



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

**SISTEMÁTICA MOLECULAR de *Atta laevigata* (Smith 1858)
e *Acromyrmex balzani* (Emery 1890)**

GIOVANA GONÇALVES VINHA

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).

Junho - 2007

**UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Biociências – Rio Claro**

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

**SISTEMÁTICA MOLECULAR de *Atta laevigata* (Smith 1858)
e *Acromyrmex balzani* (Emery 1890)**

GIOVANA GONÇALVES VINHA

Orientador: Prof. Dr. MAURÍCIO BACCI JÚNIOR

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular).

**Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
Junho de 2007**

595.796 Vinha, Giovana Gonçalves
V784s Sistemática molecular de *Atta laevigata* (Smith 1858) e
Acromyrmex balzani (Emery 1890) / Giovana Gonçalves
Vinha. – Rio Claro : [s.n.], 2007
133 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots., mapas

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Maurício Bacci Júnior

1. Formiga. 2. Marcadores moleculares. 3. Formigas
cortadeiras. 4. Filogenia. I. Título.

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

“Os nervos que nunca enfraquecem,

A vista que nunca se cansa e

O pensamento que nunca se perde,

São os elementos que conduzem à vitória!”

Buerg

**PELA FORMAÇÃO INTELECTUAL, MORAL E ESPIRITUAL...
AOS MEUS PAIS, VANIA E JOSÉ LUIZ,
DEDICO ESTE TRABALHO.**

**ÀS MINHAS QUERIDAS IRMÃS, ANA LUIZA, VIVIAN E JULIANA,
PELA AMIZADE, ALEGRIA E UNIÃO...**

**AO MEU AMOR, EDUARDO, SEMPRE E PARA SEMPRE
PRESENTE...**

AGRADECIMENTOS

Mais uma fase completa, mais desafios e conquistas e muito mais a agradecer:

Ao Prof. Dr. Maurício Bacci Júnior, pela orientação, aprendizado, oportunidade de ensino e trabalho e por me ajudar na construção do meu conhecimento.

À FAPESP – Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão de bolsa de Mestrado.

Ao Centro de Estudos de Insetos Sociais (C. E. I. S.) por fornecer a estrutura e o ambiente propício de trabalho.

Aos funcionários, alunos e professores do Centro de Estudos de Insetos Sociais (C.E.I.S.) pela convivência, auxílio e respeito.

Aos colegas de laboratório, que se tornaram amigos queridos, Joaquim, Marcelo, Paula, Tássia, Aline e Talitha pela ajuda, amizade e confiança, pois sem eles tudo seria mais difícil.

Ao Professor Henrique Ferreira, pelo auxílio e orientação recebidos neste trabalho.

Ao Professor Odair Correa Bueno pelas considerações e sugestões ao meu trabalho, durante o Exame de Qualificação.

Ao Professor José Gouveia pelo auxílio nas traduções de texto para língua inglesa.

Às pessoas mais queridas, Pai, Mãe, Ana Luiza, Vivian, Juliana, Eduardo, Tia Miryam, Tia Lene, Vó Terezinha e Vó Izabel por serem a minha família.

À família que eu escolhi: Fernando, Carmen, Gabriela, Tiago, Juliana e Felipe, pela oportunidade de convivência.

Ao Eduardo, pelo amor, paciência, carinho, ajuda e pela grande capacidade de me incentivar e fazer sorrir quando achava que tudo estava perdido.

À Cinthia, minha grande amiga, companheira de muitos momentos, pelos conselhos, pela atenção e pela amizade sempre presente.

À Maria Fernanda M. Zarzuela pelo exemplo profissional e pessoal, de integridade, dedicação e otimismo, e pela amizade sincera e leal.

Às amigas e amigos da turma de formandos CBI 2001, alguns presentes e outros distantes, Dani, Alê, Lana, Renata, Kátia, Marina, Larissa, Rodrigo, João, Fred, Pedro e Zé, por serem para sempre especiais.

A todas essas pessoas que de alguma forma auxiliaram ou contribuíram, agradeço sinceramente.

ÍNDICE

Páginas

RESUMO GERAL	1
GENERAL ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	5
1.1. As Formigas.....	5
1.2. Formigas Atíneas: cultivadoras de fungo	7
1.3. As Formigas Cortadeiras	8
1.4. Importância Econômica de <i>Atta laevigata</i> e <i>Acromyrmex balzani</i>	9
1.5. Distribuição e Sistemática de <i>Atta laevigata</i>	10
1.6. Distribuição e Sistemática de <i>Acromyrmex balzani</i>	14
1.7. Dificuldades da sistemática baseada em caracteres morfológicos.....	19
1.8. A Biologia Molecular como Ferramenta para Estudos em Sistemática, Biogeografia e Evolução de <i>Atta laevigata</i> e <i>Acromyrmex balzani</i>	21
1.8.1. Marcador mitocondrial.....	23
1.8.2. Marcador microssatélite	28
1.9. A Filogenia como forma de análise e interpretação de dados moleculares ..	30
2. OBJETIVOS.....	34
3. CAPÍTULO I: Sistemática Molecular de <i>Atta laevigata</i>.....	35
3.1. Resumo	35
3.2. Abstract	36
3.3. Introdução.....	37
3.4. Materiais e Métodos.....	40
3.4.1. Amostragem taxonômica	40
3.4.2. Extração de DNA	43
3.4.3. Amplificação dos locos mitocondriais COI-IGS-LeutRNA-COII.....	44
3.4.4. Amplificação dos locos de microssatélite	44
3.4.5. Purificação dos amplicons obtidos	45
3.4.6. Eletroforese	45
3.4.7. Seqüenciamento de DNA.....	46
3.4.8. Alinhamento das seqüências mitocondriais.....	46
3.4.9. Análise dos resultados	47
3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
3.6. CONCLUSÃO	57

3.7.	REFERÊNCIAS	58
4.	CAPÍTULO II: Sistemática Molecular de <i>Acromyrmex balzani</i>	62
4.1.	RESUMO	62
4.2.	ABSTRACT	63
4.3.	INTRODUÇÃO	64
4.4.	MATERIAIS E MÉTODOS	66
4.4.1.	Amostragem Taxonômica	66
4.4.2.	Extração de DNA	69
4.4.3.	Amplificação dos loci COI, IGS, Leu tRNA e COII	69
4.4.4.	Purificação dos amplicons obtidos	70
4.4.5.	Eletroforese	70
4.4.6.	Seqüenciamento de DNA	70
4.4.7.	Alinhamento das seqüências mitocondriais	71
4.4.8.	Análise dos Resultados	71
4.5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
4.6.	CONCLUSÃO	76
4.7.	REFERÊNCIAS	77
5.	CAPÍTULO III: Caracterização Morfológica de <i>Atta laevigata</i> e <i>Acromyrmex balzani</i>	80
5.1.	RESUMO	80
5.2.	ABSTRACT	81
5.3.	INTRODUÇÃO	82
5.4.	MATERIAIS E MÉTODOS	84
5.5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
5.5.1.	Caracterização morfológica de <i>Atta laevigata</i>	85
5.5.2.	Caracterização morfológica de <i>Acromyrmex balzani</i>	102
5.5.3.	Discussões Finais:	118
5.6.	CONCLUSÃO	119
5.7.	REFERÊNCIAS	120
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	122
7.	REFERÊNCIAS	124

LISTA DE FIGURAS

Páginas

Figura 1.1 Distribuição Geográfica de <i>Atta laevigata</i> no Brasil.....	12
Figura 1.2 Distribuição Geográfica de <i>Acromyrmex balzani</i> na América do Sul.....	16
Figura 1.3 Estrutura da molécula de DNA mitocondrial, com a constituição gênica.....	24
Figura 1.4 Sequências nucleotídicas de COI (1-96 pb), IGS (97-229 pb), LeutRNA (230-317 pb) e COII (318-513 pb) de dois espécimens de <i>Atta laevigata</i> . Os pontos na segunda sequência indicam as posições conservadas, os traços (-) representam indels e as letras representam as substituições nucleotídicas.....	27
Figura 1.5 Sequências nucleotídicas de COI (1-108 pb), IGS (109-381), LeutRNA (381-460) e COII (461-591) de dois espécimes de <i>Acromyrmex balzani</i> . Os pontos na segunda sequência indicam as posições conservadas, os traços (-) representam indels e as letras representam as substituições nucleotídicas.....	28
Figura 3.1 Mapa com os pontos de coleta de <i>Atta laevigata</i> , de acordo com a tabela 3.3.	43
Figura 3.2 Frequência de transições (s) e transversões (v) em função da divergência entre sequências nucleotídicas de COI e COII de <i>Atta laevigata</i>	51
Figura 3.3 Frequência de transições (s) e transversões (v) em função da divergência entre sequências nucleotídicas de IGS de <i>Atta laevigata</i>	52
Figura 3.4 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 <i>Atta laevigata</i> e dois de <i>Atta bisphaerica</i> (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.....	54
Figura 3.5 Polimorfismo através de marcadores microssatélite em populações de <i>Atta laevigata</i> . São mostradas as amostras analisadas e os marcadores microssatélite (<i>Etta</i> 1, <i>Etta</i> 5 e <i>Etta</i> 7) para o Grupo 1 e Grupo 2, onde: L – ladder (padrão molecular); 1, 5, 9 = GV150805-06; 2, 6, 10 = GV150805-21; 3, 7, 11 = E987; 4, 8, 12 = E990; 13, 17, 21 = E978; 14, 18, 22 = MB160306-29; 15, 19, 23 = GV150805-37; 16, 20, 24 = E971.....	56
Figura 4.1 Mapa com os pontos de coleta de <i>Acromyrmex balzani</i> e <i>Acromyrmex landolti</i> , de acordo com a tabela 4.1 e 4.2.	68
Figura 4.2 Alinhamento múltiplo da região do mtDNA, incluindo os loci COI, IGS, Leu tRNA e COII (região inicial) das sequências geradas de <i>Acromyrmex balzani</i> e <i>Acromyrmex landolti</i> . Os pontos nas sequências indicam as posições conservadas e as letras representam as substituições nucleotídicas.....	73
Figura 4.3. Consenso estrito entre as 9 árvores mais parcimoniosas (377 passos) obtidas a partir de 199 caracteres informativos para parcimônia dos loci COI, IGS, Leu tRNA e COII de 17 espécimes de <i>Acromyrmex balzani</i> , 11 de <i>Acromyrmex landolti</i> , um de	

<i>Acromyrmex heyeri</i> e um de <i>Acromyrmex lundii</i> (grupos externos). São mostrados os valores de <i>bootstrap</i> , acima dos nós. CI = 0.8170, HI = 0.1830 e RI = 0.8783.....	75
Figura 5.1 Soldados de <i>Atta laevigata</i> . (A)- Vista lateral e (B) Vista frontal.....	85
Figura 5.2 Ilustração dos caracteres utilizados para a identificação de soldados de <i>Atta laevigata</i> , baseada nos caracteres morfológicos propostos por Gonçalves, 1942 (Tabela 5.1).....	87
Figura 5.3 Vista frontal de <i>Acromyrmex balzani</i> , com os caracteres da cabeça utilizados para o diagnóstico da espécie.	103
Figura 5.4 Vista lateral de <i>Acromyrmex balzani</i> com caracteres importantes para o diagnóstico da espécie: a – espinho occipital, b – espinho pronotal mediano, c – espinho pronotal lateral, d – espinho mesonotal anterior, e – espinho mesonotal posterior, f – crista metanotal, g – espinho epinotal, h – pecíolo (1º segmento), i – pós-pecíolo (2º segmento) e j – 3º segmento gaster.	103
Figura 5.5 Espinho Pronotal Lateral e Mediano.....	106
Figura 5.6 Espinho Mesonotal Anterior e Epinotal	106
Figura 5.7 Espinho Occipital reduzido e Espinho Pronotal Lateral orientado posteriormente....	108
Figura 5.8 A. (<i>M.</i>) <i>landolti</i> : A. Espinho occipital reduzido; B. Espinho pronotal lateral bem desenvolvido e orientado anteriormente.	109
Figura 5.9 A. (<i>M.</i>) <i>balzani</i> : A. Espinho occipital proeminente, mais conspícuo; B. Espinho pronotal lateral ereto e orientado posteriormente.	109
Figura 5.10 Ausência de Aresta do Vértice.....	113
Figura 5.11 Espinhos Epinotais com comprimento menor que a distância interna entre eles..	113
Figura 5.12 Espinhos Occipitais tuberculiformes.....	114
Figura 5.13 Espinhos Epinotais com comprimento maior que a distância interna entre eles...	114
Figura 5.14 Espinhos Occipitais alongados	115
Figura 5.15 Arestas do Vértice presentes.	115

LISTA DE TABELAS

Páginas

Tabela 1.1 Lista Taxonômica e Bibliográfica de <i>Atta laevigata</i> , em ordem cronológica, considerando: referência nominal – autor – ano – bibliografia.....	13
Tabela 1.2 Lista Taxonômica e Bibliográfica de <i>Acromyrmex balzani</i> , em ordem cronológica, considerando: referência nominal – autor – ano – bibliografia (Bolton, 1995).	18
Tabela 1.3 Comparação dos principais marcadores moleculares (SOLÉ-CAVA, 2001). Critérios de escolha: custo da técnica, velocidade na produção de dados, padrão de herança, facilidade da técnica, maior problema envolvido. Abreviações: AFLP – amplified fragment length polymorphism; DS-PCR – double stringency PCR; PDR/RFLP – Polymerase chain reaction/ Restriction fragment length polymorphism; RAPD – Random amplified polymorphic DNA; SL/VNTR – Single locus/ Variable number of tandem repeats.....	23
Tabela 3.1 Espécimes coletados de <i>Atta laevigata</i> . São mostrados o número de cada coleta, o respectivo código, e a localização (cidade/estado) com coordenadas geográficas do local (longitude/latitude).....	41
Tabela 3.2 Informações sobre os locos de microssatélite usados para a análise genética de <i>Atta laevigata</i> e a sequência dos primers utilizados para amplificar estas regiões.	45
Tabela 3.3 Sítios Variáveis observados em COI (região codificante) de <i>Atta laevigata</i> . A localização dos sítios polimórficos é mostrada com base na sequência consenso e os números das sequências correspondentes de acordo com a Tabela 3.3. de coleta. A posição dos códons é dada abaixo, e mudanças não-sinônimas são marcadas com um asterisco.	50
Tabela 3.4 Sítios Variáveis observados em COII (região codificante) de <i>Atta laevigata</i> . A localização dos sítios polimórficos é mostrada com base na sequência consenso e os números das sequências correspondentes de acordo com a Tabela 3.3. de coleta. A posição dos códons é dada abaixo, e mudanças não-sinônimas são marcadas com um asterisco.	50
Tabela 3.5 Sítios Variáveis observados na região gênica Leu tRNA de <i>Atta laevigata</i>	51
Tabela 3.6 Sítios Variáveis observados na região espaçadora IGS de <i>Atta laevigata</i>	52
Tabela 4.1 Espécimes coletados de <i>Acromyrmex balzani</i>	67
Tabela 4.2 Espécimes coletados de <i>Acromyrmex landolti</i>	68
Tabela 5.1 Caracteres Morfológicos utilizados para Identificação de soldados <i>Atta laevigata</i> , de acordo com Gonçalves, 1942.	86
Tabela 5.2 Concordâncias encontradas na análise dos soldados de <i>Atta laevigata</i> . São mostrados o caráter (de acordo com Gonçalves, 1942 – Tabela 5.1.), o respectivo exemplo representativo e em quais espécimes foi observado.	91

Tabela 5.3	Discordâncias encontradas na análise dos soldados de <i>Atta laevigata</i> . São mostrados o caráter (de acordo com Gonçalves, 1942 – Tabela 5.1.) e o respectivo exemplo.	94
Tabela 5.4	Análise da variação morfológica para a casta dos soldados de <i>Atta laevigata</i> . São mostrados o caráter analisado, a variação encontrada e exemplos mais representativos dessa variação.	98
Tabela 5.5	Quadro comparativo entre as subespécies já propostas para <i>Atta laevigata</i> (Gonçalves, 1942).	100
Tabela 5.6	Quadro comparativo entre as classificações analisadas (molecular e morfológica) para os espécimes coletados de <i>Acromyrmex balzani</i> . Onde, ? significa dúvida de identificação.	117

RESUMO GERAL

VINHA, Giovana Gonçalves. **Sistemática Molecular de *Atta laevigata* (Smith 1858) e *Acromyrmex balzani* (Emery 1890)**. 2007. 133 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007.

