados em estudos populacionais, os microssatélites têm sido aplicados para caracterizar o isolamento reprodutivo entre espécies dos mais variados táxons (KANNO et al. 2006; RACEY et al. 2007; TURNER et al. 2008).

No caso dos insetos sociais, os marcadores microssatélites são úteis para medir parâmetros importantes da sociedade de insetos, incluindo, parentesco genético entre companheiros de ninhos, número efetivo de rainhas, número de acasalamentos por rainhas, partição de reprodução entre rainhas ou machos, e reprodução de operárias, possibilitando um estudo em uma escala mais fina da estrutura genética tanto em um ninho quanto em uma população local, permitindo uma análise detalhada da estrutura da população local e uma compreensão entre sistema de acasalamento e fluxo gênico (CHAPUISAT, 1996).

Fjerdingstad et al. (1998), em um estudo sobre o grau de múltipla paternidade e parentesco realizado com as formigas cortadeiras do Panamá *Atta colombica*, por meio da utilização de marcadores microssatélites, evidenciaram que a média de machos que contribuem para a formação da colônia foi de 2,6 e a média efetiva de paternidade foi de 2,31 confirmando estudos prévios sobre acasalamentos múltiplos em rainhas de formigas cortadeiras. Em 2000 Fjerdingstad e Boomsma, usando marcadores microssatélites desenvolvidos para *Atta colombica*, encontraram resultado semelhante para *Atta sexdens*.

Outro estudo bem conhecido realizado com formigas é sobre a especiação híbrida descrita entre duas espécies do gênero *Pogonomyrmex*. A hibridização histórica entre *P. barbatus* e *P. rugosus* resultou em linhagens mutuamente

interdependentes e geneticamente distintas, as quais sempre co-ocorrem em uma dada localização (HELMES CAHAN & KELLER, 2003). O isolamento reprodutivo é completo onde estas linhagens ocorrem em simpatria com qualquer um de seus parentais. Uma investigação dos mecanismos pré e/ou pós-zigóticos envolvidos no isolamento reprodutivo entre as duas linhagens e um de seus parentais (*P. rugosus*), que foram identificados geneticamente com uso de sequências do DNAm e microssatélites, foi realizada por meio de experimentos controlados em uma agregação reprodutiva (SCHWANDER et al., 2008). Os autores encontraram dois mecanismos de isolamento reprodutivo, pré-zigótico (diferença no tempo de agregação e cruzamento preferencial) e um pós-zigótico (inviabilidade híbrida), que reduzem fortemente o fluxo gênico entre *P. rugosus* e ambas as linhagens (SCHWANDER et al., 2008).

Taxonomia de *Atta laevigata*

As formigas cortadeiras da tribo Attini (Myrmicinae), que compreendem os gêneros *Atta*, popularmente conhecidas como "saúvas" (WEBER, 1972), e *Acromyrmex*, popularmente conhecidas como "quenquéns" (GONÇALVES, 1961), apresentam o hábito de cortar folhas de plantas com as quais cultivam uma espécie de fungo simbiote utilizada na sua alimentação (GONÇALVES, 1961). Este hábito contribui fortemente para a desfolhação de florestas neotropicais e savanas (CHERRETT, 1986; HOLDOBLER; WILSON 1990; WIRTH et al. 2003), e também de uma ampla faixa de espécies vegetais cultivadas pelo homem (DELLA LUCIA et al., 1993). As attíneas cortadeiras vivem desde a latitude 33° Sul (Sul do Brasil e Nordeste da Argentina) até 12° Norte (Texas, EUA) (WEBER, 1972). Entre as formigas cortadeiras do gênero *Atta*, são atualmente reconhecidas 15 espécies (BOLTON et al., 2006).

Atta laevigata foi descrita em 1858, por F. Smith. Mas, desde então, a espécie passou por uma extensa alteração classificatória e nomenclatural. Gonçalves (1942) estabeleceu uma chave taxonômica para as espécies do gênero *Atta*. Nesta, fez considerações e descrições sobre as subespécies e variedade de *Atta laevigata*. O autor considerou três subespécies e uma variedade de *Atta laevigata*: *Atta laevigata saltensis* Forel, 1913; *Atta laevigata saltensis* var. *obscurata* Gallardo, 1916; *Atta laevigata lizeri* Santschi, 1922 e *Atta laevigata venezuelensis* Gonçalves, 1942. Borgmeier (1950) fez uma revisão do gênero e considerou somente *Atta laevigata venezuelensis*.

Gonçalves (1982) descreveu uma nova espécie de saúva próxima a *A. laevigata*, denominada de *Atta silvai*, baseado em operárias e formas sexuadas. Eram caracterizadas por apresentar cabeça menos larga do que *A. laevigata*, com áreas foscas e presença de pelos, gáster brilhantes com pelos e espinhos occipitais mais altos. A genitália dos machos apresentava uma extremidade da ságita mais afinada quando comparada com *A. laevigata*.

Quatorze anos mais tarde, Delabie (1998) comparou exemplares de *A. silvai* e *A. laevigata* e questionou a validade do táxon. Segundo o autor, *A. laevigata* apresenta padrões de variação na morfologia principalmente das operárias, e as características apresentadas por Gonçalves (1982) haviam sido confundidas com fenótipos intermediários existentes entre as subcastas de soldados e de grandes operárias. Também não existia qualquer estrutura relevante na genitália masculina de *A. silvai*, mas sim dúvida quanto aos artefatos de dessecação que havia conduzido a uma interpretação errônea. O mesmo autor, analisando outros exemplares de Mato Grosso do Sul, Bahia (Simões Filho, Serrinha e Maraú) e Manaus, também encontrou indivíduos de *A. laevigata* com a mesma descrição de *A. silvai*. Por fim, o autor

sinonimizou *A. silvai* em *A. laevigata* porque as diferenças morfológicas entre ambos os táxons mostraram-se nulas.

Atualmente, a espécie está classificada sem nenhuma subdivisão (BOLTON, 1995). Como *A. laevigata* apresenta variabilidade fenotípica, a aplicação de um único método torna o estudo limitado para explicar todas essas variações. Ferramentas modernas complementares aos dados morfológicos têm sido relativamente bem sucedidas em estudos em insetos, resultando em espécies que já foram descritas tomando por base informações moleculares (CATERINO et al., 2000).

Objetivos

O objetivo da dissertação de Mestrado foi verificar se há fluxo gênico entre as duas linhagens de *Atta laevigata*, reforçando a subdivisão deste táxon em duas espécies distintas. Para tanto, os seguintes procedimentos foram adotados:

1. Prospecção e caracterização de marcadores microsatélites para estas formigas.
2. Utilização dos microsatélites polimórficos prospectados para análises de estruturação populacional e fluxo gênico, para auxiliar na taxonomia de *Atta laevigata*, possivelmente representada por duas espécies distintas.

Material e Métodos

Material biológico

Foram utilizados 68 indivíduos de ninhos distintos de *Atta laevigata*, coletados de diferentes regiões geográficas, conforme mostrado no mapa da figura 2 e na tabela 1.

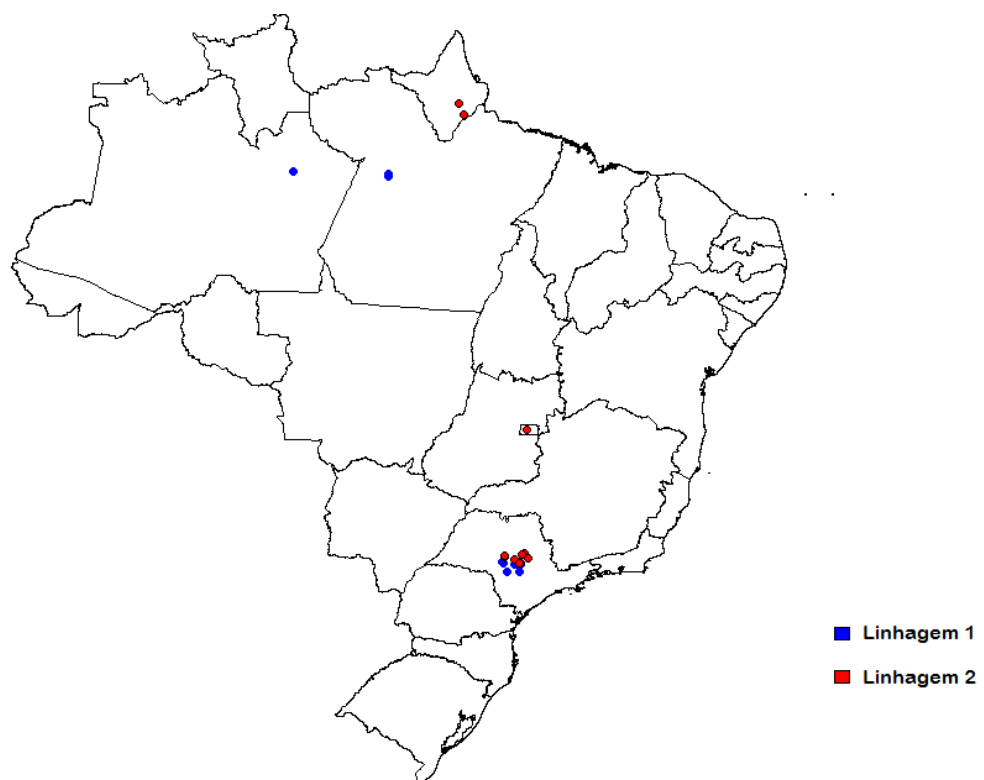


Figura 2: Mapa com os pontos de coleta dos 68 indivíduos de *Atta laevigata*, os pontos em azul e vermelho e verde correspondem as linhagens mitocondriais 1 (36 indivíduos) e 2 (32 indivíduos) respectivamente.