As espécies de formigas cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae), *Atta laevigata* e *Acromyrmex balzani*, possuem importância agrícola e econômica por serem pragas de pastagens, florestas e plantas cultivadas em geral, em diferentes regiões das Américas, com consideráveis perdas de matéria vegetal e conseqüentes prejuízos para a agricultura e pecuária. Portanto, um melhor conhecimento sobre as espécies permitirá a adoção de medidas mais eficazes de controle. As espécies possuem uma história taxonômica marcada por controvérsias, devido ao embasamento da sistemática em caracteres morfológicos, muitos dos quais com variabilidade individual e polimorfismos nas diferentes castas de um mesmo ninho, gerando equívocos tanto de nomenclatura quanto de identificação. Diante disso, realizamos a caracterização molecular das diferentes populações de *Atta laevigata* e *Acromyrmex balzani*, com o objetivo de examinar as relações filogenéticas entre populações de diferentes áreas de ocorrência e auxiliar na definição dos grupos naturais destas espécies. Associado a isso, realizamos a caracterização morfológica das espécies, através da análise dos caracteres taxonômicos utilizados para a identificação. As análises moleculares evidenciam a existência

de dois grupos gênicos simpátricos de *Atta laevigata*, largamente distribuídos pelo Brasil, e definem *Acromyrmex balzani* como pertencente ao mesmo grupo gênico de *Acromyrmex landolti*. Além disso, os resultados indicam que não é possível utilizar os caracteres morfológicos tradicionalmente considerados para taxonomia destas formigas, devido à presença de polimorfismos e incongruências.

Palavras-chave: marcadores moleculares, filogenia, *Atta laevigata*, *Acromyrmex balzani*, formigas cortadeiras.

GENERAL ABSTRACT

VINHA, Giovana Gonçalves. **Molecular Systematics of *Atta laevigata* (Smith 1858) and *Acromyrmex balzani* (Emery 1890)**. 2007. 133 f. Dissertation (Master's Degree) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007.

Leaf-cutting ants (Hymenoptera:Formicidae), *Atta laevigata* and *Acromyrmex balzani*, are economic and agriculturally important for being crop, forest and cultivated plant plagues in different areas of the Americas, thus causing significant losses of vegetable material and damage to agriculture and livestock. Therefore, having better knowledge of the species will help adopt more efficient control measures. The species have a taxonomic history marked by controversies. This is owed to the fact that systematic is based on morphologic characters – many of which show individual variability and polymorphisms among the different casts in the same nest, thus generating either nomenclature or identification mistakes. Faced with this, we have carried through the molecular characterization of the different *Atta laevigata* and *Acromyrmex balzani* populations, with the aim of examining the phylogenetic relations between populations occurring in different areas and helping to define the natural group of these species. Connected with this, we have carried through the morphologic characterization of the species by analyzing the taxonomic characters used for the identification. Molecular analyses evidence the existence of two sympatric genetic groups of *Atta laevigata*, which are

widely spread throughout Brazil, and define *Acromyrmex balzani* as part of the same genetic group of *Acromyrmex landolti*. Moreover, the results indicate that it is not possible to use the morphologic characters traditionally considered for taxonomy of these ants, due to the presence of polymorphism and contradictions.

Key-words: molecular markers, phylogeny, *Atta laevigata*, *Acromyrmex balzani*, leaf-cutting ants.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. As Formigas

As formigas (Hymenoptera: Formicidae) representam o mais abundante e diverso grupo animal do ecossistema tropical, com mais de 17.000 espécies descritas nos mais diversos habitats do mundo (AGOSTI e JOHNSON, 2003; AGOSTI, 2005; BOLTON, 1995). Apesar disso, acredita-se que metade da fauna mirmecológica ainda necessita ser descoberta, com estudos mais detalhados nas faunas das copas das árvores e no folhiço das florestas tropicais (AGOSTI et al., 2000).

Esses organismos são definidos como insetos verdadeiramente sociais (eussociais), ou seja, apresentam cuidados com a prole, divisão em castas (com indivíduos reprodutivos, as rainhas e indivíduos estéreis, as operárias), divisão de trabalho e ainda sobreposição de gerações (WILSON, 1971).

Vivem exclusivamente em colônias, habitando todos os ambientes terrestres (desde o Equador até aproximadamente latitudes de 50 graus, e do nível do mar a altitudes de cerca de três mil metros), com exceção dos pólos. São capazes de nidificar no solo, rochas, folhas e árvores (DIEHL-FLEIG, 1995) até ambientes antrópicos (BUENO e CAMPOS-FARINHA, 2002).

Além da diversidade e abundância, as formigas desempenham importantes funções ecológicas no ecossistema, como a reciclagem de nutrientes, aeração das camadas superficiais do solo, polinização das plantas, dispersão de sementes, monitoramento ambiental e da biodiversidade, também atuando em diferentes níveis tróficos (AGOSTI et al., 2000; HÖLLDOBLER e WILSON, 1990): algumas espécies mantêm associações simbióticas com plantas, realizando troca de alimentos (em geral néctar), outras podem preda outros artrópodes, ainda há as que cortam folhas e outras partes das plantas que servem de substrato para o crescimento de fungos dos quais dependem exclusivamente para se alimentar (DELLA LUCIA et al., 1993).

Essas últimas são as chamadas formigas cortadeiras, pertencentes à Tribo Attini, que têm recebido atenção especial pelos danos que ocasionam ao cortarem e transportarem para os seus ninhos folhas de pastagens, florestas, plantas cultivadas e silvestres, com consideráveis prejuízos para a agricultura e para a pecuária, em diferentes regiões das Américas (FOWLER e FORTI, 1986).

1.2. Formigas Atíneas: cultivadoras de fungo

As formigas pertencentes à Tribo Attini, subfamília Myrmicinae, compreendem cerca de 215 espécies dentro de 13 gêneros (BOLTON, 1995; BRANDÃO e MAYHÉ-NUNES, 2001; BROWN JR., 2000) e são caracterizadas por cultivarem jardins de fungo nas câmaras de seus ninhos, que representam sua principal fonte de alimento, mantendo uma relação de simbiose obrigatória com fungos basidiomicetos (MARTIN e WEBER, 1969). As formigas propagam esses fungos, alimentando-os com material vegetal cortado e inibindo o crescimento de organismos competidores (POWELL e STRADLING, 1986). Em resposta, os fungos provêm às formigas adultas e às larvas, enzimas (BASS e CHERRETT, 1996) e nutrientes (BASS e CHERRETT, 1995).

É um grupo com distribuição em áreas tropicais das Américas, ocorrendo desde os Estados Unidos da América (latitude 40°N) até a Argentina (latitude 44°S) (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990; WEBER, 1972). A provável origem da Tribo se deu em regiões tropicais, possivelmente ao Norte da América do Sul (região amazônica - centro de origem) e em regiões próximas ao litoral, ambas com clima quente e úmido o suficiente para permitir a sobrevivência das formigas e a manutenção do fungo simbiote (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990; KUSNEZOV, 1963; WEBER, 1972).

A distribuição geográfica, a frequência e a densidade de formigas Attini nos diversos ecossistemas terrestres estão ligadas a fatores como as condições ambientais, o tipo de vegetação, tipo de solo e a precipitação média anual (PEREIRA et al., 1997 apud RANDO e FORTI, 2005).

Assim, pode-se afirmar que a adaptação a diversas condições ambientais e a capacidade de migração permitiu a expansão de alguns gêneros, como é o caso das formigas cortadeiras *Atta* e *Acromyrmex*, e a conseqüente distribuição e dominância dessas formigas nos diversos ambientes terrestres da América do Sul.

1.3. As Formigas Cortadeiras

Os gêneros mais importantes de formigas cortadeiras (Subfamília Myrmicinae: Tribo Attini) são *Atta* e *Acromyrmex*. As espécies de *Atta* são conhecidas popularmente como saúvas, e as de *Acromyrmex*, como quenquêns. São assim chamadas, pelo hábito de cortarem folhas ou outras partes de material vegetal e transportarem para a colônia para a manutenção do fungo simbiote (FORTI e BOARETTO, 1997). Essa relação entre o fungo e as formigas é vista como um dos grandes fatores responsáveis pela abundância de colônias e pelo sucesso de desenvolvimento nas áreas em que se instalam (HUBBEL e WIEMER, 1983; MUELLER et al., 1998; WEBER, 1972).

O gênero *Atta*, com 15 espécies descritas (BOLTON, 1995; HÖLLDOBLER e WILSON, 1994), possui a posição mais apical em relação a grupos taxonômicos próximos dentro da tribo Attini (WETTERER et al., 1998). Devido a sua riqueza, diversidade e elevado número de espécies, está amplamente distribuído no continente, estendendo-se desde a latitude 33° Sul (Sul do Brasil e Nordeste da Argentina) até 12° Norte (Texas, EUA) (WEBER, 1972).

O gênero *Acromyrmex* possui 63 espécies nominais de acordo com a revisão de Mayhé-Nunes (1991), endêmico da América, cuja área de distribuição abrange Califórnia (Estados Unidos), México, América Central, todos os países da América do Sul (exceto Chile), Patagônia (Argentina), Cuba e Trinidad (Antilhas). No Brasil, o gênero está distribuído em todos os Estados e Territórios continentais (GONÇALVES, 1961), com 26 espécies e 11 subespécies (DELLA LUCIA et al., 1993; FOWLER, 1988; FOWLER e FORTI, 1986; GONÇALVES, 1961; MAYHÉ-NUNES, 1991).

1.4. Importância Econômica de *Atta laevigata* e *Acromyrmex balzani*

Devido a suas atividades forrageiras, relacionadas à demanda de substrato para o desenvolvimento do fungo em suas colônias e para alimentação de um grande número de indivíduos, as formigas cortadeiras podem causar danos consideráveis, cortando continuamente folhas e ramos tenros das plantas, ocasionando um desfolhamento intenso e destruindo completamente os vegetais (FORTI e BOARETTO, 1997). Por isso, são consideradas as piores pragas da agricultura, pois seu ataque é voraz e se dá durante todo o ano nas áreas cultivadas, florestais e pastagens da América do Norte à América do Sul (DELLA LUCIA et al., 1993).

Além disso, a capacidade de colonização e forrageamento dessas formigas, aliada ao desmatamento e à introdução de monoculturas agrícolas e florestais, forneceram o meio ideal para a propagação e ocupação de áreas não ocupadas anteriormente, o que também levou a caracterizá-las como praga (CHERRETT, 1986).

O potencial de dano às áreas agrícolas é avaliado a partir da densidade das colônias e através da quantidade de folhas coletadas por cada colônia (FOWLER E FORTI, 1986; ZANETTI et al., 2000). Alguns levantamentos indicam que existem, somente no Estado de São Paulo, 100 milhões de saúveiros ativos, responsáveis pelo corte anual de 180 milhões de toneladas de matéria vegetal e pela movimentação de 200 milhões de metros cúbicos de terra (SANOS, 1999). Assim, é possível considerar que a falta de controle dos formigueiros pode trazer perdas significativas.

Atta laevigata é praga de pastagens, florestas cultivadas, cana-de-açúcar e plantas cultivadas em geral, com registro de danos a eucaliptos, pinheiros, milho, mandioca e coqueiros novos (GONÇALVES, 1951 e 1960).

Acromyrmex balzani possui registros de ataque à plantações de arroz, campos naturais e cerrados, terrenos cultivados, principalmente os pastos, sendo cortadeira exclusiva de gramíneas (DELABIE et al., 1997; GONÇALVES, 1961).

1.5. Distribuição e Sistemática de *Atta laevigata*

Atta laevigata habita a Colômbia, Venezuela, Guiana, Bolívia e Paraguai (BORGMEIER, 1950; GONÇALVES, 1960 e MARICONI, 1970) e, no Brasil, as cinco regiões geográficas, inclusive o Estado do Acre, aparentemente recém-colonizado (FORTI et al., 2003), não sendo encontrada nos Estados do Espírito Santo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul e nas regiões do sul da Bahia, interior do Nordeste e porção central da Amazônia (AMANTE, 1972; DELLA

LUCIA et al., 1993; MARICONI, 1970; PAIVA CASTRO et al., 1961; TROPPEMAIR, 1973) (Figura 1.1.).

Essa distribuição geográfica foi descrita por muitos autores e é baseada em observações de campo, certificando-se que a espécie ocupa extensas áreas da América do Sul. Entretanto, não comprovam sua ausência em determinadas áreas, próximas aos locais de sua ocorrência. Assim, *Atta laevigata* tem sido verificada em um número cada vez maior de localidades, devido principalmente à abertura de rodovias e à expansão da pecuária, que servem como meios para a dispersão da espécie.

A formiga *Atta laevigata* (saúva cabeça-de-vidro) apresenta soldados com gáster e cabeça brilhante, que quando esmagada não exala odor de folhas de limão, como as cabeças dos soldados de *Atta sexdens*. Os ninhos possuem o monte de terra solta de forma convexa e com superfície mais regular que os das saúvas *Atta sexdens*, *Atta capiguara* e *Atta cephalotes*, encontrados tanto em lugares ensolarados quanto sombreados. Nas trilhas, podem-se observar formigas transportando tanto plantas dicotiledôneas como gramíneas.

A descrição original da espécie foi realizada em 1858, por F. Smith, baseada em uma operária de 11,5 mm, coletada em Santarém, Pará (localidade-tipo) (GONÇALVES, 1942; SMITH, 1858). Mas, desde então, a espécie passou por uma extensa mudança classificatória e nomenclatural, como pode ser observado na Lista Taxonômica e Bibliográfica (Tabela 1.1.), elaborada com base nos trabalhos de Borgmeier (1959), Paiva Castro et al. (1961) e Bolton (1995).



Gonçalves (1942) considerou três subespécies e uma variedade de *Atta laevigata*, apesar de a espécie ser atualmente classificada sem nenhuma destas subdivisões (BOLTON, 1995):

Tabela 1.1 Lista Taxonômica e Bibliográfica de *Atta laevigata*, em ordem cronológica, considerando: referência nominal – autor – ano – bibliografia.

LISTA TAXONÔMICA E BIBLIOGRÁFICA:	
<i>Oecodoma laevigata</i> Smith, F. 1858: Cat. Hym. Brit. Mus. 6, p. 182, pl. 10, fig. 24. (soldados e operárias)	
Combinação em <i>Atta</i> Roger, 1863: Berliner Entomologische Zeitschrift 7, p. 35.	
Nome válido: <i>Atta laevigata</i>	
Forel, 1908: Verh. Z. b. Ges. Wien. 58, p. 348; 1913: Bull. Soc. Vaud. Sc. Nat. 49, p. 239. (machos)	
Luederwaldt, 1926: Rev. Mus. Paul. 14, p. 199, 211, 219, 228, 251.	
Menozi, 1935: Redia 21, p. 11.	
Costa Lima, 1936: Terc. Catal. Ins. Brasil, p. 381.	
Borgmeier, 1939: Ver. Ent. 10, p. 427, fig. 13.	
Gonçalves, 1942: Bol. Soc. Bras. Agron. 5, p. 336, 341, 348;	
Gonçalves, 1945: Bol. Fitos. 2, p. 186, 187, 198, fig. 8, 9, 25.	
Weber, 1946: Ver. Ent. 17, p. 155, 156, 164; 1947: Bol. Ent. Venez. 6, p. 155.	
Lisboa, 1948: Combate às Form., p. 18.	
Autuori, 1950: Arq. Inst. Biol. 19, p. 325, 326, 327.	
Gonçalves, 1951: Bol. Fitos. 5, p. 22, 27, fig. 10, 14.	
Fautereau, 1952: p. 25.	
Gonçalves, 1956: Ver. Soc. Brás. Agron. 12, p. 43, 44, 45, 47, 48, 49, 51.	
Mariconi, 1958: Inset. e comb. às pragas, p. 457.	
Gonçalves, 1960: Divulg. Agron. 1, p. 2, 4, 6, fig. 1.	
Mariconi & Paiva Castro, 1960: O Biol. 26, p. 99, 100.	
Combinação em <i>Atta (Neoatta) laevigata</i>	
Gonçalves, 1942: Bol. Soc. Bras. Agron. 5, p. 336, 341, 348;	
Borgmeier, 1959: Studia Entom. 2, p. 321, 327, 328, 333, 337, 338, 339, 365, fig. 3, 19.	
Combinação em <i>Atta (Epiatta) laevigata</i>	
Borgmeier, 1950: Mem. Inst. O. Cruz 48, p. 243, 246, 247, 269, 272, 273, fig. 10-11, 16-17.	
Variedade/ subespécies de <i>Atta sexdens</i>	
<i>Atta sexdens</i> var. <i>laevigata</i> , Mayr, 1865: Novara Reise, p. 80.	
<i>Atta sexdens</i> subsp. <i>laevigata</i> , Emery, 1913: Ann. Soc. Ent. Belg. 57, p. 259, fig. 11.	
<i>Atta sexdens</i> subsp. <i>laevigata</i> , Wheeler, 1923: Ark. Zool. 15, p. 4.	
Elevada ao status de espécie <i>Atta laevigata</i>	
Forel, 1913: 239; Menozzi, 1935: 197; Borgmeier, 1939: 423; Gonçalves, 1942: 348	
Variedade/ subespécies de <i>Atta (Neoatta) laevigata</i> (In: Gonçalves, 1942).	
<i>Atta (Neoatta) laevigata</i> subsp. <i>venezuelensis</i> , Gonçalves, 1942: Bol. Soc. Brás. Agron. 5, p. 341, 349.	
<i>Atta (Neoatta) laevigata</i> subsp. <i>saltensis</i> , Forel, 1913: Bull. Soc. Vaud. Sc. Nat. 49, p. 203-250.	
<i>Atta (Neoatta) laevigata</i> subsp. <i>altensis</i> v. <i>obscurata</i> , Gallardo, 1916: Na. Mus. Nac. Hist. Nat. 28, p. 317-344.	
<i>Atta (Neoatta) laevigata</i> subsp. <i>lizeri</i> , Santschi, 1922: Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat. 54, 345-387.	
Subespécie de <i>Atta (Epiatta) laevigata</i>	
<i>Atta (Epiatta) laevigata venezuelensis</i> , Borgmeier, 1950: Mem. Inst. O. Cruz 48, p. 243, 269.	
Sinônimo sênior <i>Atta (Neoatta) sexdens</i> subsp. <i>bolchevista</i> Borgmeier, 1950, p. 243.	
Sinônimo sênior <i>Atta (Neoatta) laevigata</i> subsp. <i>venezuelensis</i> : Borgmeier, 1959, p. 365	

Atta laevigata saltensis Forel, 1913, caracterizada pela ausência de pêlos curtos e pubescência, com parte do promesonotum e espinhos mesonotais inteiramente lisos e muito brilhantes; e ocorre na Argentina (FOREL, 1913 apud GONÇALVES, 1942).

Atta laevigata saltensis var. obscurata Gallardo, 1916, que apresenta uma coloração parda enegrecida ou negra que difere da típica coloração parda avermelhada da espécie, sendo muito brilhante e pouco pontuada; ocorrendo na Argentina (GALLARDO, 1916 apud GONÇALVES, 1942).

Atta laevigata lizeri Santschi, 1922, cuja descrição original baseia-se em operárias de 8 mm, coletadas na Bolívia, e caracterizadas por apresentar cabeça angulosa dos lados e brilhante em grande parte; fronte, lados do tórax e pernas, finamente granulados; poucos pêlos erectos e nenhuma pubescência no tórax (SANTSCHI, 1922 apud GONÇALVES, 1942).

Atta laevigata venezuelensis Gonçalves, 1942, que é mais relacionada à *saltensis*, diferindo desta apenas pela presença de pubescência no pronoto, e pelo aspecto dos espinhos epinotais, que são mais finos e menores que os mesonotais anteriores; promesonotum e epinotum brilhantes, mas pontuados; descrição baseada em um material típico de El Valle, Venezuela (GONÇALVES, 1942).

1.6. Distribuição e Sistemática de *Acromyrmex balzani*

A distribuição geográfica descrita para a espécie inclui Paraguai (Assunção – localidade-tipo), Uruguai, Argentina, Peru, Bolívia (BRANDÃO, 1991) e, no Brasil, as cinco regiões geográficas, exceto os Estados do Amazonas, Roraima

e Pará (FORTI e BOARETTO, 1997; GONÇALVES, 1961; RANDO e FORTI, 2005). A ocorrência da espécie no Estado do Acre foi recentemente registrada (RANDO e FORTI, 2005) (Figura 1.2.).

Assim como *Atta laevigata*, *Acromyrmex balzani* também foi alvo de controvérsias e modificações em sua classificação (BOLTON, 1995) (Tabela 1.2.). A espécie foi descrita por Emery, em 1890, coletada em Assunção, Paraguai (localidade-tipo), como *Atta (Acromyrmex) balzani* (EMERY, 1890 apud FOWLER, 1988). Forel, 1893, descreveu *Moellerius* como um subgênero de *Atta* para agrupar os distintos taxóns *Atta (Moellerius) landolti* Forel 1884 e *Atta (Moellerius) balzani* Emery 1890 (FOREL, 1893 apud FOWLER, 1988). Emery, em 1913, elevou *Acromyrmex* ao status de gênero, incluído *Moellerius* como subgênero (EMERY, 1913 apud FOWLER, 1988).

Gonçalves, 1961, rebaixou o status de espécie de *Acromyrmex balzani* Emery, para subespécie de *landolti* Forel, embora tenha encontrado caracteres que separam *balzani* de *landolti*, mas que não justificaram a separação em duas espécies. Considerou que ambas pertencem à mesma espécie, tanto pelos caracteres da operária, como pela forma idêntica do ninho e pela semelhança dos seus hábitos. *Acromyrmex balzani* distingui-se da forma típica de *Acromyrmex landolti* principalmente pela cabeça um pouco mais estreita e pelos espinhos mesonotais anteriores com cerca de metade ou pouco menos do seu comprimento na forma típica, e pelos olhos menores. Os tubérculos dos ângulos occipitais são muito variáveis e não servem para distingui-las. Outros caracteres da cabeça também não são seguros (GONÇALVES, 1961).



Fowler (1988) elevou *Acromyrmex (Moellerius) balzani* ao status de espécie, considerando os seguintes caracteres diagnósticos: pequenos olhos, não salientes; espinho pronotal mediano tuberciforme a proeminente, sendo muito mais conspícuo que em *Acromyrmex (Moellerius) landolti*. Entre populações da mesma espécie há uma grande variação na tuberculação cefálica de indistinguível a pronunciada. Operárias menores de *Acromyrmex (M.) balzani* têm uma marcada redução na espinação torácica e cefálica e na tuberculação do gáster. Devido a isso, é impossível distinguir operárias menores de *Acromyrmex (M.) balzani* das de *Acromyrmex (M.) landolti*.

Baseado na variação encontrada, Fowler (1988) considerou *A. (M.) balzani* restrita ao Sul da Bacia Amazônica, com populações a Oeste, provavelmente constituindo uma nova espécie. *A. (M.) landolti* foi identificada pelos olhos pequenos, não salientes; espinho pronotal mediano reduzido, bem menos que observado em *A. (M.) balzani*; variação na tuberculação cefálica claramente aparente, utilizada como um dos caracteres para separar *A. (M.) balzani* de *A. (M.) landolti*, porém muito variável para ser utilizado com confiança. Operárias menores têm uma redução acentuada da tuberculação do gáster e na espinação torácica. Esta espécie foi determinada com ocorrência ao Norte da América do Sul. (FOWLER, 1988).

Mayhé-Nunes, 1991, seguindo a proposta de Gonçalves (1961), considerou *Acromyrmex balzani* Emery como subespécie de *Acromyrmex landolti* Forel. *Acromyrmex landolti landolti* Forel 1884 é a forma típica (espécie-tipo do subgênero *Moellerius* coletada na Colômbia), descrita com espinhos epinotais com o comprimento maior que a distância interna entre eles na base; espinhos occipitais alongados, arestas do vértice ausentes (MAYHÉ-NUNES, 1991).

Portanto, embora Fowler, em 1988, tenha considerado *Acromyrmex landolti balzani* como espécie, Mayhé-Nunes, em 1991, achou bastante difícil separá-la da forma típica. Entretanto, este último observou em seu material analisado uma ligeira redução dos espinhos epinotais de *A. landolti balzani* (MAYHÉ-NUNES, 1991).

Essa redução foi quantificada comparando-se a distância interna entre eles com o seu comprimento. Esse caráter e a presença de aresta do vértice foram os únicos encontrados para separá-la de *A. landolti landolti*. *Acromyrmex*

landolti balzani Emery 1890 foi identificada baseada nos espinhos epinotais com o comprimento quase igual ou menor que a distância interna entre eles na base; espinhos occipitais tuberculiformes; arestas do vértice presentes.

Tabela 1.2 Lista Taxonômica e Bibliográfica de *Acromyrmex balzani*, em ordem cronológica, considerando: referência nominal – autor – ano – bibliografia (Bolton, 1995).

LISTA TAXONÔMICA E BIBLIOGRÁFICA:
Combinação em <i>Atta (Moellerius) balzani</i> Forel, 1893: Ann. Soc. Entomol. Belg. 37, p. 589 Combinação em <i>Acromyrmex (Moellerius) balzani</i> Emery, 1913: Ann. Soc. Ent. Belg. 57, p. 250-262 Santschi, 1916: Physis 2, p. 389 Gallardo, 1916: An. Mus. Nac. Hist. Nat. 28, p. 334 Subespécie de <i>Acromyrmex (Moellerius) landolti</i> <i>Acromyrmex (Moellerius) landolti balzani</i> Gonçalves, 1961: Studia Ent. 4, p. 124; Kempf, 1972: Studia Ent. 15, p. 15 Elevada ao status de espécie <i>Acromyrmex (Moellerius) balzani</i> Fowler, 1988: Científica 16(2), p. 284 Sinônimo sênior de <i>Sericomyrmex gallardoi</i> Santschi, 1922: Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat. 54, p. 362 Sinônimo sênior de <i>Acromyrmex (Moellerius) landolti var. nivalis</i> Fowler, 1988: Científica 16(2), p. 284 Sinônimo sênior de <i>Acromyrmex (Moellerius) landolti var. parens</i> Santschi, 1925: Bull. Ann. Soc. Ent. Belg. 65, p. 239 (Gonçalves, 1961: Studia Ent. 4, p. 124). Atual subespécie: <i>Acromyrmex (Moellerius) balzani multituber</i> Santschi, 1922: Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat. 54, p. 362; Fowler, 1988: Científica 16(2), p. 284

Além disso, Mayhé-Nunes elaborou um cladograma considerando diversos caracteres quantitativos e qualitativos para a análise filogenética, no qual os táxons de *Acromyrmex (Moellerius)* formaram um grupo distinto, bem definido, representando os táxons mais derivados de *Acromyrmex*, que se posicionavam próximos ao ramo de *Atta laevigata*, utilizada na análise pelo fato de ser considerada filogeneticamente o gênero mais apical da Tribo Attini

(WETTERER et al., 1998). Ainda, no subgênero *Moellerius*, a proximidade das subespécies de *Acromyrmex* (*M.*) *landolti* foi notável.