Tabela 1. Ninhos amostrados de *Atta laevigata* utilizados no presente trabalho.

Código	Local de Coleta	Longitude(W)	Latitude (S)	Linhagem mitocondrial
E293	Botucatu-SP	-48,334	-22,46	1
GV150805-01	Botucatu-SP	-48,334	-22,46	1
GV150805-02	Botucatu-SP	-48,334	-22,46	1
GV150805-03	Botucatu-SP	-48,334	-22,46	1
GV150805-04	Botucatu-SP	-48,334	-22,46	1
GV150805-06	Botucatu-SP	-48,3159	-22,957	1
GV150805-11	Botucatu-SP	-48,493	-22,571	1
GV150805-13	Botucatu-SP	-48,546	-22,562	1
GV150805-17	Botucatu-SP	-48,918	-22,94	1
GV150805-18	Botucatu-SP	-49,075	-22,526	1
GV150805-19	Botucatu-SP	-49,075	-22,526	1
GV150805-20	Botucatu-SP	-49,16	-22,49	1
GV150805-21	Botucatu-SP	-49,16	-22,49	1
GV150805-25	Botucatu-SP	-49,163	-22,485	1
E985	Santarém-PA	-54,78	-2,6434	1
E986	Santarém-PA	-54,9	-2,8213	1
E987	Santarém-PA	-54,929	-2,9392	1
E988	Manaus-AM	-59,739	-2,6949	1
E890	Manaus-AM	-59,739	-2,6949	1
E989	Manaus-AM	-59,739	-2,6949	1
E991	Manaus-AM	-59,739	-2,6949	1
E993	Manaus-AM	-59,739	-2,6949	1
21N1	Botucatu-SP	-48,26565	-22,50366	1
23N4	Botucatu-SP	-48,26175	-22,51077	1
31N5	Botucatu-SP	-48,26187	-22,51079	1
32N6	Botucatu-SP	-48,26421	-22,50935	1
26N10	Bauru-SP	-49,0288	-22,14125	1
24N19	Botucatu-SP	-48,28338	-22,50959	1
43N34	Botucatu-SP	-48,26172	-22,51074	1
44N35	Botucatu-SP	-48,26168	-22,51059	1
45N36	Botucatu-SP	-48,26242	-22,55874	1
46N37	Botucatu-SP	-48,25931	-22,55939	1
64N40	Botucatu-SP	-48,2621	-22,50964	1
66N41	Botucatu-SP	-48,26252	-22,50986	1
65N42	Botucatu-SP	-48,26345	-22,5093	1
57N44	Botucatu-SP	-48,26192	-22,50992	1
E670	Brasília-DF	-47,91	-15,78	2
E973	Ferreira Gomes-AP	-51,333	0,739	2
E974	Ferreira Gomes-AP	-51,333	0,739	2
E975	Ferreira Gomes-AP	-51,333	0,739	2
E983	Macapá-AP	-51,125	0,1676	2
GV150805-37	Bauru-SP	-49,014	-22,21	2

Código	Local de Coleta	Longitude(W)	Latitude (S)	Linhagem mitocondrial
GV150805-38	Bauru-SP	-49,014	-22,21	2
GV150805-39	Bauru-SP	-49,014	-22,21	2
MB160306-05	Itirapina-SP	-47,842	-22,254	2
MB160306-24	Jaú-SP	-48,524	-22,359	2
MB160306-29	Jaú-SP	-48,524	-22,359	2
MB160306-29 G	Jaú-SP	-48,524	-22,359	2
MB160306-31	Jaú-SP	-48,524	-22,359	2
MB160306-42	Ribeirão Bonito-SP	-48,151	-22,083	2
MB160306-43	Ribeirão Bonito-SP	-48,151	-22,083	2
MB160306-44	Ribeirão Bonito-SP	-48,151	-22,083	2
MB160306-45	Ribeirão Bonito-SP	-48,151	-22,083	2
MB160306-46	Ibaté-SP	-48,033	-22,055	2
MB160306-47	Ibaté-SP	-48,033	-22,055	2
MB160306-40	Ribeirão Bonito-SP	-48,151	-22,083	2
MB160306-33	Jaú-SP	-48,524	-22,359	2
MB160306-01	Itirapina-SP	-47,842	-22,254	2
MB160306-21	Jaú-SP	-48,524	-22,359	2
13N15	Botucatu-SP	-48,25908	-22,5162	2
14N16	Botucatu-SP	-48,25908	-22,5162	2
15N17	Botucatu-SP	-48,25892	-22,51634	2
16N18	Botucatu-SP	-48,25904	-22,5159	2
25N08	Bauru-SP	-49,02839	-22,14669	2
27N11	Bauru-SP	-49,03626	-22,1652	2
29N13	Bauru-SP	-49,02241	-22,13981	2
39N29	Bauru-SP	-48,26156	-22,5025	2
310N30	Botucatu-SP	-48,26143	-22,50229	2

Extração de DNA

A extração de DNA foi feita utilizando o protocolo de TNES (250 mM Tris pH 7.5, 2 M NaCl, 100 mM EDTA, 2.5 % SDS). A este protocolo foi acrescentada uma etapa de purificação, utilizando fenol e uma mistura de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (24: 24:1), modificado a partir Sambrook & Fritsch (1989). Formigas inteiras foram trituradas, através de maceração com o auxílio de um pistilo plástico, no interior de microtubos de 1,5 ml. As formigas foram maceradas juntamente com 550 µL de solução de lise celular – TNES (Tris 250 mM pH 7,5; NaCl 2M; EDTA 100 mM; SDS 2 %). Após uma breve agitação foram adicionados 10 µL de proteinase K

(20mg/ml) e a reação foi incubada por 3 horas a 55 °C. Após a incubação foi feito um tratamento com 3 µL de solução de RNase A (4mg/ml) e a reação foi incubada a 37° C por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 200 µL de NaCl 5M para precipitar as proteínas associadas ao DNA. O sobrenadante contendo DNA foi então transferido para um novo tubo onde o DNA foi precipitado com isopropanol 100 % e lavado com etanol 70 %. Em seguida, o precipitado foi seco em centrífuga a vácuo e hidratado com 500 µL de tampão TE. No dia seguinte, foram adicionados 500 µL de fenol, a mistura reacional foi centrifugada e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde recebeu 700 µL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (24:24:1). A mistura foi novamente centrifugada e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Foi adicionado 0,1 volume de acetato de sódio 3M (pH 5,2) e dois volumes de isopropanol 100 % gelado. A mistura foi centrifugada, o precipitado foi seco à temperatura ambiente e hidratado com 30 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM).

Prospecção e caracterização dos marcadores microsatélites

O isolamento dos locos de microsatélites de *A. laevigata* foi realizado mediante a construção de uma biblioteca genômica enriquecida com SSRs (*simple sequence repeats*) seguindo-se o método proposto por Hamilton et al. (1999). Esta metodologia é baseada em quatro etapas principais: (1) clivagem do DNA através de enzimas de restrição, (2) ligação de adaptadores nas extremidades do DNA fragmentado criando sítios de anelamento de *primers*, (3) hibridação dos fragmentos de DNA com sondas biotiniladas de sequência repetitiva e *motif* tetranucleotídico e (4) recuperação dos híbridos através da utilização de partículas magnéticas cobertas com streptoavidina (*beads* magnéticos).

Clivagem do DNA

Inicialmente, 4 µg de DNA de um único indivíduo foram submetidos a uma reação de digestão utilizando-se as enzimas de restrição *Bst*U I e *Xmn* I (New England Biolabs Inc.), seguindo-se as recomendações do fabricante conforme a reação descrita abaixo:

2,5 µL de Tampão da Ligase 10x NEB
0,25 µL BSA (100x)
0,25 µL NaCl 5M (Concentração final 50mM)
1,0 µL da enzima <i>Bst</i> U I
1,0 µL <i>Xmn</i> I
20,0 µL de DNA genômico (200ng/µL)
25,0 µL Volume final

Em seguida, a reação de digestão foi mantida a 37 °C por 16 horas.

Eluição do DNA clivado

Com o objetivo de isolar os fragmentos com tamanhos entre 300 e 1.000 pb, foi feita uma eletroforese em gel de agarose (0,8 %) usando toda a amostra de DNA digerido e um marcador de peso molecular 1 Kb. Os fragmentos com tamanhos entre 300 e 1.000 pb foram eluídos, utilizando o *kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare), conforme as especificações do fabricante.

Ligação do DNA eluído a oligonucleotídeos dupla-fita

Na etapa seguinte, os fragmentos de DNA obtidos foram ligados, em suas extremidades, a oligonucleotídeos (*linkers*) de fita dupla, denominados por Hamilton et al. (1999) de SNX

forward (5'-CTAAGGCCTTGCTAGCAGAAGC-3') e SNX *reverse* (5'-pGCTTCTGCTAGCAAGGCCTTAGAAAA-3'). A ligação foi efetuada mediante a utilização da enzima T4 DNA ligase (Promega). Tais *linkers* têm a função de disponibilizar sítios de ligação de *primers* para reações de PCR subsequentes.