Diante da sistemática de *Acromyrmex balzani*, percebe-se, que ainda não foi encontrado um caráter diagnóstico ou um conjunto de diferenças morfológicas capazes de diferenciar com segurança *landolti* de *balzani*.

1.7. Dificuldades da sistemática baseada em caracteres morfológicos

Tradicionalmente, as formigas são um grupo taxonômico de difícil identificação (BOLTON, 1994), sendo que os caracteres morfológicos são os mais complexos de serem relacionados. Há inúmeras controvérsias na classificação das subfamílias de Formicidae, principalmente em nível de tribo, onde a classificação é confusa (FRANÇOSO e BRANDÃO, 1993), como a organização tribal da subfamília Myrmicinae, que está desordenada e necessita de uma completa revisão (AGOSTI et al., 2000; BOLTON, 2003).

A situação pode ser estendida para os níveis taxonômicos de alguns gêneros e subgêneros, devido à presença de caracteres morfológicos dúbios e polimórficos, além de conceitos e definições obscuras que dificultam a classificação e a identificação das formigas (BOLTON, 1995).

A utilização, no passado, de um sistema pentanomial para a classificação de formigas, onde eram determinados o gênero, subgênero, espécie, subespécie e variedade/ forma, também colaborou para que muitas espécies sofressem diversas mudanças em sua classificação, o que, conseqüentemente, gerou constantes alterações nas coleções e chaves de referência e confusões no reconhecimento das espécies (BUHS, 2000).

Além disso, a dificuldade de identificação também aponta para a necessidade de um conhecimento correto sobre as espécies de uma determinada área, visando tanto à adoção de medidas adequadas e específicas de controle às formigas cortadeiras, quanto à avaliação da biodiversidade, abundância e distribuição de espécies para o monitoramento de um determinado ambiente (AGOSTI et al., 2000).

Assim, muito da controvérsia apontada sobre as divisões e denominações dos subgrupos dentro de *Atta laevigata* e *Acromyrmex balzani*, pode estar relacionada ao embasamento da sistemática em caracteres morfológicos, que são polimórficos nas diferentes castas de um mesmo ninho (MAYHÉ-NUNES, 1991), e, considerando-se a mesma casta, em ninhos distintos, os caracteres são muitas vezes escassos, gerando equívocos tanto de nomenclatura quanto de identificação.

Esse dois grupos de formigas cortadeiras podem ser considerados como modelos de estudos em sistemática por demonstrarem essa dificuldade: *Atta laevigata*, atualmente classificada sem subespécies ou variedades, embora já tenham sido propostas algumas subdivisões para a espécie (GONÇALVES, 1942) e *Acromyrmex balzani*, por ter uma história taxonômica marcada por controvérsias, que residem no fato de ser considerada como uma espécie ou uma subespécie de *Acromyrmex landolti* (FOWLER, 1988; GONÇALVES, 1961; MAYHÉ-NUNES, 1991).

1.8. A Biologia Molecular como Ferramenta para Estudos em Sistemática, Biogeografia e Evolução de *Atta laevigata* e *Acromyrmex balzani*

A Biologia Molecular surgiu como uma ferramenta para detectar a variabilidade genética, ou seja, a diversidade de alelos nos vários locos de uma espécie, componente fundamental para estudar a biodiversidade. É essa variabilidade que nos permite comparar indivíduos, populações ou espécies diferentes (HILLIS et al., 1996).

A variabilidade genética, também chamada de biodiversidade molecular, além de importante para a evolução, pode ser usada para verificar as afinidades e os limites entre espécies, detectar modos de reprodução e grau de parentesco, estimar níveis de migração e dispersão nas populações e até mesmo para ajudar na identificação de organismos (AVISE, 1994).

Para estimar a variabilidade gênica são utilizados marcadores moleculares, que possuem taxas de evolução, de substituição e padrões de herança dominante e codominante diferentes. Existem diversos tipos de marcadores moleculares, portanto, e, para a escolha do mais adequado devem-se, considerar alguns critérios, listados na Tabela 1.3., e fundamentalmente, o objeto de estudo e o problema abordado (MUELLER e WOLFENBARGER, 1999; SOLÉ-CAVA, 2001).

Marcadores moleculares foram usados, com sucesso, por exemplo, para: estimar níveis de heterozigosidade e relacioná-los com parâmetros importantes na sobrevivência de espécies, como eficiência reprodutiva; analisar estruturas familiares; estimar o tipo de distribuição espacial e temporal das populações em relação ao fluxo gênico; verificar a biodiversidade e os níveis de

endemismo e identificar e acompanhar a dispersão de espécies invasoras. Além disso, é possível verificar problemas de identificação de indivíduos, identificação de espécies crípticas e formular inferências filogenéticas em grupos supra-específicos (HARTL e CLARCK, 1997).

Duas classes de marcadores moleculares muito utilizados e eficientes, DNA mitocondrial e microsatélites. Enquanto o DNA mitocondrial tem provado ser útil para estudos genealógicos e evolucionários de populações animais, seqüências de microsatélite são os mais reveladores marcadores de DNA disponíveis para inferir dinâmica e estrutura genética de populações (ZHANG e HEWITT, 2003). Esse dois marcadores moleculares foram assim escolhidos para o desenvolvimento do presente trabalho. Em seguida, são mostrados maiores detalhes sobre os marcadores de DNA mitocondrial e microsatélite.

Em formigas, a presença de marcadores moleculares em publicações científicas é cada vez maior, com estudos envolvendo AFLP (SIRVIO et al., 2006), genes nucleares (ASTRUC et al., 2004), microsatélites (VILLESEN et al., 2002), genes mitocondriais (SUMNER et al., 2004), entre outros (ROSS et al., 1999).

Tabela 1.3 Comparação dos principais marcadores moleculares (SOLÉ-CAVA, 2001). Critérios de escolha: custo da técnica, velocidade na produção de dados, padrão de herança, facilidade da técnica, maior problema envolvido. Abreviações: AFLP – amplified fragment length polymorphism; DS-PCR – double stringency PCR; PDR/RFLP – Polymerase chain reaction/Restriction fragment length polymorphism; RAPD – Random amplified polymorphic DNA; SL/VNTR – Single locus/ Variable number of tandem repeats.

Marcador	Custo	Dados	Herança	Técnica	Problema
AFLP	Médio	Rápido	Dominante	Média	Falta de homologia, dominância
Aloenzimas	Baixo	Muito rápido	Codominante	Difícil	Precisa de material fresco
DS-PCR	Baixo	Rápido	Variável	Difícil	Número de locos limitado
Microssatélites	Médio	Rápido	Codominante	Média	Busca por primers para PCR
Minissatélites	Médio	Rápido	Codominante	Difícil	Falta de homologia (exceto SL-VNTR)
PCR/RFLP	Baixo	Rápido	Variável	Fácil	Escolha do gene
RAPD	Baixo	Muito rápido	Dominante	Difícil	Falta de Homologia, dominância
Sequenciamento	Alto	Baixo	Variável	Fácil	Interpretação dos resultados, alinhamento, falta de homologia, algoritmo

1.8.1. Marcador mitocondrial

O DNA mitocondrial (mtDNA) apresenta características interessantes para estudos evolutivos, como herança exclusivamente materna (assim estuda a população de fêmeas), o que impede a recombinação, alta taxa evolutiva por mutação e polimorfismos intra-específicos, tornando-o uma molécula eficaz em estudos de filogeografia (AVISE et al., 1987 e AVISE, 2001) e de relações filogenéticas em situações não resolvidas pela morfologia.

Estruturalmente, o mtDNA é uma pequena molécula de DNA (16 – 20kb) de fita dupla e fechada circularmente através de ligações covalentes, que possui 13 genes codificadores de subunidades de enzimas envolvidas na cadeia transportadora de elétrons ou síntese de ATP (MORITZ et al., 1987), 2 de RNA ribossomal (12S e 16S) e 22 de RNA transportador, totalizando 37 genes,

alguns pequenos espaçadores intergênicos (IGS) (AVISE, 2001), além de uma região controladora de replicação e transcrição, conhecida como D-loop (em vertebrados e equinodermos) ou Região rica em A+T nos invertebrados (AVISE et al., 1987) (Figura 1.3.).

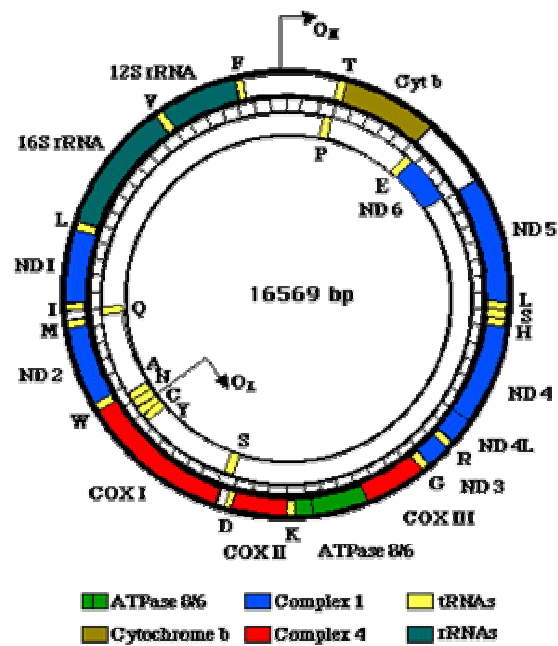


Figura 1.3 Estrutura da molécula de DNA mitocondrial, com a constituição gênica.

Seqüências de DNA mitocondrial (mtDNA) têm sido freqüentemente usadas em estudos da família Formicidae para caracterização de populações, subespécies e espécies, permitindo estudos de caráter evolutivo e filogenético, além da identificação de novos grupos (ASTRUC et al., 2004; AYALA et al., 1996; BAUR et al., 1995; CHIOTIS et al., 2000; CROZIER et al., 1995; WARD e BRADY, 2003; WETTERER et al., 1998).

Acompanhando esses estudos, encontramos uma região muito apropriada para a diferenciação e estudos evolutivos de populações de *Atta laevigata* e *Acromyrmex balzani*. 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 atíneas 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).

Dados obtidos em nosso laboratório indicam que espécimes de *Atta laevigata* (VINHA et al., 2004, 2005 e 2006) ou de *Acromyrmex balzani* (VINHA et al., 2006) coletados em diferentes localidades, podem ser diferenciados geneticamente, de modo a permitir sua classificação em grupos naturais. Essas diferenças, aliadas ao fato de que não detectamos polimorfismos moleculares entre castas de indivíduos do mesmo ninho, de certa forma contornam as dificuldades da sistemática baseada em dados morfológicos. Além disto, essas diferenças abrem a possibilidade de se confrontarem os caracteres morfológicos de indivíduos de grupos gênicos distintos, na tentativa de se detectar os caracteres morfológicos diferenciais entre estes grupos, se houver.

Recentemente, geramos seqüências nucleotídicas mitocondriais de exemplares de *Atta laevigata* coletados em Manaus-AM e Ferreira Gomes-AP (Figura 1.4.) e de um exemplar de *Acromyrmex balzani* coletado em Rio Claro-SP que foi comparado com uma seqüência IGS de um exemplar de Ilhéus-BA

(depositado no GenBank com o código de acesso AY265964) (Figura 1.5.). A comparação destas seqüências mostrou que os genes COI, COII e Leu-tRNA são muito semelhantes para ambos os espécimes nas duas espécies, mas diferenças consideráveis são encontradas na região IGS destes espécimes, indicando que a região IGS é extremamente útil para diferenciar indivíduos de *Atta laevigata* e *Acromyrmex balzani* vivendo em diferentes regiões geográficas.

A caracterização da região IGS de espécimes de *Atta laevigata* e de *Acromyrmex balzani*, coletados em todas as regiões de ocorrência destas espécies, possibilita definir os diferentes grupos gênicos existentes e confrontar os resultados com as características morfológicas que definem atualmente cada uma das espécies. Além disso, a caracterização da região IGS destes espécimes permite inferir a relação filogenética entre os diferentes grupos gênicos. A polarização das relações filogenéticas utilizando um grupo externo permite desvendar a sucessão de eventos evolutivos que resultaram nos diferentes grupos, apontando os grupos gênicos pleisiomórficos e derivados dentro de cada uma das espécies, possibilitando a reconstrução de eventos migratórios e a identificação ou confirmação de novas espécies.


```

      10      20      30      40      50      60
A laevigata Amapá      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
A laevigata Amazonas  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      70      80      90     100     110     120
A laevigata Amapá      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
A laevigata Amazonas  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      130     140     150     160     170     180
A laevigata Amapá      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
A laevigata Amazonas  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      190     200     210     220     230     240
A laevigata Amapá      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
A laevigata Amazonas  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      250     260     270     280     290     300
A laevigata Amapá      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
A laevigata Amazonas  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      310     320     330     340     350     360
A laevigata Amapá      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
A laevigata Amazonas  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      370     380     390     400     410     420
A laevigata Amapá      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
A laevigata Amazonas  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      430     440     450     460     470     480
A laevigata Amapá      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
A laevigata Amazonas  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      490     500     510
A laevigata Amapá      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
A laevigata Amazonas  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|

```

A laevigata Amapá ATTATCAATATTTCTTCTTAATTCCTTCTTGAATGATTAAGAAATATCCTCCTTTA
 A laevigata AmazonasA.....C..C.....
 A laevigata Amapá AATCATAGATTACAGAAATCCTTCTATTGCTTAATTTCTAATGTTAATTTATTTT
 A laevigata AmazonasG.....C.....T.....A.....
 A laevigata Amapá ATAACCTACTTTATTTTATTTTATTTTCTAATTTTAAATATTTTATTTTAT
 A laevigata AmazonasACTAAC..C.T.....C.AT.....C.....T.....C.....
 A laevigata Amapá CTTTAAATCAATATTTTATTTTAAATCTTAATTTTACTTCATTTTAAATTTA
 A laevigata Amazonas
 A laevigata Amapá CTAAAAATATTTATTTTATTTTAAATATGGCAGAAATAGTGCATTGAGTTTAAACTTCAA
 A laevigata AmazonasA.....
 A laevigata Amapá TTAAAAAGCCATTATATCTTTTATTTAAATTAATACATGATTAAATTCCTCTCAAG
 A laevigata Amazonas
 A laevigata Amapá ATTCTAACTCCCCAATTACGATTTAATAATTTTTCATGATTTTGTATAATTTATTT
 A laevigata AmazonasT.....T.....T.....
 A laevigata Amapá TAACTTATATTACTATTTTAACTTATTATTACATTTAG-ATTAAATCTAATAAATTT
 A laevigata AmazonasG.....
 A laevigata Amapá ATCAACCGATTTTATTTAGAAATCAAACAATT
 A laevigata Amazonas

Figura 1.4 Sequências nucleotídicas de COI (1-96 pb), IGS (97-229 pb), LeutRNA (230-317 pb) e COII (318-513 pb) de dois espécimes de *Atta laevigata*. Os pontos na segunda sequência indicam as posições conservadas, os traços (-) representam indels e as letras representam as substituições nucleotídicas.

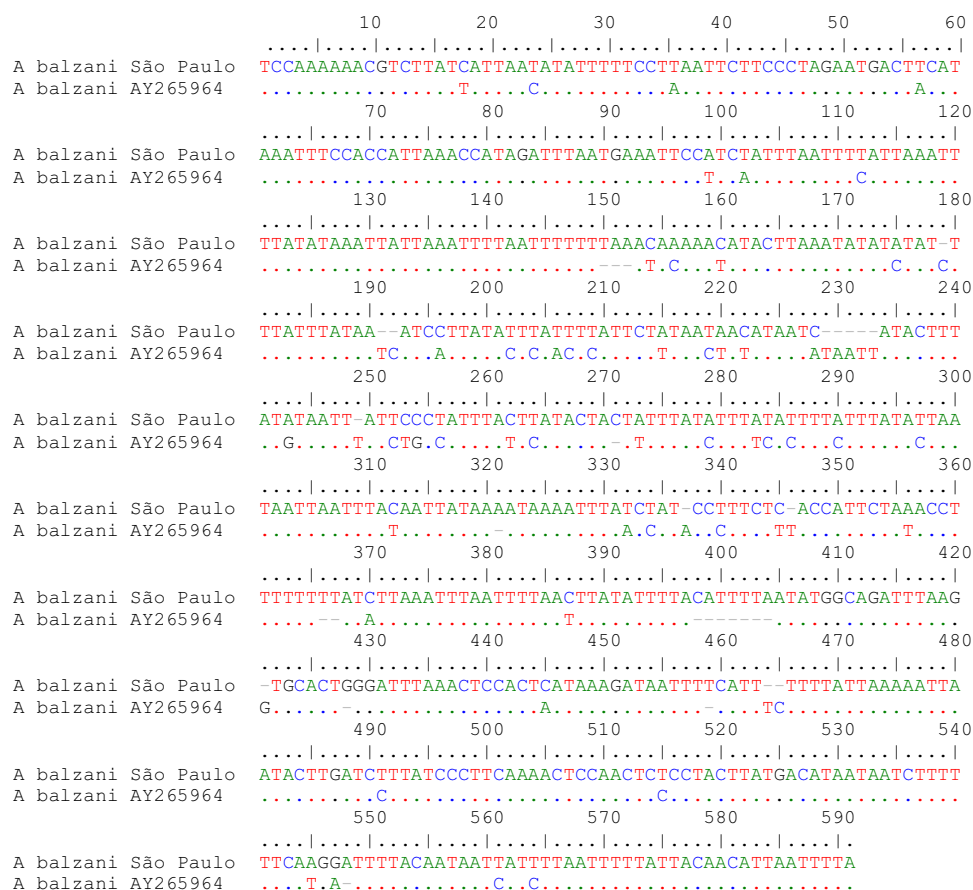


Figura 1.5 Sequências nucleotídicas de COI (1-108 pb), IGS (109-381), LeutRNA (381-460) e COII (461-591) de dois espécimes de *Acromyrmex balzani*. Os pontos na segunda sequência indicam as posições conservadas, os traços (-) representam indels e as letras representam as substituições nucleotídicas.

1.8.2. Marcador microssatélite

Os microssatélites ou sequências simples repetidas (SSR - “Simple Sequence Repeats”) são repetições “in tandem” de DNA, compostas de 1 a 6 pares de base (pb) (ASHLEY e DOW, 1994) presentes em procariotos e eucariotos, em regiões codificadoras ou não-codificadoras (TÓTH et al., 2000; LI et al., 2002). O número das unidades repetidas “in tandem” pode variar se

houver uma inserção ou deleção de um par de bases devido a um erro de pareamento durante a replicação do DNA (ELLEGREN, 2004).

Apesar de os erros serem corrigidos pelo sistema de reparo presente no DNA das células, muitos deles permanecem e tornam-se mutações (GRIFFITHS et al., 1999). As mutações geram um novo polinucleotídeo com maior ou menor número de unidades repetidas, o que explica porque os microssatélites são tão variáveis em diferentes populações de uma mesma espécie, ou seja, polimórficos (BRUFORD e WAYNE, 1993). O erro de pareamento de bases pela DNA polimerase é geralmente considerado como o mecanismo primário para geração do polimorfismo em microssatélites (LIM et al., 2004), mas pode ser também devido a um *crossing-over* desigual durante a meiose (LI et al., 2002).

As SSRs são consideradas marcadores de DNA seletivamente neutros (LI et al., 2002), de herança Mendeliana codominante, rápida evolução com altas taxas de mutação e possuem muitas vantagens como marcadores genéticos, sendo altamente polimórficos, reproduzíveis e detectáveis por PCR (JARNE e LAGODA, 1996).

Para a amplificação do DNA utilizam-se “primers” que flanqueiam as seqüências repetidas “in tandem” dos microssatélites. Assim, ocorre a amplificação *in vitro* de uma região altamente polimórfica do DNA contendo as SSRs. Os tamanhos dos fragmentos (número de repetições por indivíduo) correspondentes de cada alelo presente em determinado indivíduo são determinados analisando-se o produto da amplificação em eletroforese. A

amplificação é altamente sensível, além de ser uma técnica rápida (WILLIAMS et al., 1990) e permite que as análises do polimorfismo sejam realizadas.

Assim, marcadores microssatélites representam uma eficiente ferramenta para estimar diversidade genética, estrutura de populações, variação geográfica e filogenia em organismos proximamente relacionados (ZHANG e HEWITT, 2003).

Em formigas, a aplicabilidade desses marcadores também tem sido verificada em estudos de variabilidade genética (ORTIUS-LECHNER et al., 2000; THORÉN et al., 1995; VILLESEN et al., 1999; VILLESEN et al., 2002), mais especificamente, em espécies de formigas do gênero *Atta*, como *Atta colombica* (THORÉN et al., 1995; FJERDINGSTAD et al., 1998) e *Atta sexdens* (FJERDINGSTAD e BOOMSMA, 2000), auxiliando na caracterização molecular de populações dessas espécies.

1.9.A Filogenia como forma de análise e interpretação de dados moleculares

O desenvolvimento do método de reconstrução filogenética mudou fundamentalmente a forma de analisar e interpretar dados moleculares, principalmente com o advento da reação em cadeia da polimerase (PCR – polymerase chain reaction) e à introdução de sensíveis marcadores moleculares (ZHANG e HEWITT, 2003). Os efeitos de tais avanços técnicos são tão profundos que transformaram a tradicional genética de populações, ao demonstrarem os princípios de inferência de eventos que aconteceram no

passado, contribuindo para o entendimento da evolução e da história natural dos organismos.

Para a realização de análises para a recuperação de árvores filogenéticas baseadas em dados moleculares é necessário conhecer algumas propriedades das seqüências a serem comparadas. Primeiramente, elas têm de ser homólogas, ou seja, apresentar ancestralidade em comum. Há três tipos de homologia: ortologia, quando as seqüências têm um único e mesmo ancestral comum; paralogia, quando se originam de uma duplicação gênica; e xenologia, quando se originam por incursão lateral (ou horizontal). Apenas seqüências ortólogas poderão fornecer informações filogenéticas sobre a história de organismos (FERNANDES-MATIOLI, 2001).

Uma vez obtidas as seqüências, estas devem ser alinhadas corretamente, o que é de extrema importância, pois um alinhamento errado pode comprometer toda a análise. Para um alinhamento correto, deve-se conhecer os diferentes tipos de mutações e substituições de nucleotídeos. Mutações ocorrem ao acaso em qualquer parte do genoma e podem ser transições, tranversões, deleções/inserções e inversões. Substituições referem-se a regiões codificantes e podem ser sinônimas (quando não há alteração do aminoácido codificado), não sinônimas (quando há alteração) e sem sentido (quando um códon de parada é gerado) (FERNANDES-MATIOLI, 2001).

Em todas as metodologias de filogenética molecular, cada posição ocupada na seqüência (nucleotídeo ou aminoácido) é considerada como um caráter do tipo multi-estado (podendo ser um dos quatro nucleotídeos ou um dos vinte aminoácidos) e cada caráter é considerado independente dos demais. A

variação dos estados de caracteres fornecerá informações filogenéticas (MATIOLI, 2001).

Metodologias filogenéticas são essencialmente estatísticas e podem ser classificadas em dois grupos principais, de acordo com seus critérios: 1) quantitativos (métodos de distância); 2) qualitativos (métodos de parcimônia e verossimilhança).

Nos métodos de distância, as diferenças entre duas seqüências são reduzidas a uma só variável (número de diferenças) e suas relações evolutivas não são consideradas. Nesse método, primeiramente calcula-se a distância, para, a seguir, reconstruir a árvore filogenética utilizando um algoritmo específico. Existem diferentes modelos que podem ser utilizados para a construção de uma matriz de distância (NEI et al., 2000; RUSSO et al., 2001). A partir dessa matriz, será reconstruída a árvore com um dado algoritmo, sendo os mais utilizados o UPGMA e Neighbor-Joining.

Nos critérios qualitativos, as diferenças entre as moléculas são consideradas como uma série de variáveis descontínuas. Os métodos mais empregados, embora não sejam os únicos, são a Máxima Parcimônia (MP) e a Máxima Verossimilhança (MV). O princípio da MP é que a hipótese mais simples, ou seja, aquela em que a árvore que apresente o menor número de passos (= menor número de mudanças de estado de caráter) será a escolhida para explicar um determinado conjunto de dados. Desse modo, não há um modelo evolutivo prévio que condiciona a reconstrução da filogenia. A MV baseia-se em modelos evolutivos explícitos de substituição de nucleotídeos. Esses modelos são avaliados quanto a sua probabilidade de explicar um

conjunto de dados de forma que reflita a história evolutiva mais verossímil. O modelo que apresentar o melhor valor de verossimilhança, que, por questões operacionais, é dado em forma logarítmica, será o escolhido como base para a reconstrução da árvore.

Tanto para a MP, quanto para MV, existem dois tipos de algoritmo de busca da melhor árvore: 1) Busca Exaustiva, em que todas as possibilidades de topologias são verificadas; 2) Busca Heurística, em que apenas um subconjunto de árvores probabilisticamente mais prováveis é examinado. Esta última, em termos práticos, reduz sensivelmente o tempo de processamento computacional que, em alguns casos, dependendo do número de seqüências comparadas, pode durar dias e até meses (HILLIS, 1996).

2. OBJETIVOS

- Caracterização molecular das diferentes populações de *Atta laevigata*, coletadas em diferentes regiões do Brasil, através da determinação da sequência nucleotídica da região gênica mitocondrial compreendendo os locos COI, IGS, Leu tRNA e COII;
- Caracterização molecular das diferentes populações de *Acromyrmex balzani*, coletadas em diferentes regiões do Brasil, através da determinação da sequência nucleotídica da região gênica mitocondrial compreendendo os locos COI, IGS, Leu tRNA e COII;
- Reconstrução da história evolutiva dos diferentes grupos gênicos dentro de *Atta laevigata* e *Acromyrmex balzani*, associada à localização geográfica dos espécimes nestes grupos;
- Caracterização morfológica externa dos espécimes estudados de *Atta laevigata* e *Acromyrmex balzani* com base nas chaves taxonômicas de identificação.

3. CAPÍTULO I:

SISTEMÁTICA MOLECULAR DE *Atta laevigata* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) BASEADA EM SEQUÊNCIAS DE DNA MITOCONDRIAL E FRAGMENTOS DE MICROSSATÉLITE

3.1. RESUMO

A formiga *Atta laevigata* (Hymenoptera: Formicidae) é uma praga agrícola que ataca pastagens, florestas cultivadas e plantas em geral, em diferentes regiões das Américas. Apesar de sua ampla distribuição geográfica e conseqüente isolamento de alguns de seus espécimes, *Atta laevigata* é atualmente classificada sem subespécies ou variedades, embora já tenham sido propostas algumas subdivisões para a espécie. A dificuldade de validação de alguns táxons surge devido ao embasamento da sistemática em caracteres morfológicos, muitos dos quais com variabilidade individual e polimorfismos nas

diferentes castas de um mesmo ninho, gerando equívocos tanto de nomenclatura quanto de identificação. Na tentativa de resolver essa dificuldade, foram examinadas seqüências de DNA mitocondrial compreendendo os locos COI, IGS, Leu tRNA e COII e três locos de microssatélites de diversas populações de *Atta laevigata* coletadas em diferentes áreas de ocorrência da espécie. O objetivo foi realizar a caracterização molecular das diversas populações e examinar as relações filogenéticas entre elas, contribuindo para a classificação da espécie em grupos naturais. Os marcadores moleculares evidenciam a existência de dois grupos gênicos simpátricos de *Atta laevigata*, largamente distribuídos pelo Brasil, sugerindo ausência de fluxo gênico entre os espécimes destes grupos, a ponto de separá-los especificamente. Estes grupos estão provavelmente isolados reprodutivamente e tratam-se, portando, de duas espécies distintas.

Palavras-chave: marcador mitocondrial, microssatélite, filogenia, *Atta laevigata*, formiga cortadeira.

3.2.ABSTRACT

The *Atta laevigata* ant (Hymenoptera:Formicidae) is an agricultural plague that attacks pastures, cultivated forests and plants in general in different areas of the Americas. Despite the wide geographical spread and consequent isolation of some of their specimens, *Atta laevigata* is nowadays classified without subspecies or varieties, although some subdivisions for the species have already been proposed. The difficulty validating some taxons appears due to the fact that systematics is based on morphologic characters, many of which

have individual variability and polymorphisms among the different casts in the same nest, thus generating either nomenclature or identification mistakes. When attempting to solve this difficulty, we have analyzed mitochondrial DNA sequences including loci COI, IGS, Leu tRNA and COII, as well as three microsatellite loci from several *Atta laevigata* populations collected in different areas where this species occurs. The purpose of this study was to carry out molecular characterization of the different populations and to analyze the phylogenetic relationships among them, thus helping to classify the species in natural groups. Molecular markers evidenced the existence of sympatric genetic groups of *Atta laevigata*, which are widely spread throughout Brazil. Such existence suggests lack of gene flow among the specimens in these groups to the point of specifically separating them. These groups are probably reproductively isolated and thus belong to different species.

Key-words: mitochondrial marker, microsatellite, phylogeny, *Atta laevigata*, leafcutter ants.