Para garantir que os oligonucleotídeos estivessem em dupla fita, preparou-se uma reação da seguinte maneira:

100 µL SNX <i>forward</i>
100 µL SNX <i>reverse</i>
4 µL NaCl 5M
204 µL Volume final

A reação foi aquecida a 95° C e resfriada vagarosamente à temperatura ambiente. Em seguida, preparou-se uma reação conforme descrito abaixo:

7,0 µL dos oligonucleotídeos em dupla fita
2,0 µL da enzima T ₄ DNA ligase (Promega)
1,5 µL do tampão da enzima
4,5 µL de H ₂ O Milli-Q

15,0 µL Volume final

Todo o DNA digerido (20 µL) foi adicionado a esta reação, que foi incubada a 16° C *overnight*.

Para certificar-se da eficiência da ligação, foi realizada uma PCR utilizando os fragmentos ligados aos *linkers* obtidos no passo anterior, conforme descrita abaixo:

2,5 µL de tampão de PCR 10x
2,5 µL BSA (250µg/ml) (New England Biolabs)
1,3 µL de SuperSNX-24(10µM)
1,5 µL de dNTPs (2,5mM cada) (Sigma - Aldrich)
2,0 µL MgCl ₂ (25mM)
13,0 µL H ₂ O milli-Q
0,2 µL de <i>Taq</i> (5U/µL) (Fermentas)
2,0 µL dos fragmentos DNA ligados aos <i>linkers</i>

25,0 µL Volume final

A reação foi realizada num termociclador PTC-100 (MJ-Research) programado da seguinte forma: 95 °C por 2 minutos seguidos de 20 ciclos de 95 °C por 20 segundos, 60 °C por 20 segundos, 72 °C por 1,5 minutos. Ao término dos 20 ciclos, a reação foi mantida a 15 °C.

Em seguida, foi feita uma eletroforese em gel de agarose 1,0 % utilizando 5 µL do produto de PCR e um marcador de peso molecular 1 Kb como padrão.

Ligação dos fragmentos de DNA às sondas biotiniladas

Os fragmentos de DNA foram hibridizados a um conjunto de oito sondas biotiniladas de sequências repetitivas para microssatélites tetranucleotídeos. São elas: (AAAC)₆, (AAAG)₆, (AATC)₆, (AATG)₆, (ACCT)₆, (ACAG)₆, (ACTC)₆, (ACTG)₆.

Para tal, foi montada a seguinte reação:

25 µL solução de hibridização (12x SSC, 0,2 % SDS)
5 µL de sondas biotiniladas (10 µM de cada uma delas)
10 µL DNA ligado ao <i>linker</i>
10 µL H ₂ O milli-Q
50 µL Volume final

Essa reação foi realizada em um termociclador *Applied Biosystems Veriti™ 96 Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems Inc.) programado para uma desnaturação inicial de 5 min a 95 °C, seguido de uma rápida queda de temperatura para 70 °C, e reduções de 0,2 °C a cada 5 segundos por 99 vezes, atingindo 50,2 °C. Em seguida, a reação permaneceu a 50° C por 10 minutos, sendo posteriormente a temperatura

reduzida em 0,5 °C a cada 5 segundos até atingir 40° C por 20 vezes e, finalmente 15° C *overnight*.

Captura dos fragmentos de DNA hibridizados com as sondas biotiniladas

A captura dos fragmentos de DNA hibridizados com os oligonucleotídeos repetitivos foi realizada utilizando-se o kit *Streptavidin Magnesphere Paramagnetic Particules* (Promega) conforme as especificações do fabricante.

Enriquecimento dos fragmentos de DNA por PCR

Foi realizada uma PCR, utilizando-se, como *primer*, oligonucleotídeos não fosfatados com sequências complementares às dos *linkers*, com o intuito de aumentar o número de fragmentos de DNA. Para isso, foi preparada a seguinte reação:

5 µL de tampão de amplificação 10x
5 µL de BSA
3 µL de dNTPs (2,5mM cada) (Sigma - Aldrich)
2,5 µL de SuperSNX-24 (10µM)
4 µL de MgCl ₂ (25mM)
25,2 µL de H ₂ O
0,3 µL de <i>Taq</i> (5U/ µL) (Fermentas)
5 µL de DNA enriquecido
50 µL Volume final

A reação foi realizada em um termociclador PTC-100 (MJ-Research) programado com as seguintes etapas: desnaturação inicial de 95 °C por 2 minutos, seguida de 25 ciclos de 95 °C por 20 segundos, 60 °C por 20 segundos e 72 °C por 1,5 minutos. Extensão final de 72 °C por 30 minutos.

Para verificar a eficiência da PCR, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1,5 % usando um marcador de peso molecular 1 Kb.

Clonagem do DNA enriquecido

O produto de PCR da amostra de DNA enriquecido foi clonado utilizando-se o os reagentes do *CloneJET PCR Cloning Kit* (Fermentas), conforme as especificações do fabricante. Posteriormente, bactérias *E. coli* foram transformadas por choque térmico para introdução dos plasmídios e então cultivadas em placas com meio CG 4% (QBIO-GENE, Canada)/ Agar 1,5% para crescimento *overnight* a 37 °C. Após o crescimento em meio sólido, algumas colônias foram transferidas, com o auxílio de palitos, para placas do tipo *megatiter* (96 poços) contendo meio líquido (CG + ampicilina) e incubadas a 37 °C por 22 horas com agitação de 200 rpm.

Mini-preparação

A extração do DNA plasmidial foi realizada seguindo o protocolo de mini-preparação em placa de 96 poços. As colônias foram precipitadas no fundo das placas por centrifugação a 4000 rpm por 6 minutos e então o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foram adicionados 240 µL de GTE (glucose 20 %, EDTA 0,5 M, Tris-HCl 1 M) em cada poço e a placa foi levada ao agitador para re-suspender as

células. As colônias foram então precipitadas por centrifugação a 4000 rpm por 6 minutos e descartou-se o sobrenadante.

Novamente foram adicionados 80 μ L de GTE e as células foram re-suspensas em agitador. Em placas de fundo "U" adicionou-se 5 μ L de RNase (10 mg/mL) em cada poço, juntamente com 60 μ L das células re-suspendidas e 60 μ L de NaOH 4 M/ SDS 10 %. As placas foram homogeneizadas por inversão e deixadas por 10 minutos à temperatura ambiente. Passado esse tempo, foram adicionados 60 μ L de KOAc 3 M gelado e novamente as placas foram deixadas durante 10 minutos a temperatura ambiente. Na etapa seguinte as placas foram deixadas a 90 °C por 30 minutos e transferidas para o gelo onde permaneceram por 10 minutos. Após choque térmico a 90 °C e uma centrifugação de 10 minutos, o sobrenadante foi transferido para a placa-filtro e centrifugado a 4000 rpm por 6 minutos. Em seguida, foram adicionados 110 μ L de isopropanol gelado ao filtrado, a mistura foi homogeneizada e centrifugada a 4000 rpm por 45 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionaram-se 200 μ L de etanol 70 % ao precipitado. As placas foram centrifugadas por 10 minutos e o sobrenadante foi novamente descartado. Posteriormente as placas foram deixadas em uma estufa a 50 °C por 10 minutos para secar. O DNA foi eluído da placa-filtro com 30 μ L de Tampão TE.

Reação de Sequenciamento

Um total de 384 mini-preparações foi obtido e cada uma delas foi quantificada com um espectrofotômetro Nanodrop 2000 (*ThermoScientific*) e, posteriormente, sequenciadas. Para a reação de seqüenciamento, foi utilizado o *kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems)* conforme as especificações do fabricante, sendo a reação preparada da seguinte maneira:

4,0 de DNA purificado (200 ng/μL)
3,2 pmol do <i>primer</i> pJET 1.2 <i>forward</i> (Fermentas)
2,5 μL de Big Dye 3.1
0,68 μL de água milli-Q autoclavada
2,5 μL de tampão "save-money"*

10,0 μL de volume final

* 200 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂

A reação de sequenciamento foi realizada num termociclador PTC-100 (MJ-Research) com o seguinte programa: desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos seguido de 28 ciclos de 96 °C por 45 segundos, 50 °C por 30 segundos e 60 °C por 4 minutos.

Em seguida, a reação de sequenciamento foi purificada pelo método de precipitação Etanol/ EDTA/ Acetato de Sódio e aplicadas em um sequenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems Inc.).

Caracterização dos Microssatélites e Construção dos *Primers*

A busca pelos microssatélites foi realizada por meio do programa CID (FREITAS et al ., 2008), (<http://www.shrimp.ufscar.br/cid/index.php>). As sequências contendo microssatélites foram então editadas, com o auxílio do programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (HALL, 1999), e tiveram as sequências dos plasmídeos e dos *linkers* removidos. Em seguida, *primers* para as regiões flangeadoras foram

desenhados com o auxílio do programa *Generunner 3.01* (www.generunner.net). Ao final 5' dos *primers forward* de cada par foi acrescentada uma sequência de 18 pares de bases complementar à sequência universal M13, permitindo a aplicação de um procedimento que utiliza três *primers* para a incorporação da marca fluorescente ao fragmento amplificado (SCHUELKE, 2000), possibilitando a genotipagem em sequenciador automático. Após um conjunto de ciclos para amplificação do fragmento contendo a região SSR (desnaturação inicial de 95 °C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 44-56 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos) um segundo conjunto de ciclos (12 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 53 °C por 45 segundos, 72 °C por 45 segundos e extensão final de 72 °C por 20 minutos) era aplicado à mesma mistura reacional para a incorporação do fluoróforo.

Para a caracterização dos locos de microssatélites prospectados, foram utilizados 36 indivíduos de uma mesma linhagem do Estado de São Paulo. As reações de PCR foram padronizadas para cada loco variando as concentrações de cada componente da reação e também as condições do ciclo, em especial a temperatura de anelamento. Com as concentrações iniciais de 0,66x Taq buffer, 1,5 mM de MgCl₂, 125 µM de dNTP (Sigma - Aldrich, 2 pmol de *primer forward*, 8 pmol de *primer reverse*, 8 pmol de *primer* M13 contendo uma marca de fluorescência (FAM ou NED), 1U de taq DNA polimerase (Fermentas), foram testadas as temperaturas de anelamento variando de 42 a 52 °C e concentração de DNA a 25, 50 e 100 ng. Os locos que não apresentaram um padrão de amplificação satisfatório foram submetidos a outro teste variando a concentração de MgCl₂. A genotipagem dos indivíduos foi realizada em um sequenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems Inc.), no Laboratório de Evolução Molecular da UNESP - Rio Claro.

Análise Estatística

Testes para verificar o desequilíbrio de Hardy-Weinberg e desequilíbrio de ligação foram realizados utilizando o programa Genepop *version* 4.0.10 (RAYMOND; ROUSSET, 1995; ROUSSET, 2008). Valores de significância foram obtidos pelo método de cadeia de Markov (10.000 como número *dememorization*, 1.000 *batches*; 10.000 iterações por *batch*). A correção de Bonferroni (RICE, 1989) foi utilizada para o ajuste dos valores de significância para as comparações múltiplas. A presença de alelos nulos para cada loco foi verificada utilizando o *software* Micro-Checker (VAN OOSTERHOUT et al. 2004).

Análises de estruturação populacional

Estimativas de diversidade genética (número de alelos, H_o , H_e) foram feitas por meio do programa Genepop *version* 4.0.10 (RAYMOND; ROUSSET, 1995). Através do *software* FSTAT (GOUDET, 1995) foram obtidos os valores de riqueza alélica e foi analisada a diferenciação genética entre as linhagens, por meio do teste F_{ST} .

A análise de estrutura populacional foi realizada por um método Bayesiano implementado do *software* Structure v. 2.3.3 (PRITCHARD et al., 2000) adotando o modelo de mistura e frequências alélicas correlacionais (*burnin*: 200000 e MCMC: 500000). Foram testados os valores de K de 1 a 5 populações e, para cada K, foram realizadas 10 corridas. A escolha do modelo mais provável foi realizada de acordo com Evanno et al. (2005) utilizando-se o *Structure Harvester* (EARL et al., 2011).

Resultados e Discussão

Prospecção e caracterização dos marcadores microsatélites

Um total de 384 colônias recombinantes foi selecionado para sequenciamento. As sequências obtidas foram submetidas à análise do programa CID que demonstrou que das 384 amostras de mini-preparações sequenciadas apenas 30 (7,82 %), de fato, apresentaram regiões de microsatélites. Em seguida as sequências contendo SSRs foram alinhadas usando a ferramenta Multialin (CORPET, 1998) disponível na internet (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) para verificar a presença de fragmentos idênticos. Não foram encontrados fragmentos idênticos, portanto não houve redundância. Foi possível a confecção de *primers* para 23 (76,7 %) destes microsatélites, pois, em muitos casos, não havia sequência flanqueadora suficiente para o desenho dos oligonucleotídeos (Tabela 2).

Tabela 2: Lista dos 23 locos de microssatélites isolados de *Atta laevigata*.

Nome do inserto	Loco	SSR
20	Alae 1	(TGAG) ₁₂ (GA) ₁₆
66	Alae 2	(TC) ₁ (TCC) ₂ (TC) ₉ TT(TC) ₄
76	Alae 3	(CA) ₂₅ TA(CA) ₂₁ T(CA) ₃
M1-64	Alae 5	(TAA) ₅
M1-78F	Alae 6	(GA) ₃ AA(GA) ₁₅
M1-84F	Alae 7	(TAA) ₆
M1-85F	Alae 8	(GCA) ₅
M2-12F	Alae 9	(CT)T(CT) ₂₃
M2-32	Alae 10	(GA) ₁₉ CA(GA)
M2-39	Alae 11	(GA)2AAAAA(GA)GGGCAAA(GA) ₁₅
M2-45	Alae 13	(TG) ₈
M2-43	Alae 14	(TC) ₁₉ TT(TC) ₄ (TATC) ₈ TACC(TATC) ₂ TCTTTCTCTATT(TATC) ₃
M2-70F	Alae 15	(TC) ₆
M2-84	Alae 16	(TC) ₃ TG(TC) ₃ TG(TC) ₁₃ TG(TC) ₃ TT(TC) ₇
M2-85	Alae 17	(CA) ₂ TA(CA) ₂ TA(CA) ₈ (TA) ₇
M2-89F	Alae 18	(TG) ₁₁
M3-6	Alae 19	(CAAA) ₅
M3-79	Alae 20	(CT) ₂₄ TT(CT) ₆ TTCT(GT) ₂ (CT) ₂ TT(CT) ₂
M3-82	Alae 21	CTC(CT) ₆ TT(CT) ₁₀
M4-32	Alae 22	(TAGG) ₅ TTGG(TAGG) ₂
M4-35	Alae 23	(GA) ₂₅ (CAGA) ₉ CGGA(CAGA) ₁₅ TAGA(CAGA) ₃
M4-42F	Alae 24	(CT) ₂₀
M4-63	Alae 25	(TAGAA) ₆

O programa CID identificou nessas 23 sequências um total de 28 locos microssatélites, sendo 18 dinucleotídeos, 4 trinucleotídeos, 5 tetranucleotídeos e 1 pentanucleotídeo, sendo 5 sequencias compostas e 18 simples . Apesar de microssatélites mononucleotídeos terem sido encontrados, estes, no entanto, não foram utilizados. Os *primers* foram utilizados para a genotipagem em 32 indivíduos da região Sudeste pertencentes à linhagem mitocondrial 2, que demonstrou que oito locos foram polimórficos e apresentaram características satisfatórias, como alto grau de polimorfismo e alta reprodutibilidade.

Dois a dezesseis alelos por loco (média de 9,1 alelos / loco) foram detectados, a heterozigosidade esperada variou de 0,07 a 0,94 (média de 0,73) e a heterozigosidade observada variou de 0,07 a 0,96 (média de 0,65) (Tabela 3). Apenas o loco Alae18 apresentou desvio significativo do equilibrio de Hardy-Weinberg após a correção de Bonferroni (Tabela 3), apresentando déficit de heterozigotos provavelmente devido à presença de alelos nulos conforme detectado pela análise no *software Micro-Checker*. Nenhum loco apresentou desequilíbrio de ligação significativo ($P < 0,0079$, após correção de Bonferroni).

Tabela 3: Caracterização de oito locos microssatélites isolados de *Atta laevigata*. Número de indivíduos (N), número de alelos (n_a), heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e), valores de P para o teste de *Hardy-Weinberg* (HW-p) com base em uma amostra de 36 indivíduos da região Sudeste pertencentes à linhagem mitocondrial 2.

Loco	<i>Motif</i>	N	n_a	Amplitude (bp)	H_o	H_e	HW -p
Alae2	(TC) ₁ (TCC) ₂ (TC) ₉ tt(TC) ₄	25	8	82-98	0,96	0,81	0,4242
Alae5	(TAA) ₅	27	2	128-137	0,07	0,07	1,0000
Alae9	(CT)t(CT) ₁₀	24	11	124-168	0,96	0,88	0,8732
Alae10	(GA) ₁₉ ca(GA)	27	9	110-130	0,78	0,84	0,0745
Alae11	(GA) ₁₅	26	10	100-128	0,58	0,65	0,3458
Alae16	(TC) ₃ tg(TC) ₃ tg(TC) ₁₃ tg(TC) ₃ tt(TC) ₇	27	7	188-212	0,78	0,74	0,0145
Alae18	(TG) ₁₁	22	16	144-188	0,32	0,94	0,0000*
Alae24	(CT) ₂₀	25	10	169-191	0,72	0,87	0,1904

* $p < 0,00635$, seguindo a correção de Bonferroni

Análises de estruturação populacional

Entre os oito locos microssatélites identificados o loco Alae18 apresentou desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg e déficit de heterozigotos e, portanto, não foi considerado para a análise da estrutura populacional.

A análise da estrutura populacional realizada pelo *software Strucutre* baseada em dados moleculares de sete locos microssatélites apontou como mais provável o número de três *clusters* para os 68 indivíduos de *Atta laevigata* (36 da linhagem mitocondrial 1 e 32 da linhagem mitocondrial 2) utilizados na análise (Tabela 4), esse resultado foi corroborado pela escolha do maior delta K encontrado (delta K = 23,54) para os indivíduos amostrados de acordo com o método proposto por Evanno et al. (2005) (Figura 3).