3.3. INTRODUÇÃO

As formigas cortadeiras, pertencentes ao gênero *Atta* (Myrmicinae: Attini), têm recebido atenção especial pelos danos que ocasionam ao cortarem e transportarem para os seus ninhos folhas de pastagens, florestas, plantas cultivadas e silvestres, com consideráveis prejuízos para a agricultura e para a pecuária em diferentes regiões das Américas (FOWLER e FORTI, 1986). Estas formigas apresentam alta capacidade de migração e adaptação a diversas

condições ambientais, encontrando-se amplamente distribuídas no continente, sendo o gênero *Atta*, considerado o mais derivado da Tribo Attini, com elevado número de espécies, riqueza e diversidade (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990; WEBER, 1972).

A formiga *Atta laevigata* (Smith, 1858) habita a Colômbia, Venezuela, Guiana, Bolívia e Paraguai (BORGMEIER, 1950; GONÇALVES, 1960 e MARICONI, 1970) e, no Brasil, as cinco regiões geográficas, inclusive o Estado do Acre, aparentemente recém-colonizado (FORTI et al., 2003), não sendo encontradas nos Estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (AMANTE, 1972; DELLA LUCIA et al., 1993; MARICONI, 1970 e TROPPEMAIR, 1973).

Apesar de sua ampla distribuição geográfica e conseqüente isolamento de alguns de seus espécimes, *Atta laevigata* é atualmente classificada sem subespécies ou variedades (BOLTON, 1995), embora já tenham sido propostas algumas subdivisões para a espécie. A dificuldade de validação de alguns táxons surge devido ao embasamento da sistemática em caracteres morfológicos, muitos dos quais com variabilidade individual e polimorfismos nas diferentes castas de um mesmo ninho (MAYHÉ-NUNES, 1991), gerando equívocos tanto de nomenclatura quanto de identificação (AGOSTI et al., 2000).

Para contornar, de certa forma, as dificuldades da taxonomia de formigas baseada somente em caracteres morfológicos, seqüências de DNA mitocondrial (mtDNA) têm sido freqüentemente usadas na família Formicidae para caracterização de populações, subespécies e espécies, permitindo estudos de caráter evolutivo e filogenético, além da identificação de novos

grupos (ASTRUC et al., 2004; AYALA et al., 1996; BAUR et al., 1995; CHIOTIS et al., 2000; CROZIER et al., 1995; WARD e BRADY, 2003; WETTERER et al., 1998).

Por ser um marcador dominante, o DNA mitocondrial, possui apenas informação referente a um loco, refletindo somente a história matrilineal (mtDNA em animais é herdado maternalmente). Desta forma, para uma completa caracterização genética de uma determinada espécie, é necessário incluir a herança paterna, o que pode ser conseguido através de marcadores nucleares. Entre estes marcadores, os microsatélites (SSR - “Simple Sequence Repeats”) constituem uma ferramenta importante, devido ao seu caráter codominante, elevado polimorfismo e alta reprodutibilidade (ZHANG e HEWITT, 2003).

No caso das formigas, os marcadores microsatélite têm apresentado grande eficiência em estudos de variabilidade genética, demonstrando altos níveis de polimorfismo em análises intraespecíficas (ORTIUS-LECHNER et al., 2000; THORÉN et al., 1995; VILLESEN et al., 1999; VILLESEN et al., 2002).

Com relação ao genoma mitocondrial, uma região mostrou-se muito apropriada para a 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 atíneas e é caracterizado por apresentar um alto conteúdo de A/T (adenina/ timina) e baixo índice de homoplasia, 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).

Para análise do genoma nuclear foram testados três locos de microssatélites, desenvolvidos para outras espécies de formigas do gênero *Atta*, *Atta colombica* (FJERDINGSTAD et al., 1998; THORÉN et al., 1995) e *Atta sexdens* (FJERDINGSTAD e BOOMSMA, 2000) que se mostraram altamente polimórficos nas populações estudadas.

Assim, este estudo objetiva a caracterização molecular das diferentes populações de *Atta laevigata*, coletadas em diferentes regiões do Brasil, através da determinação da seqüência nucleotídica da região gênica mitocondrial (locos COI, IGS, Leu tRNA e COII) e de locos polimórficos de microssatélite. As análises desses resultados serão realizadas através de inferências filogenéticas a partir das seqüências mitocondriais geradas e observações qualitativas dos fragmentos de microssatélite, de modo a permitir a classificação da espécie em grupos naturais.

3.4. MATERIAIS E MÉTODOS

3.4.1. Amostragem taxonômica

A espécie estudada foi a formiga *Atta laevigata* Smith, 1858 (Myrmicinae: Attini) coletada em diferentes regiões do Brasil, selecionadas ao acaso. Foram realizadas diversas coletas de *Atta laevigata*, obtendo-se dados sobre as coordenadas geográficas (latitude e longitude) de cada local coletado (Tabela 3.2. e Figura 3.1.). Cada coleta representou um ninho diferente (com o referido código de acesso), do qual foram coletadas diferentes castas de formigas,

inclusive rainhas, quando possível, para a coleção entomológica (Depositada no Laboratório de Evolução Molecular do CEIS-IB-UNESP/RC), armazenagem de testemunhos e análises moleculares.

Os espécimes coletados foram identificados através da chave taxonômica para a espécie encontrada na revisão do gênero *Atta* em Gonçalves (1942).

Tabela 3.1 Espécimes coletados de *Atta laevigata*. São mostrados o número de cada coleta, o respectivo código, e a localização (cidade/estado) com coordenadas geográficas do local (longitude/latitude).

coleta N°	Código	Local de Coleta	longitude(W)	latitude (S)
1	E 293	Botucatu – SP	-48,273	-22,54
2	E 632	Uberlândia – MG	-48,28	-18,899
3	E 633	Uberlândia – MG	-48,28	-18,899
4	E 670	Brasília – DF	-47,91	-15,780
5	E 671	Brasília – DF	-47,91	-15,780
6	E 677	Araguainha – MT	-53,01	-16,84
7	E 678	Serranópolis – GO	-49,606	-15,873
8	E 971	Sinop – MT	-55,518	-12,092
9	E 973	Ferreira Gomes – AP	-51,333	0,739
10	E 974	Ferreira Gomes – AP	-51,333	0,739
11	E 975	Ferreira Gomes – AP	-51,333	0,739
12	E 976	Ferreira Gomes – AP	-51,333	0,739
13	E 978	Macapá – AP	-51,507	0,6772
14	E 979	Macapá – AP	-51,513	0,1715
15	E 983	Macapá – AP	-51,125	0,1676
16	E 985	Santarém – PA	-54,78	-2,6434
17	E 986	Santarém – PA	-54,9	-2,8213
18	E 987	Santarém – PA	-54,929	-2,9392
19	E 988	Manaus – AM	-59,739	-2,6949
20	E989	Manaus-AM	-59,739	-2,6949
21	E 990	Manaus – AM	-59,739	-2,6949
22	E 991	Manaus – AM	-59,739	-2,6949
23	GV150805-01	Botucatu-SP	-48,334	-22,46
24	GV150805-02	Botucatu-SP	-48,334	-22,46
25	GV150805-03	Botucatu-SP	-48,334	-22,46
26	GV150805-04	Botucatu-SP	-48,334	-22,46
27	GV150805-06	Botucatu-SP	-48,3159	-22,957
28	GV150805-09	Botucatu-SP	-48,493	-22,571
29	GV150805-11	Botucatu-SP	-48,493	-22,571
30	GV150805-13	Botucatu-SP	-48,546	-22,562
31	GV150805-17	Botucatu-SP	-48,9180	-22,9400
32	GV150805-18	Botucatu-SP	-49,075	-22,526
33	GV150805-19	Botucatu-SP	-49,075	-22,526
34	GV150805-20	Botucatu-SP	-49,16	-22,49

35	GV150805-21	Botucatu-SP	-49,16	-22,49
36	GV150805-25	Botucatu-SP	-49,163	-22,485
37	GV150805-37	Bauru-SP	-49,014	-22,21
38	GV150805-38	Bauru-SP	-49,014	-22,21
39	GV150805-39	Bauru-SP	-49,014	-22,21
40	JMGV051014-01	Bauru-SP	-48,562	-22,193
41	JMGV051014-05	Bauru-SP	-49,012	-22,203
42	JMGV051014-06	Bauru-SP	-49,048	-22,211
43	JMGV051014-08	Bauru-SP	-49,139	-22,205
44	JMGV051014-10	Bauru-SP	-49,014	-22,201
45	JMGV051014-11	Bauru-SP	-49,039	-22,194
46	JM051025-41	Bauru-SP	-49,012	-22,203
47	JM051025-46	Bauru-SP	-49,014	-22,205
48	JM051025-55	Bauru-SP	-49,057	-22,234
49	MB160306-04	Itirapina-SP	-47,842	-22,254
50	MB160306-05	Itirapina-SP	-47,842	-22,254
51	MB160306-06	Itirapina-SP	-47,842	-22,254
52	MB160306-24	Jaú-SP	-48,524	-22,359
53	MB160306-29	Jaú-SP	-48,524	-22,359
54	MB160306-31	Jaú-SP	-48,524	-22,359
55	MB160306-41	Ribeirão Bonito-SP	-48,151	-22,083
56	MB160306-42	Ribeirão Bonito-SP	-48,151	-22,083
57	MB160306-43	Ribeirão Bonito-SP	-48,151	-22,083
58	MB160306-44	Ribeirão Bonito-SP	-48,151	-22,083
59	MB160306-45	Ribeirão Bonito-SP	-48,151	-22,083
60	MB160306-46	Ibaté-SP	-48,033	-22,055
61	MB160306-47	Ibaté-SP	-48,033	-22,055



Figura 3.1 Mapa com os pontos de coleta de *Atta laevigata*, de acordo com a tabela 3.3.

3.4.2. Extração de DNA

A extração de DNA foi feita a partir de formigas operárias trituradas inteiras, através de maceração com o auxílio de um pistilo plástico, no interior de microtubos de 1,5 ml, realizada em banho de gelo, gelo seco ou congelados imediatamente em Nitrogênio líquido. O material triturado foi submetido à lise celular através de solução de lise – TNES (Tris 250 mM pH 7,5; NaCl 2M; EDTA 100 mM; SDS 2%) e incubado a 55° C por 3 horas. As proteínas foram

precipitadas com NaCl 5M e o DNA genômico precipitado com isopropanol 100%, lavado com etanol 70% e solubilizado em tampão TE.

3.4.3. Amplificação dos locos mitocondriais COI-IGS-LeutRNA-COII

Os marcadores mitocondriais foram amplificados através de reações de PCR. Cada reação continha 100 ng de DNA genômico, 6 pmol de cada iniciador e 1 porção liofilizada de reagente PCR *Ready-to-Go* (Pharmacia 27-9555-01) dissolvida em água esterilizada. A reação foi realizada nas seguintes condições: uma desnaturação (94° C, 5 min) seguida de 35 ciclos de PCR (94° C-1 min, 47° C-1 min, 72° C-2 min) e uma extensão final (65° C, 15 min), terminando com armazenagem a 4° C. Para o fragmento contendo os locos COI-IGS-LeutRNA-COII foram utilizados os iniciadores C1-J-2828 (5'-AATATATTATCTTGTTTCATTCTTTCATA-3') e C2-N-3386 (5'-GTTTCATTTGGTCATAAGTTTCAGTA-3') (BACCI et al., 2001).

3.4.4. Amplificação dos locos de microssatélite

Os locos de microssatélite foram amplificados através de reações de PCR com os pares de iniciadores (forward e reverse) para cada loco (Tabela 3.1.). Cada reação continha 100 ng de DNA genômico, 6 pmol de cada iniciador e 1 porção liofilizada de reagente PCR *Ready-to-Go* (Pharmacia 27-9555-01) dissolvida em água esterilizada. Cada loco foi amplificado de acordo com as condições de amplificação definidas em Fjerdingstad et al., 1998 (locos Etta 5-6TF e Etta 7-8TF) e Fjerdingstad e Boomsma, 2000 (loco Etta 1-2TF).

Tabela 3.2 Informações sobre os locos de microssatélite usados para a análise genética de *Atta laevigata* e a sequência dos primers utilizados para amplificar estas regiões.

Locos	Repetição	Sequência dos Primers
Etta 5-6TF	(AG)24	5'- CAG CTC TCG TAG AAG AGT AGC ATG -3' 5'- CTG AAC TTC GCC CAG CG -3'
Etta 7-8TF	(AC)27	5'- GGG AGA TAT TAG ATG AAT ATA TCC -3' 5'- TAT TCG CAA GTG TTG TAT TAT G
Etta 1-2TF	(AT)5(TG)43TCAG(TA)6	5'- GTA TTG TTC GAT GAG AAA TAG AGC -3' 5'- CGG CTG ACG TGT TGA ATC -3'

3.4.5. Purificação dos amplicons obtidos

Os marcadores mitocondriais amplificados foram purificados por cromatografia de afinidade, utilizando GFXTMPCR DNA e Gel Band Purification Kit da GE HealthCare (27-9602-01), seguindo as orientações do fabricante. Os marcadores nucleares foram precipitados com Acetato de Sódio 3M (10% volume final da reação) e Álcool Etílico Absoluto (2X volume final da reação), lavados com álcool etílico 70% (2X volume final da reação) e hidratados com 20 µL de tampão de eluição.

3.4.6. Eletroforese

Os produtos de extração de DNA, amplificação dos marcadores mitocondriais e purificação desses amplicons foram analisados e confirmados através de eletroforese em gel de agarose 1 %, em TBE 1X utilizando marcador de peso molecular (ladder) de 1 kb. A visualização de DNA se deu após imersão dos géis em solução de Brometo de Etídio 1 µg/ml, para saturação dos mesmos, e com o auxílio de transiluminador equipado com

lâmpadas para UV longo ~356nm. Os produtos de amplificação e purificação dos locos de microssatélite foram separados em gel de agarose metaphor 3,5%, em TBE 1X utilizando marcador de peso molecular (ladder) de 100 pb. Os géis foram corados com solução de Brometo de Etídio 1 µg/ml e fotografados para análise utilizando-se câmera digital KODAK 2Mpixels.

3.4.7. Seqüenciamento de DNA

O seqüenciamento dos marcadores mitocondriais foi realizado com os mesmos iniciadores utilizados na amplificação dos genes mitocondriais. A reação de seqüenciamento continha 100 ng de cada amplicon purificado, 6 pmol de iniciador, 2 µL de Tris 100 mM, MgCl₂ 2,5 mM, pH 9.0 (100mL), 2,5 µL de Big Dye Terminator (PE Applied Biosystems 4314415) e foi conduzida com uma desnaturação inicial (90 seg a 96° C), seguida de 25 ciclos de PCR (12 seg a 96° C, 6 seg a 50° C, 4 min a 60° C). Após a reação, os produtos de seqüenciamento foram precipitados com 80 µL de isopropanol 75%, lavados com etanol 70% e separados em gel de poliacrilamida em um seqüenciador ABI 377 (PE Applied Biosystems).