Tabela 4: Valores de $\ln \Pr(X|K)$ para cada um dos possíveis modelos populacionais testados ($K=1, 2, 3, 4$ e 5) pelo *software Structure*.

K	$\ln \Pr(X K)$
1	-1.689,0
2	-1.522,4
3	-1.443,5
4	-1.477,4
5	-1.485,7

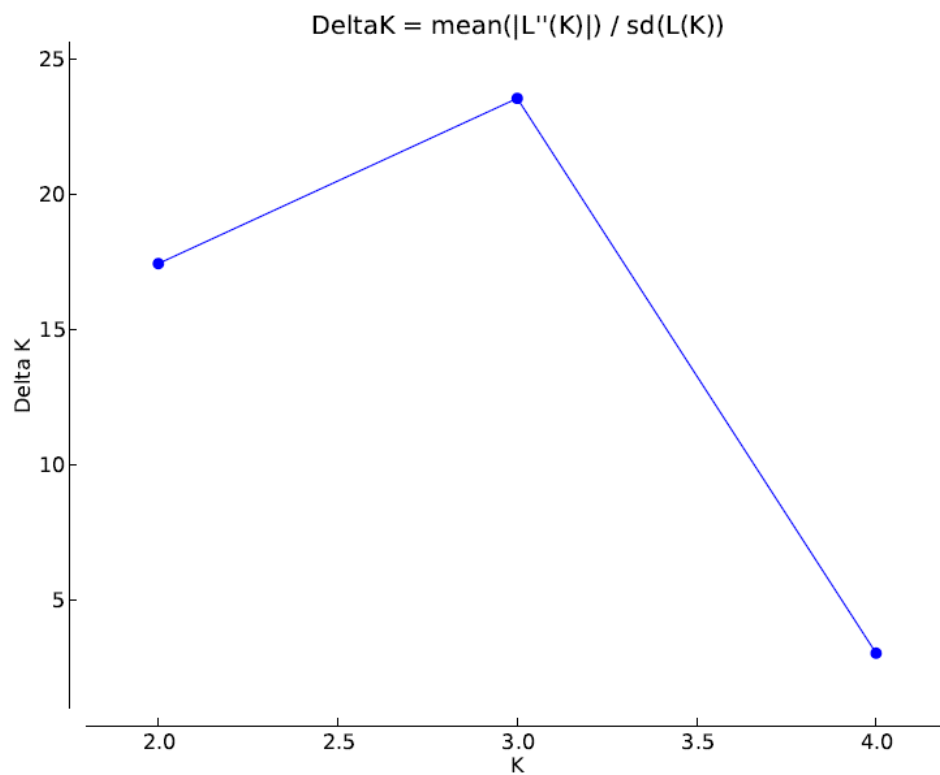


Figura 3: Valores de ΔK (K) obtido a partir da análise no *software Structure*, com aplicação do modelo proposto por Evanno *et al.* (2005).

Os resultados da análise da estrutura populacional para os números de *clusters* (K), de 2 a 5, encontram-se representado na figura 4.

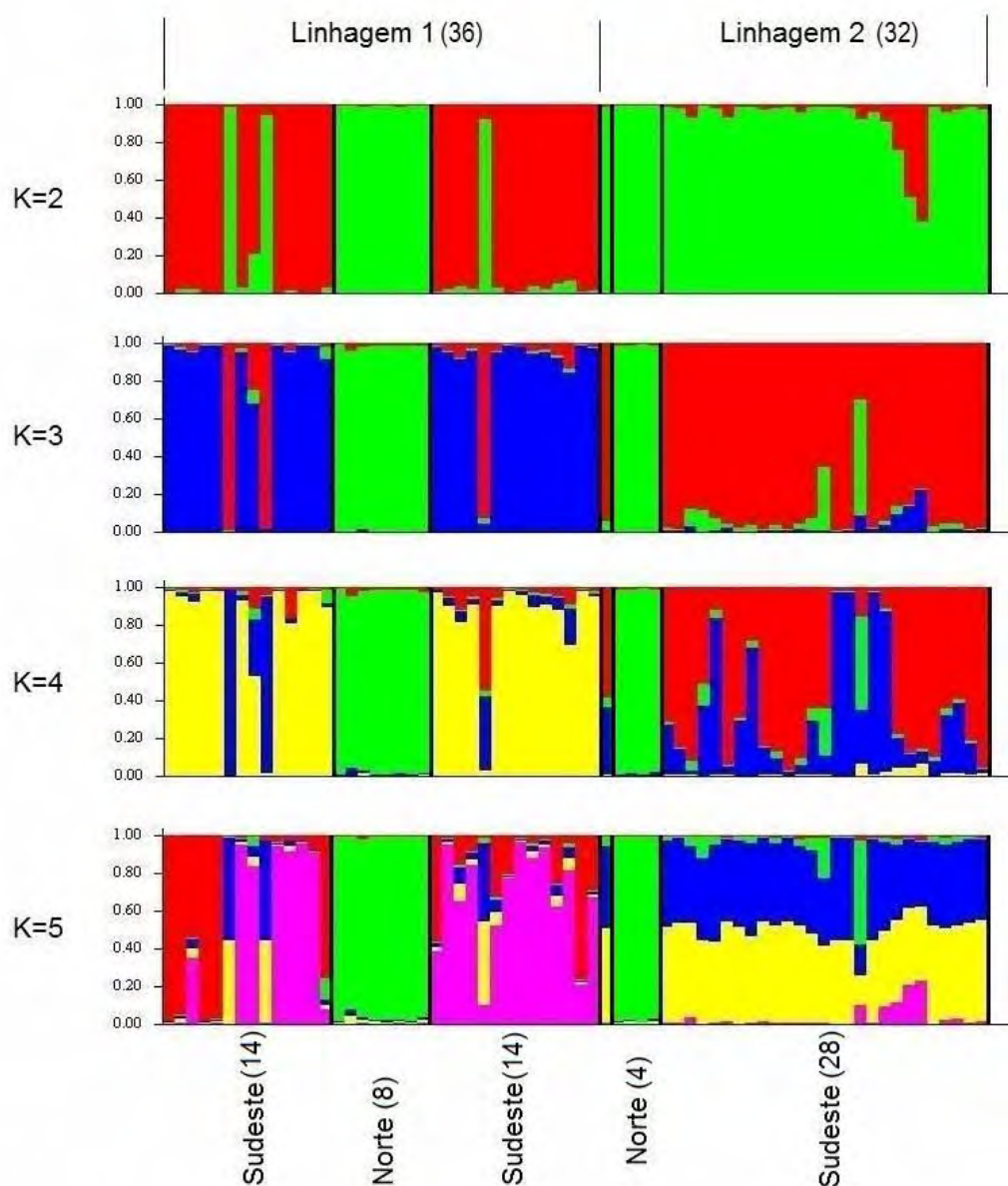


Figura 4: Análise da estrutura populacional para os 68 indivíduos das duas linhagens mitocondriais pertencentes às regiões Sudeste e Norte. O número de *clusters* pré-definidos (K) está indicado a esquerda de cada gráfico. Cada cor representa um *cluster* e cada indivíduo está representado por uma barra vertical dividindo em componentes coloridos proporcionais a fração do seu genótipo que é atribuída a cada um dos *clusters* pré-definidos. Para K=3, que representa o modelo mais provável (tabela 3), os *clusters* L1, L2 e LN correspondem às cores azul, vermelho e verde, respectivamente. Entre parenteses está indicado o número de indivíduos.

Os resultados da figura 4 mostram no eixo y um coeficiente de afiliação ou participação de cada indivíduo em relação a um determinado cluster. Para alguns casos, a análise resultou em 100% de probabilidade em classificar os indivíduos em um determinado *cluster*. No entanto, para outros, houve menos de 100%, indicando incerteza na classificação, que pode ser causada pela existência de híbridos ou alelos ancestrais compartilhados entre indivíduos pertencentes a dois *clusters* distintos. Para K=2, um *cluster* (vermelho) abrigou a maioria dos indivíduos do Sudeste na linhagem mitocondrial 1; o outro *cluster* (verde) abrigou 3 indivíduos do Sudeste na linhagem mitocondrial 1, os indivíduos do Sudeste na linhagem mitocondrial 2 e os indivíduos do Norte nas linhagens mitocondriais 1 e 2. Para K=3, ocorreu a junção dos indivíduos do Norte de ambas as linhagens mitocondriais em um terceiro *cluster* (verde). No Sudeste, as linhagens mitocondriais foram separadas em dois *clusters* (azul =linhagem 1 e vermelho = linhagem 2). Para K=4, ocorreu a subdivisão dos indivíduos do Sudeste da linhagem mitocondrial 2 em dois clusters distintos. Para K=5, há grande perda de resolução na análise, que passa a discriminar com probabilidade acima de 90% somente os indivíduos do Norte (nas linhagens mitocondriais 1 e 2) e alguns indivíduos do Sudeste na linhagem mitocondrial 2.

Todos os valores de K testados reuniram os 12 indivíduos do Norte em um mesmo *cluster*. Como este conjunto contém oito indivíduos da linhagem mitocondrial 1 e quatro indivíduos da linhagem mitocondrial 2, concluímos que há fluxo gênico entre as linhagens mitocondriais na região Norte. Já na região Sudeste, todos os valores de K testados separaram em *clusters* distintos os 56 indivíduos de linhagens mitocondriais distintas, ou seja, houve congruência entre os marcadores mitocondriais e os marcadores microsatélites, exceto para três desses indivíduos na linhagem mitocondrial 1 e um indivíduo da linhagem mitocondrial 2 (Figuras 4 e 5).

Portanto, parece que o fluxo gênico é extremamente raro entre as linhagens mitocondriais na região Sudeste.

Três dos indivíduos que registram sinais de fluxo gênico na região Sudeste foram 26N10 (=N10BA) de Bauru, GV150805-06 e GV150805-17 de Botucatu (Tabela 1 e Figura 5). Eles pertencem à linhagem mitocondrial 1 e ao *cluster* de microssatélites L2, ou seja, são híbridos. Os híbridos podem ser o resultado da fecundação recente de fêmeas da linhagem mitocondrial 1 por machos da linhagem mitocondrial 2 que vivem em simpatria no Sudeste. Tal fecundação pode explicar a presença, nesses híbridos, de quatro alelos de microssatélites que são exclusivos de L2 e que levaram a alta probabilidade, acima de 0,9, na afiliação desses híbridos ao *cluster* L2 (Tabelas 5 e 6)

Tabela 5: Resultado da genotipagem de alguns indivíduos utilizando o *primer* Alae 16, as linhas em azul e vermelho representam os *clusters* L1 e L2, respectivamente. As linhas em amarelo representam os indivíduos híbridos. As marcações em negrito representam os alelos exclusivos do *cluster* L2 presentes nos híbridos.

Código	Alelos											
	206	210	212	214	216	218	220	222	224	226	228	230
GV150805-06			X		X							
GV150805-11							X	X				
GV150805-13						X	X					
GV150805-17		X			X							
GV150805-18							X					
GV150805-19							X					
GV150805-20							X					
GV150805-21							X					
26N10						X				X		
MB160306-24					X			X				
MB160306-29									X	X		
MB160306-31								X			X	
MB160306-42						X		X				
MB160306-43									X		X	
MB160306-44									X			
MB160306-45							X		X			
MB160306-46									X	X		
MB160306-47									X			
MB160306-33				X						X		
MB160306-21		X						X				
N13												
29N13					X				X			
13N15						X		X				
14N16							X			X		
15N17							X		X			

Tabela 6: Resultado da genotipagem de alguns indivíduos utilizando o *primer* Alae 24. As linhas em azul e vermelho representam os *clusters* L1 e L2, respectivamente. As linhas em amarelo representam os indivíduos híbridos. A marcação em negrito representa o alelo exclusivo do *cluster* L2 presente no híbrido.

Código	Alelos											
	187	189	191	193	195	197	199	201	203	207	209	211
GV150805-01			X	X								
GV150805-02												
GV150805-03			X									
GV150805-04			X	X								
GV150805-06	X											
GV150805-11					X	X						
GV150805-13						X		X				
GV150805-17			X	X								
MB160306-31	X		X									
MB160306-42					X			X				
MB160306-43			X									
MB160306-44												
MB160306-45											X	X
MB160306-46												
MB160306-47		X	X									
MB160306-40	X											
MB160306-33	X											
MB160306-21	X											
N13		X			X							
29N13												
13N15												
14N16		X		X								

O quarto indivíduo onde pode ter ocorrido fluxo gênico é o MB160306-01, de Itirapina, com genoma mitocondrial na linhagem 2, mas o genótipo de microssatélites no cluster LN. Algumas características indicam que a origem deste híbrido não pode ser explicada da mesma forma outros três anteriores. Primeiro, a probabilidade de MB160306-01 pertencer ao cluster LN é 0,6, ou seja, não é tão alta quanto a probabilidade 0,9 dos demais híbridos, e há ainda uma probabilidade de 0,35 de MB160306-01 pertencer ao cluster L2. Segundo, este indivíduo não

apresentou alelos exclusivos de LN. E, por último, uma vez que LN é amazônica, é difícil acreditar que tenha havido uma fecundação recente de uma fêmea da linhagem mitocondrial 2 do Sudeste por um macho da Amazônia.

O agrupamento de LN e L2 para $K=2$ (figura 4) mostra os indivíduos de LN muito proximamente relacionados aos indivíduos de L2, com vários alelos compartilhados por estes dois clusters, diferentemente de L1, que se mostra um cluster mais distanciado dos demais. Assim, a divergência entre os clusters LN e L2 é mais recente, sendo provável que o híbrido de Itirapina resulte de eventos ancestrais anteriores à cladogênese dos clusters LN e L2.

A presença de três híbridos recentes em 56 indivíduos analisados na região Sudeste pode ser o resultado do encontro das duas matrilineagens nessa região, que iniciaram recentemente o processo de fluxo gênico. Ou pode ser o resultado da baixa eficiência de cruzamento entre linhagens mitocondriais em fase final de completar o processo de monofilia recíproca levando à especiação.

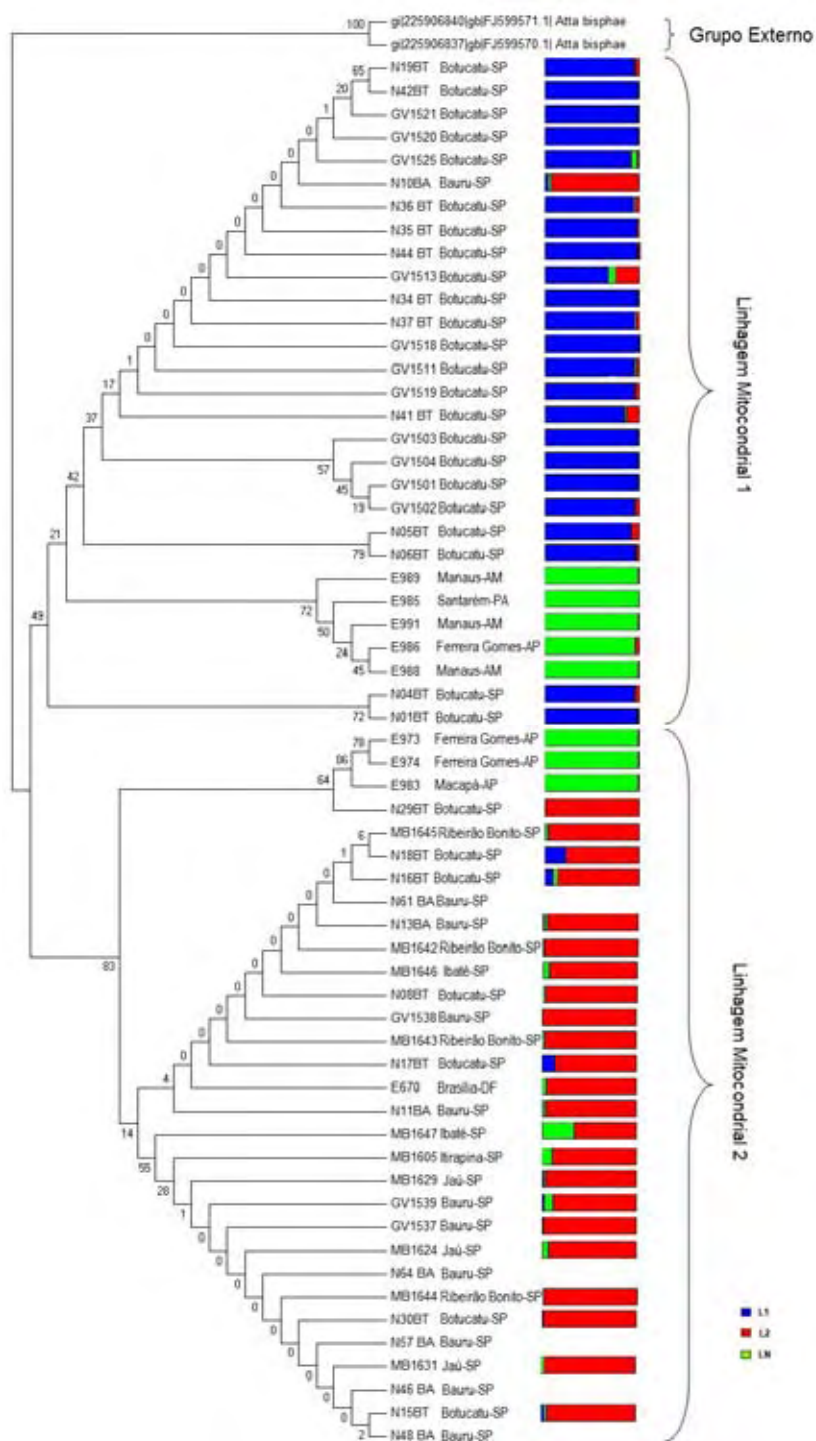


Figura 5: Árvore filogenética preparada com o uso do programa MEGA 3.1, obtidas a partir dos loci COI, IGS, Leu tRNA e COII de 60 espécimes de *Atta laevigata* e dois de *Atta bisphaera* (grupo externo), obtido pelo método NJ. As barras horizontais correspondem ao coeficiente de afiliação ou participação de cada indivíduo em relação aos *clusters* L1 (azul), L2(vermelho) e LN (verde).

Os resultados obtidos indicam que *Atta laevigata* pode estar sofrendo um processo de especiação. Essa especiação ocorre por isolamento reprodutivo de duas linhagens da formiga, caracterizadas por marcadores mitocondriais. A hipótese de isolamento na região Sudeste pode ser atribuída ao baixo fluxo gênico entre as linhagens, determinado pelos marcadores microssatélites, que são codominantes, mas não na região Norte, onde indivíduos de linhagens mitocondriais distintas mantêm entre si um alto o fluxo gênico.