3.4.8. Alinhamento das seqüências mitocondriais

As seqüências diretas e reversas de cada amostra foram editadas e as seqüências consenso alinhadas, através de alinhamento múltiplo com o programa ClustalW (THOMPSON et al., 1994) integrado ao programa BIOEDIT Sequence Alignment Editor (HALL, 1999).

3.4.9. Análise dos resultados

Análises filogenéticas

Com as seqüências editadas e alinhadas, foram realizadas as análises de transições e transversões utilizando o programa DAMBE (XIA e XIE, 2001) e, em seguida, as análises filogenéticas de máxima parcimônia, com o programa PAUP* 4b10 (SWOFFORD, 2000). Gaps foram considerados como quinta base, uma vez que também possuem informação filogenética (GIRIBET e WHEELER, 1999). Foram obtidas árvores por meio de busca heurística (SWOFFORD et al., 1996) via adição aleatória com 1000 replicações. Das árvores mais parcimoniosas, foi obtida e apresentada a árvore de consenso semi-estricto. O suporte dos ramos foi calculado no programa PAUP* pela análise de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985; SWOFFORD et al., 1996), conduzida com adição aleatória de seqüências, em 1000 réplicas do conjunto de dados, com 100 buscas heurísticas em cada uma das réplicas, e pela análise de Bremer (BREMER, 1994) ou “decay index” conduzida através de busca heurística com 1000 replicações através do programa PRAP – Parsimony Ratchet Analyses using PAUP* (MÜLLER, 2004). Para servir de grupo externo às formigas *Atta laevigata* foram empregadas representantes de outras espécies de *Atta*, como *Atta bisphaerica*, *Atta sexdens*, *Atta cephalotes* e *Atta capiguara*. Os cladogramas foram desenhados com o auxílio do programa TreeView (PAGE, 1998) e do programa TreeGraph 1.0rc1 (MÜLLER e MÜLLER, 2004).

Análise dos fragmentos de microsatélite

A genotipagem dos fragmentos de DNA amplificados para cada loco de microsatélite foi efetuada realizando-se uma análise qualitativa, comparando-se a posição de migração dos fragmentos amplificados em relação à posição das bandas de tamanho conhecido do marcador de massa molecular (ladder) de 100 bp.

3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com os espécimens de *Atta laevigata* coletados foram realizadas as análises moleculares, que incluíram a extração de DNA, amplificação dos locos mitocondriais e nucleares, purificação desses amplicons e as análises para cada marcador: DNA mitocondrial baseado em análise de seqüenciamento e DNA nuclear baseado em análises de fragmento.

Assim, para o marcador mitocondrial foram geradas as seqüências nucleotídicas (~520 pares de base) de *Atta laevigata* para a porção 3' da região mitocondrial: COI (96 nucleotídeos), IGS (de 107 a 144 nucleotídeos), Leu tRNA (91 a 97 nucleotídeos) e COII (194 nucleotídeos), utilizando os iniciadores (*forward* e *reverse*) mencionados para a região estudada.

Para cada ninho foi considerada somente uma seqüência nucleotídica mitocondrial representativa e utilizada nas análises filogenéticas posteriores. Isso porque não foram detectados polimorfismos na seqüência de DNA mitocondrial entre castas de indivíduos do mesmo ninho, por se tratar de uma molécula de herança dominante.

Nas regiões codificadoras, COI e COII pudemos observar os sítios polimórficos (Tabelas 3.3. e 3.4.) marcando mudanças do tipo transição (TS) ou transversão (TV) nucleotídicas, e verificando se estas representaram mudanças sinônimas, ou não sinônimas, ou seja, que promoveram mudança no aminoácido codificado.

Com o levantamento das transições e transversões para as moléculas de COI e COII, podemos visualizar de forma gráfica (Figura 3.2.) que o número de mudanças do tipo transição, é maior que o de transversões. Apenas as substituições de primeira e segunda posição provocaram mudança no aminoácido traduzido, enquanto mudanças de terceira posição não representaram substituição do aminoácido. Apesar dessas mudanças, as moléculas de COI e COII são extremamente conservadas entre os espécimes, pois regiões codificadoras têm uma taxa mutacional e evolutiva menor quando comparadas às regiões controladoras e aos espaçadores intergênicos no genoma mitocondrial.

Tabela 3.3 Sítios Variáveis observados em COI (região codificante) de *Atta laevigata*. A localização dos sítios polimórficos é mostrada com base na sequência consenso e os números das sequências correspondentes de acordo com a Tabela 3.3. de coleta. A posição dos códons é dada abaixo, e mudanças não-sinônimas são marcadas com um asterisco.

COI (96pb)		31	33	51	54	73	87
Posição dos Sítios Polimórficos							
Seq consenso		C	A	C	C	G	C
Sequências	8-11	T					
	2-15		T			A	T
	37-61		T		T	A	T
	9-15			T			
	18		T				
	2, 4-15				T		
Posição do Códon		2* ¹	3	3	3	2* ²	3
Tipo de Substituição		TS	TV	TS	TS	TS	TS

*¹ LEU (Leucina) – PHE (Fenilalanina); *² CYS (Cisteína) – TYR (Tirosina)

Tabela 3.4 Sítios Variáveis observados em COII (região codificante) de *Atta laevigata*. A localização dos sítios polimórficos é mostrada com base na sequência consenso e os números das sequências correspondentes de acordo com a Tabela 3.3. de coleta. A posição dos códons é dada abaixo, e mudanças não-sinônimas são marcadas com um asterisco.

COII (194 pb)		364	373	376	379	382	388	406	412	433	466	487	490	493	515	517	519
Posição dos Sítios Polimórficos																	
Seq consenso		C	T	T	C	A	T	T	T	T	T	T	C	C	A	A	T
Sequências	2-22, 37-61	T															
	23-26		C														
	9-15			C													
	37, 39-43, 46, 48-50, 52-55, 58, 61				T												
	16-22					T											
	2-15, 37-61						C										
	6							C									
	2								C								
	17, 18									C							
	61										C		T				
	9											C					
	23-28, 30, 33, 34													T			
	5														C		
	17															C	
	17, 19																A
Posição do Códon		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1* ¹	3	2* ²
Tipo de Substituição		TS	TS	TS	TS	TV	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TV	TV	TV

*¹ THR (Treonina) – PRO (Prolina); *² ILE (Isoleucina) – ASN (Asparagina)

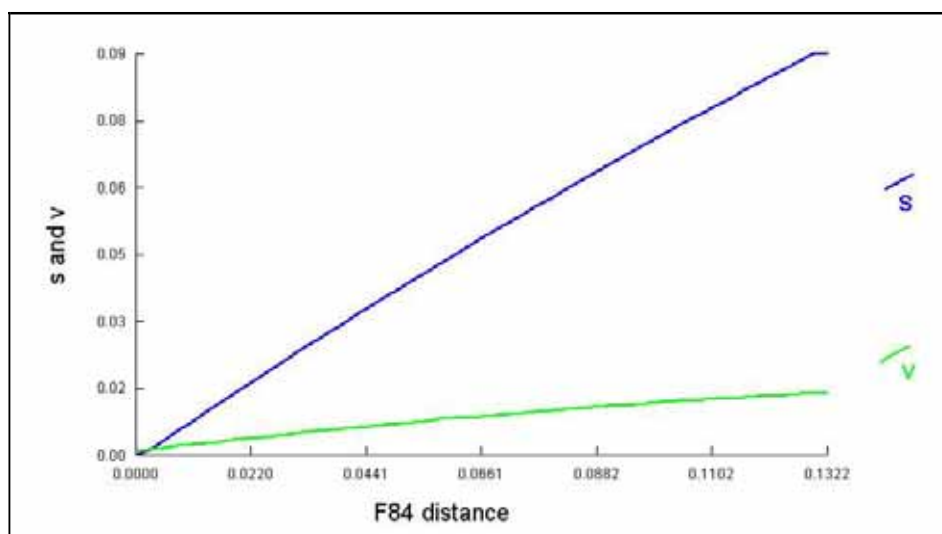


Figura 3.2 Frequência de transições (s) e transversões (v) em função da divergência entre sequências nucleotídicas de COI e COII de *Atta laevigata*.

A região do Leu tRNA, também mostrou-se extremamente conservada entre os espécimes (Tabela 3.5.), apenas com variações do tipo indel (inserção/deleção).

Tabela 3.5 Sítios Variáveis observados na região gênica Leu tRNA de *Atta laevigata*.

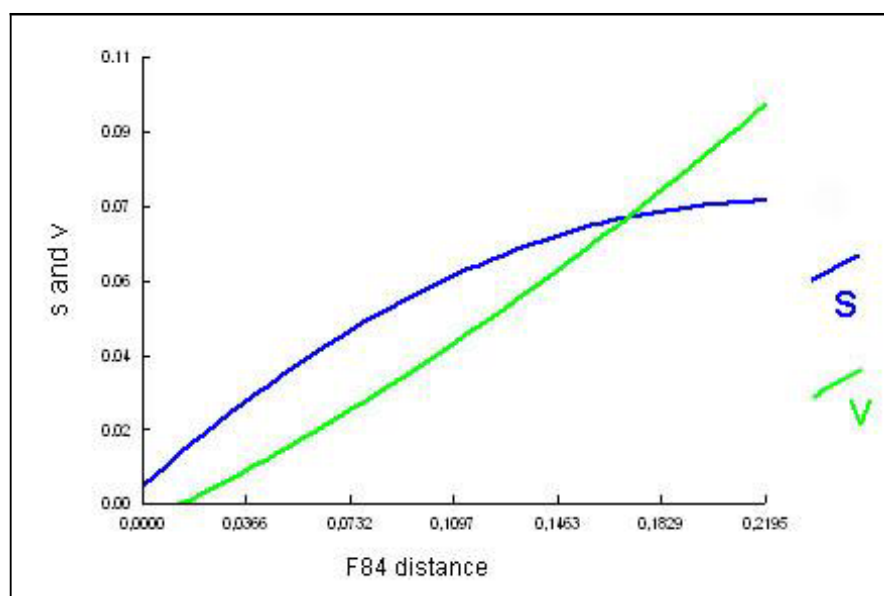
Mudança nucleotídica	Posição Alinhamento	Sequências
indel 6	posição 278	2-8, 37-61
indel 1	posição 332	16-36

Já a região IGS, não codificadora, mostrou-se bastante variável, com mudanças do tipo indel (inserção-deleção) marcando seqüências de uma mesma região geográfica (Tabela 3.6.).

Tabela 3.6 Sítios Variáveis observados na região espaçadora IGS de *Atta laevigata*.

Mudança nucleotídica	Posição Alinhamento	Sequências
indel 3	posição 103	2-15, 19-22, 37-61
indel 1	posição 126	2-15, 37-61
indel 4	posição 132	1, 23-36
indel 3	posição 133	2-15, 37-61
indel 5	posição 138	1, 23-36
indel 3	posição 225	1, 16-36

Nesta região, o número de transversões é maior que o de transições, pois a região é caracterizada por alto conteúdo A/T (adenina/timina), de maneira que as mudanças nucleotídicas ocorrem mais facilmente entre adenina e timina, que configuram transições. A figura 3.3. mostra as curvas de saturação de transições e transversões presentes na região do espaçador intergênico.

**Figura 3.3** Frequência de transições (s) e transversões (v) em função da divergência entre seqüências nucleotídicas de IGS de *Atta laevigata*.

Com as seqüências geradas para os espécimes coletados de *Atta laevigata*, realizamos os cladogramas, através de máxima parcimônia, para cada loco separado, nos quais pudemos observar que a região COI não define os grupos, por ser uma molécula muito conservada; a região IGS define dois clados estruturados geograficamente; a região Leu tRNA não define os grupos, por ser muito conservado e a região COII define alguns grupos (grupo com espécimes de Amapá, grupo com espécimes do Amazonas e Pará, e o grupo com espécimes de Botucatu-SP).

Assim, optou-se por realizar a filogenia deste grupo considerando os locos COI, IGS, Leu tRNA e COII juntos. A figura 3.4. mostra o consenso estrito do cladograma mais parcimonioso obtido na análise de 530 caracteres, sendo 443 constantes, 6 não informativos para parcimônia e 81 informativos para parcimônia. Como grupo externo aos espécimes de *Atta laevigata* foram incluídas duas seqüências representativas de *Atta bisphaerica* dentre as seqüências utilizadas durante a análise, como de *Atta sexdens*, *Atta capiguara* e *Atta cephalotes*, pois independente do número de grupos externos considerados, não houve alteração na topologia demonstrada.

É possível observar, através das análises filogenéticas, a formação de dois grupos gênicos distintos (grupos irmãos), com evidente estrutura geográfica: Grupo 1, representado pelos espécimes de Botucatu-SP, Santarém-PA e Manaus-AM; e Grupo 2, representado pelos espécimes de Uberlândia-MG, Brasília-DF, Serranópolis-GO, Araguainha-MT, Sinop-MT, Bauru-SP, Itirapina-SP, Jaú-SP, Ribeirão Bonito-SP, Ibaté-SP, Ferreira Gomes-AP e Macapá-AP.