Os três *clusters* resultantes do modelo populacional com $K=3$, correspondentes às cores azul, vermelho e verde na figura 6, foram denominados respectivamente de L1, L2 e LN. Esses *clusters* foram utilizados para representar, respectivamente, os indivíduos da região Sudeste da linhagem mitocondrial 1, os indivíduos da região Sudeste da linhagem mitocondrial 2 e os indivíduos da região Norte nas linhagens 1 e 2 (Figura 6).



Figura 6: Mapa com os pontos de coleta dos 68 indivíduos de *Atta laevigata*, os pontos em azul, vermelho e verde correspondem aos *clusters* L1, L2 e LN respectivamente.

Os indivíduos foram submetidos aos testes de estatística F e os valores de F_{ST} obtidos pelo *software* Fstat 2.9.3.2 se mostraram significativos (Tabela 7), corroborando a separação dos três *clusters*.

Tabela 7: Valores estimados de F_{ST} para os pares de *clusters* formado pelos indivíduos da linhagem mitocondrial 1 da região Sudeste (L1) (33 indivíduos), linhagem mitocondriais 2 da região Sudeste (L2) (35 indivíduos) e das linhagens mitocondriais 1 e 2 da região Norte (LN) (14 indivíduos).

F_{ST} entre os <i>Clusters</i>	
L1xL2	0,14 (P = 0,02)
L1xLN	0,24 (P = 0,02)
L2xLN	0,13 (P = 0,02)

No total foram encontrados 90 alelos diferentes nos três *clusters* para os locos analisados, obtendo em média 8,14 alelos para L1, 9,43 alelos para L2 e 5,00 alelos para LN (Tabela 8).

Os valores de heterozigosidade observada (H_o) variaram de 0,27 a 0,81 (L1), 0,11 a 0,93 (L2) e 0,42 a 0,67 (LN). Os valores de heterozigosidade esperada (H_e) variaram de 0,35 a 0,91 (L1), 0,17 a 0,89 (L2) e 0,36 a 0,77 (LN) (Tabela 6).

Os testes de Kruskal-Wallis realizado no *software* BIOESTAT 2.0 para os valores de riqueza alélica, heterozigosidade observada e esperada não apontaram diferença significativa entre os *clusters* L1, L2 e LN ($H=4,74$, $p=0,09$ para riqueza alélica; $H=3,07$, $p=0,22$ para heterozigosidade observada e $H=4,33$, $p=0,11$ para heterozigosidade esperada).

Tabela 8: Número de indivíduos (N), número de Alelos (NA), valores de riqueza alélica, heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) para os *locos* polimórficos isolados de *Atta laevigata*, em amostras das linhagens mitocondriais um (L1) e dois (L2) e para a linhagem da região Norte (LN).

Loco	N			NA			Riqueza alélica			H_o			H_e		
	L1	L2	LN	L1	L2	LN	L1	L2	LN	L1	L2	LN	L1	L2	LN
Alae 2	27	29	12	9	8	3	6,7	7,13	3	0,81	0,86	0,58	0,79	0,83	0,63
Alae 5	28	28	12	5	3	2	4,11	2,33	3	0,43	0,11	0,42	0,69	0,17	0,36
Alae 9	20	28	13	15	12	7	11,46	9,1	6,77	0,48	0,93	0,54	0,91	0,86	0,77
Alae 10	26	26	12	7	11	8	6,02	8,95	8	0,81	0,88	0,58	0,79	0,88	0,75
Alae 11	21	32	13	7	12	3	5,78	8,4	3	0,71	0,56	0,54	0,73	0,76	0,56
Alae16	26	26	12	7	10	5	4,49	7,82	5	0,27	0,85	0,67	0,35	0,79	0,76
Alae24	21	27	12	7	10	6	6,73	8,72	6	0,73	0,67	0,67	0,84	0,89	0,76
Média	24,14	28,00	12,29	8,14	9,43	5	6,47	7,49	4,97	0,61	0,69	0,57	0,73	0,74	0,66

Embora os valores de riqueza alélica, heterozigosidade observada e esperada não apresentaram diferença significativa entre os *clusters* analisados, indicando níveis similares de diversidade genética entre as linhagens, os resultados do *software Structure* v. 2.3.3 e os valores de F_{ST} obtidos pelo *software Fstat* 2.9.3.2 apontam para a existência de três *clusters* distintos dentro de *Atta laevigata*.

Vinha (2007), em seu trabalho de mestrado, evidenciou a existência de dois grupos gênicos entre populações de *Atta laevigata*, sustentadas por quatro marcadores mitocondriais e três marcadores nucleares. No entanto, no presente trabalho, conseguimos evidenciar a existência de um terceiro grupo gênico constituído pelos indivíduos da região Norte. Esse resultado indica que, embora na região Norte ocorra as duas linhagens mitocondriais, essas duas linhagens não se encontram isoladas reprodutivamente e o fluxo gênico entre essas linhagens é suficiente para torná-las geneticamente homogêneas com relação aos marcadores microssatélites. Na região Sudeste as duas linhagens mitocondriais são representadas por dois grupos gênicos distintos, o que indica que o fluxo gênico entre eles parece não ser suficiente para torná-los geneticamente homogêneos e que estes grupos podem estar isolados reprodutivamente, já que são simpátricos e não existe qualquer barreira física aparente ao fluxo gênico. Os três indivíduos pertencentes à linhagem mitocondrial 1 classificada como pertencendo ao *cluster* L2 podem sugerir a existência de um limitado fluxo gênico ou pode ser resultado de uma hibridização. Esses resultados sugerem que as linhagens mitocondriais 1 e 2 na região Sudeste estão sofrendo um processo de especiação.

Portanto, há evidências significativas da existência de três grupos gênicos entre populações de *Atta laevigata*, sustentadas por sete marcadores microssatélites.

Rabeling et al. (2011) estudou a formiga cultivadora de fungo *Mycocepurus smithii*, que até então pensava-se ser uma espécie obrigatoriamente assexuada, e

descobriu na Amazônia populações de *M. smithii* que se reproduzem sexuadamente. Rabeling et al. (2011) constataram que na região amazônica, centro da distribuição geográfica de *M. smithii*, ocorre simpatria de populações sexuadas e assexuadas e provavelmente fora do seu centro de distribuição as populações assexuadas apresentam um desempenho maior, pois as rainhas partenogéticas aparentemente dispersam mais rapidamente na ausência de machos colonizando os nichos distantes. Os nossos resultados reforçam ainda mais a descoberta de Rabeling e colaboradores, pois sugerem que a continuidade da região amazônica (Norte) possivelmente favoreça dispersão e homogeneização gênica em contraste com outras regiões, como a região Sudeste, que podem estimular o isolamento reprodutivo, seguido de especiação.

Conclusão

1. O presente trabalho caracterizou sete locos microssatélites polimórficos para *A. laevigata* que foram uma importante ferramenta molecular para o estudo da estrutura populacional dessa formiga. Esses locos microssatélites foram analisados em indivíduos pertencentes a duas linhagens mitocondriais de *A. laevigata*.
2. A análise bayesiana da estrutura genética populacional (*software Structure* v. 2.3.3) e a estatística F (Fstat 2.9.3.2) apontam a existência de ao menos três *clusters* distintos dentro de *Atta laevigata*, aqui denominados L1, L2 e LN. Os valores de riqueza alélica, heterozigosidade observada e esperada não apresentaram diferença significativa entre os *pools* gênicos detectados, indicando níveis similares de diversidade genética entre os clusters.
3. O *cluster* LN é formado por representantes da região Norte de ambas as linhagens mitocondriais, evidenciando a ocorrência de fluxo gênico.
4. Os *clusters* L1 e L2 ocorrem na região Sudeste e são na maioria dos casos congruentes com as linhagens mitocondriais, exceto por três indivíduos, sugerindo que o fluxo gênico é praticamente ausente nessa região, onde *Atta laevigata* pode estar sofrendo um processo de especiação;

Literatura Citada

BACCI, 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, n. 30., 2001, Caxambu, p. 37.

BACCI, M.; SOLOMON, S. E.; MULLER, U. G.; MARTINS, V. G.; CARVALHO, A. O. R., VIEIRA, L. G. E. ; SILVA-PINHATI, A. C. O. Phylogeny of leafcutter ants in the genus *Atta* Fabricius (Formicidae: Attini) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution, [S.I.], v. 51, p. 427-437, 2009.

BERGHOFF, S. M.; KRONAUER, D. J. C.; EDWARDS, K. J.; FRANKS, N. R. Dispersal and population *Structure* of a New World predator, the army ant *Eciton burchellii*. J. Evol. Biol., [S.I.], v. 21, p. 1125-1132, 2008.

BOLTON, B. A new general catalogue of the ants of the world. Massachutes: Harvard University Press, 1995.

BOLTON, B.; ALPERT, G.; WARD, P.; NASKRECKI, P. Bolton's Catalogue of the Ants of the World: 1758-2005. Cambridge: Harvard University Press, MA. 2006.

BORGMEIER, T. Estudos sobre *Atta* (Hymenoptera, Formicidae). Memórias do Instituto Osvaldo Cruz, [S.I.], v. 48, p. 239-263, 1950.

BRUCE, J.; TURNER; DAVID, D.; DUVERNELL; THOMAS, M. B.; MICHAEL, G. B. Reproductive isolation among endemic pupfishes (*Cyprinodon*) on San Salvador Island, Bahamas: microsatellite evidence. Biological Journal of the Linnean Society, [S.I.], v. 95, p. 566-582, 2008.

BROWN, S. M. et al. Multiple methods for the identification of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. Theoretical and Applied Genetics [S.I.], v. 93, p. 190-198, 1996.

BRUFORD, M. W.; WAYNE, R. K. Microsatellites and their application to population genetic studies. Curr. Opin. Genet. Dev., [S.I.], v. 3, p. 939-943, 1993.

CATERINO, M. S.; CHO, S.; SPERLING, F. A. H. The current state of insect molecular systematics: a thriving tower of babel. Annu. Rev. Entomol., [S.I.], v. 45, p. 1-54, 2000.

CHERRETT, J. M. History of the leaf cutting ant problem. In: LOFGREN, C. S.; VANDER MEER, R. K. (ed) Fire ants and leaf cutting ants: biology and management. BOULDER: Westview Press. 1986.

DELABIE, J. H. C. *Atta silvai* Gonçalves sinônimo júnior de *Atta laevigata* (Fred. Smith) (Hymenoptera, Formicidae, Attini). Rev. Bras. de Ent., [S.I.], v. 41, p. 339-341, 1998.

DELLA LUCIA, T. M. C.; FOWLER, H. G.; MOREIRA, D. D. O. As formigas cortadeiras. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 1993.

EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. *STRUCTURE HARVESTER*: a website and program for visualizing *STRUCTURE* output and implementing the Evanno method. Conservation Genetics Resources DOI: 10.1007/s12686-011-9548-7 Version: v0.6.8, 2011.

ELLEGREN H. Microsatellites: Simple sequence with complex evolution. Genetics, [S.I.], v.5, p. 435-445, 2004.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of Individuals using the *software STRUCTURE*: a simulation study. Molecular Ecology, [S.I.], v. 14, p. 2611-2620, 2005.

FERAL, J. P.; How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, [S.I.], v. 268, p. 121-145, 2002.

FJERDINGSTAD, E. J.; BOOMSMA, J. J.; THORÉN, P. Multiple paternity in the leafcutter and *Atta colombica* – a microsatellite DNA study. Heredity, [S.I.], v. 80, p.118–126, 1998.

FJERDINGSTAD, E. J.; BOOMSMA, J. J. Queen mating frequency and relatedness in young *Atta sexdens* colonies. Insectes Soc., [S.I.], v.47, p.354-356, 2000.

FREITAS, P. D.; MARTINS, D. S.; GALETTI JR, P. M. CID (Clipping vectors, Identifying SSR, Design of primers): a rapid and efficient bioinformatics tool for the detection of simple sequence repeats (SSRs) from genomic libraries. Molecular Ecology Resources, [S.I.], v. 8, p. 107-108, 2008.

GONÇALVES, C. R. Contribuição para o conhecimento do gênero *Atta* Fabr., das formigas saúvas. Boletim da Sociedade Brasileira de Agronomia, [S.I.], v. 5, n. 3, p. 333-358, 1942.

GONÇALVES, C. R. O gênero *Acromyrmex* no Brasil (Hymenoptera: Formicidae). Studia Entomologica, [S.I.], v. 4, p. 113-180. 1961.

GONÇALVES, C. R. *Atta silvai*, Nova espécie de formiga saúva (Hymenoptera, Formicidae). Arq. Univ. Fed. Rur. Rio de Janeiro, [S.I.], v. 5, p. 173-178, 1982.

GOUDET, J. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. Journal of Heredity, [S.I.], v. 86, P. 485-486, 1995.

GRIFFITHS, A. J. F.; GELBART, W. M.; MILLER, J. H.; LEWONTIN, R. C. Modern Genetic Analysis. New York: W. H. Freeman & Co, 1999.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser., [S.I.], v. 41, p. 95-98. 1999.

HAMILTON, M. B.; PINCUS, E. L.; DI FIORE, A.; FLEISCHER, R. C. UNIVERSAL LINKER AND LIGATION PROCEDURES FOR CONSTRUCTION OF GENOMIC DNA LIBRARIES ENRICHED FOR MICROSATELLITES. BIOTECHNIQUES, [S.I.], V. 27, P. 500-507, 1999.

HEINZE, J.; STRATZ, M.; PEDERSEN, J.S.; HABERL, M. Microsatellite analysis suggests occasional worker reproduction in the monogynous ant *crematogaster smithi*. Insectes Sociaux, [S.I.], v.47, p. 299-301, 2000.

HELMES CAHAN, S.; KELLER, L. COMPLEX HYBRID ORIGIN OF GENETIC CASTE DETERMINATION IN HARVESTER ANTS. NATURE, [S.I.], V. 424, P. 306-309, 2003.

HENDRY, A. P.; WENBURG, J. K.; BENTZEN, P.; VOLK, E. C.; QUINN, T. P. Rapid evolution of reproductive isolation in the wild: evidence for introduced salmon. Science, [S.I.], v. 290, p. 516-518, 2000.

HILLIS, D. M.; MORITZ, C.; MABLE, B. K.; Molecular Systematics. 2nd. ed. Sunderland: Sinauer, 1996.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. The Ants. Cambridge: Harvard University Press. 1990.

KANNO, M.; SUYAMA, Y.; LI Q.; KIJIMA, A. Microsatellite analysis of Japanese sea cucumber, *Stichopus* (*Apostichopus*) *japonicus*, supports reproductive isolation in color variants. Mar Biotechnol (NY). [S.I.], v. 8, p. 672-685, 2006.

KNIGHT, M. E.; TURNER, G. F.; RICO, C.; VAN OPPEN, M. J. H.; WEWITT, G. M. Microsatellite paternity analysis on captive Lake Malawi cichlids supports reproductive isolation by direct mate choice. Molecular Ecology, [S.I.], v. 7, p. 1605-1610, 1998.

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

O'REILLY, P. T.; WRIGHT, J. M. The evolving technology of DNA fingerprinting and its application to fisheries and aquaculture. Journal of Fish Biology, [S.I.], v. 47, p. 29-55, 1995.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population *Structure* using multilocus genotype data. Genetics, [S.I.], v. 155, p. 945-959, 2000.

RABELING, C.; GONZALES, O.; SCHULTZ, T. R.; BACCI, M.; GARCIA, M. V. B.; VERHAAGH, M.; ISHAK, H. D.; MUELLER, U. G. 2011. Cryptic sexual populations account for genetic diversity and ecological success in a widely distributed, asexual fungus-growing ant. PNAS, DOI/10.1073/pnas.1105467108, 2011.

RACEY, P. A.; BARRATT, E. M.; BURLAND, T. M.; DEAVILLE, R.; GOTELLI, D.; JONES, G.; PIERTNEY, S. B. Microsatellite DNA polymorphisms confirms reproductive isolation and reveals differences in population genetic *Structure* of cryptic *Pipistrellus* bat species. Biological Journal of the Linnean Society, [S.I.], v. 90, p. 539-550, 2007.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

CHAPUISAT, M.; Characterization of microsatellite loci in *Formica lugubris* and their variability in other ant species. Molecular Ecology, [S.I.], v. 5, p. 599-601, 1996.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. Nature biotechnology, [S.I.], V. 18, p. 233-234, 2000.

SCHÖLLÖTTERER, C. Genome evolution: Are microsatellites really simple sequences? Dispatch, [S.I.], V. 8, p. 132-134, 1998.

SCHWANDER, T.; SUNI, S. S.; CAHAN, S. H.; KELLER, L. MECHANISMS OF REPRODUCTIVE ISOLATION BETWEEN AN ANT SPECIES OF HYBRID ORIGIN AND ONE OF ITS PARENTS. EVOLUTION, [S.I.], V. 62-7, P. 1635-1643, 2008.

TAUTZ, D.; RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. Nucleic Acids Research, [S.I.], v. 12, p. 4126-4138, 1984.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. Nucleic Acids Research, [S.I.], v. 17, p. 6364-6471, 1989.

VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W. F.; WILLS, D. P. M.; SHIPLEY, P. microchecker: *software* for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Molecular Ecology Notes, [S.I.], v. 4, p. 535-538, 2004.

VILLESSEN P.; MURAKAMI, T.; SCHULTZ, T. R.; BOOMSMA, J. J. Identifying the transition between single and multiple mating of queens in fungus-growing ants. Proc. R. Soc. Lond. B., [S.I.], v. 269, p.1541-1548, 2002.

VINHA, G. G. SISTEMÁTICA MOLECULAR de *Atta laevigata* (Smith 1858)e *Acromyrmex balzani* (Emery 1890). 2007. 133f. Dissertação (Mestrado)- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

WEBER, N. A. Gardening Ants: the Attines. Phyladelphia American Phylosophical Society, [S.I.], v. 92, p. 1-146, 1972.

WIRTH, R.; HERZ, H.; RYEL, R. J.; BEYSCHLAG, W.; HÖLLDOBLER, B. Herbivory of Leaf- Cutting Ants: A Case Study on *Atta colombica* in the Tropical Rainforest of Panama. Berlin: Springer Verlag, 2003. 230 p.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. Molecular Ecology, [S.I.], v. 11, p. 1-16, 2002.