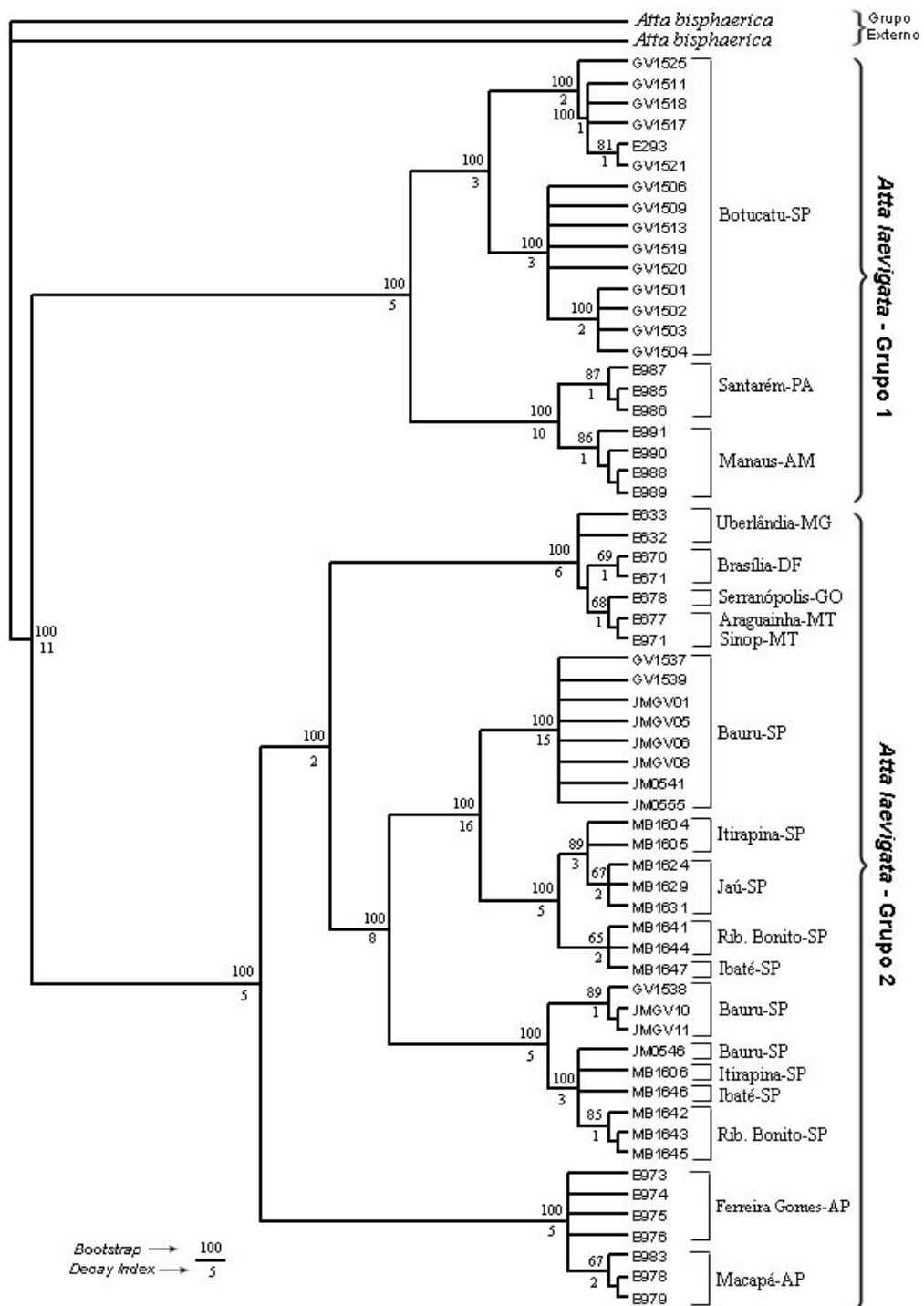


Figura 3.4 Consenso estrito entre as 17 árvores mais parcimoniosas (105 passos) obtidas a partir de 81 caracteres informativos para parcimônia dos loci COI, IGS, Leu tRNA e COII de 61 espécimes de *Atta laevigata* e dois de *Atta bisphaerica* (grupo externo). São mostrados os valores de bootstrap e o suporte de Bremer (decay index), acima e abaixo de cada ramo, respectivamente. CI = 0.8857, HI = 0.1143 e RI = 0.9698.

Esses dois grupos gênicos simpátricos de *Atta laevigata* estão largamente distribuídos pelo Brasil, sugerindo ausência de fluxo gênico entre os espécimes destes grupos, a ponto de separá-los especificamente. Além disso, estes grupos estão provavelmente isolados reprodutivamente e tratam-se, portando, de duas espécies distintas.

Assim, duas populações de ocorrência próxima, como Botucatu-SP (G1) e Bauru-SP (G2) poderiam ser consideradas como espécies simpátricas, que possuem diversidade genética habitando a mesma faixa geográfica. É possível notar também populações vivendo em diferentes locais, que não apresentam variação gênica significativa a ponto de separá-las filogeneticamente, demonstrando um alto índice de similaridade entre as seqüências, como nos espécimes de Uberlândia-MG, Brasília-DF, Serranópolis-GO, Araguainha-MT e Sinop-MT.

O suporte dos ramos, inferido pelo índice de bootstrap e pela análise de Bremer, sustentam a definição de todos os clados e também indicam a origem monofilética do grupo.

A definição prévia dos grupos (Grupo 1 e Grupo 2), através da filogenia molecular, serviu como guia para orientar as análises com os marcadores microssatélites. Assim, com os mesmos exemplares coletados foi realizada a análise dos três locos de microssatélite através da amplificação das extrações de DNA total, anteriormente realizadas.

Inicialmente foram realizadas as amplificações para os espécimens pertencentes ao Grupo 1 e ao Grupo 2, na tentativa de se detectar possíveis polimorfismos moleculares entre populações de um mesmo grupo. Para

determinar estes grupos, cada indivíduo foi analisado pela presença e ausência de bandas. Ou seja, os indivíduos que apresentam o mesmo perfil eletroforético, foram classificados como pertencentes ao mesmo grupo, e aqueles com padrões eletroforéticos diferentes, foram classificados em grupos diferentes.

Nossos resultados apontam para um mesmo padrão de bandas entre as populações estudadas e pertencentes ao mesmo grupo, ou seja, o polimorfismo intragrupo, por marcador analisado, é zero. Esses resultados também puderam indicar que há polimorfismos entre os grupos definidos, considerando um mesmo marcador (Figura 3.5.). Portanto, os resultados da amplificação, através de eletroforese de marcadores microsatélite, demonstram ser possível separar os indivíduos estudados em dois grupos distintos, os mesmos grupos anteriormente definidos com a filogenia molecular de seqüências mitocondriais.

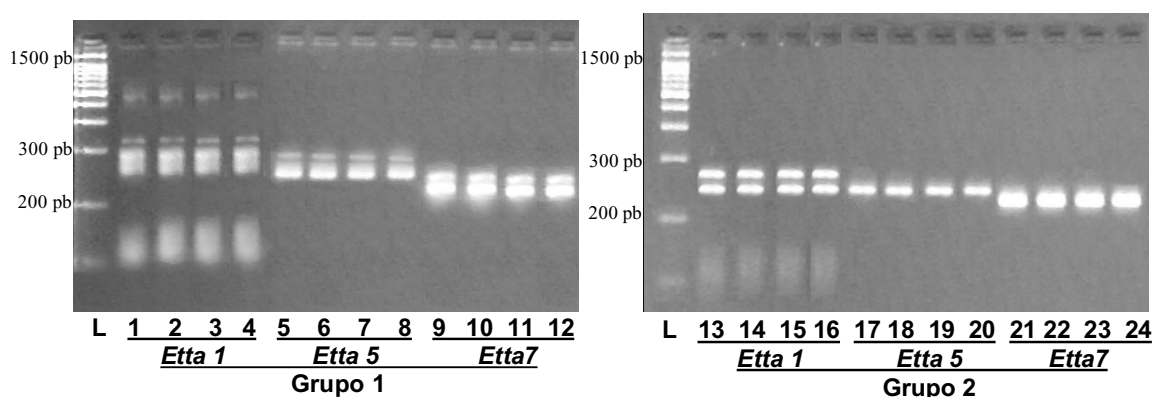


Figura 3.5 Polimorfismo através de marcadores microsatélite em populações de *Atta laevigata*. São mostradas as amostras analisadas e os marcadores microsatélite (*Etta* 1, *Etta* 5 e *Etta* 7) para o Grupo 1 e Grupo 2, onde: L – *ladder* (padrão molecular); 1, 5, 9 = GV150805-06; 2, 6, 10 = GV150805-21; 3, 7, 11 = E987; 4, 8, 12 = E990; 13, 17, 21 = E978; 14, 18, 22 = MB160306-29; 15, 19, 23 = GV150805-37; 16, 20, 24 = E971.

O fato de os grupos encontrados não compartilharem todos os alelos amplificados sugere que há distância genética significativa entre eles e que constituem populações geneticamente isoladas, possivelmente, espécies diferentes.

Não foi possível determinar com exatidão o número de bandas e de bases nucleotídicas de cada fragmento de DNA apresentado nos géis. Isso só seria possível através do isolamento das bandas e clonagem seguida de seqüenciamento.

Porém, há evidências significativas da existência de dois grupos gênicos simpátricos entre populações de *Atta laevigata*, sustentadas por quatro marcadores mitocondriais e três marcadores nucleares. Esses grupos gênicos certamente estão isolados reprodutivamente com ausência de fluxo gênico, portanto, trata-se de duas espécies distintas.

3.6. CONCLUSÃO

As análises moleculares e filogenéticas permitiram determinar dois grupos gênicos parcialmente simpátricos de *Atta laevigata*, largamente distribuídos pelo Brasil, sugerindo ausência de fluxo gênico entre os espécimes destes grupos, a ponto de separá-los especificamente.

Nossos resultados indicam a necessidade do uso da sistemática molecular para definição dos grupos naturais dentro de *Atta laevigata*, demonstrando a eficiência do fragmento de DNA mitocondrial estudado e dos locos de marcadores microssatélite selecionados, em estudos de variabilidade genética

entre populações de *Atta laevigata* que não podem ser facilmente diferenciadas morfologicamente.

Além disso, os resultados encontrados apontam o potencial destes marcadores para resolver o limite entre espécies do gênero *Atta* e a definição de grupos entre amostras representativas da espécie estudada, de diferentes regiões geográficas.

3.7.REFERÊNCIAS

AGOSTI, D.; MAJER, J. D.; ALONSO, L. E.; SCHULTZ, T. R. **Ants: standard methods for measuring and monitoring biodiversity**. Washington: Smithsonian Institution Press, 2000. 280 p.

AMANTE, E. **Influência de alguns fatores microclimáticos sobre a formiga saúva *Atta laevigata* (F. Smith, 1858), *Atta sexdens rubropilosa* (Forel, 1908), *Atta bisphaerica* (Forel, 1908) e *Atta capiguara* (Gonçalves, 1944) (Hymenoptera, Formicidae), em formigueiros localizados no estado de São Paulo**. 1972. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

ASTRUC, C.; JULIEN, J. F.; ERRARD, C.; LENOIR, A. Phylogeny of ants (Formicidae) based on morphology and DNA sequence data. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 31, p. 880-893, 2004.

AYALA, F.J.; WETTERER, J.K.; LONGINO, J.T.; HARTL, D.L. Molecular phylogeny of *Azteca* ants (Hymenoptera: Formicidae) and the colonization of *Cecropia* trees. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 5, p. 423-428, 1996.

BACCI JR., M. et al. A molecular marker for evolution studies of closely related specimens of higher Attini ants. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 30., 2001, Caxambu.

BAUR, A.; CHALWATZIS, N.; BUSCHINGER, A.; ZIMMERMANN, F.K. Mitochondrial DNA sequences reveal close relationships between social parasitic ants and their host species. **Curr. Genet.**, v. 28, p. 242-247, 1995.

BOLTON, B. **A new general catalogue of the ants of the world**. Cambridge: Harvard University Press, 1995. 504 p.

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

BREMER, K. Branch support and tree stability. **Cladistics**, v. 10, p. 295–304, 1994.

CHIOTIS, M.; JERMIIN, L. S.; CROZIER, R. H. A molecular frame-work for the phylogeny of the ant subfamily Dolichoderinae. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 17, p. 108-116, 2000.

CROZIER, R. H.; DOBRIC, N.; IMAI, H.T.; GRAUR, D.; CORNUET, J. M.; TAYLOR, R. W. Mitochondrial-DNA sequence evidence on the phylogeny of Australian jack-jumper ants of the *Myrmecia pilosula* complex. **Evol.**, v. 4, p. 20-30, 1995.

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

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p. 783-791, 1985.

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

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

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

FOWLER, H.G.; FORTI, L.C. Economics of grass-cutting ants. In: LOFGREN, C. S.; VANDER MEER, R.K. (Ed.). **Fire ants and leaf-cutting ants: biology and management**. Boulder: West-View Press, 1986. p. 18-35.

GIRIBET, G.; WHEELER, W.C. On gaps. **Mol. Phyl. Evol.**, v.13, n. 1, p. 132-143, 1999.

GONÇALVES, C.R. Contribuição para o gênero *Atta* Fabr., das formigas saúvas. **Bol. Soc. Bras. Agronomia**, Rio de Janeiro, v.5, n.3., 1942.

GONÇALVES, C.R. Distribuição, biologia e ecologia das saúvas. **Divulgação Agrônômica**, 1960.

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

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E.O. **The ants**. Cambridge: The Belknap Press of Harvard University Press, 1990.

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

MAYHÉ-NUNES, A. J. **Estudo de *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae) com ocorrência constatada no Brasil**: subsídios para uma análise filogenética. 1991. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

MÜLLER, J.; MÜLLER, K. TreeGraph: automated drawing of complex tree figures using an extensible tree description format. **Mol. Ecol. Notes**, v. 4, p. 786-788, 2004.

MÜLLER, K. PRAP - calculation of Bremer support for large data sets. **Mol. Phyl. Evol.**, v. 31, p. 780 -782, 2004.

ORTIUS-LECHNER, D., GERTSCH, P.J. e BOOMSMA, J.J. Variable microsatellite loci for the leafcutter ant *Acromyrmex echinator* and their applicability to related species. **Mol. Ecol.**, v. 9, p. 114-116, 2000.

PAGE, R. D. M. **TreeView**: Tree drawing software for Apple Macintosh and Microsoft Windows, versão 1.5.2. Glasgow: Institute of Biomedical & Life Sciences, University of Glasgow, 1998.

SMITH, F. **Catalogue of hymenopterous insects in the collection of the British Museum**. 1858. pt 6, p. 180-187.

SWOFFORD, D. L.; OLSEN, G. J.; WADDELL, P. J.; HILLIS, D. M. Phylogenetic Inference. In Hillis, D.M.; Moritz, C.; Mable, B. K. (Ed.), **Mol. System.**, Sunderland: Sinauer, 1996. p.407-425.

SWOFFORD, D.L. **Phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0b4a**. Champaign: Illinois Natural History Survey, 2000.

THOMPSON, J.D.; HIGGINGS, D.G.; GIBBSON, T.J. ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gaps penalties and weight matrix choice, **Nuc. Ac. Res.** 1994.

THORÉN, P.A.; PAXTON, R.J.; ESTOUP, A. Unusually high frequency of (CT)_n and (GT)_n microsatellite loci in a yellowjacket wasp, *Vespula rufa* (L.) (Hymenoptera: Vespidae). **Insect Mol. Biol.**, v. 4, n. 3, p. 141-148, 1995.

TROPPEMAIR, H. **Estudo Zoogeográfico e Ecológico das formigas do gênero *Atta* (Hymenoptera) com ênfase sobre a *Atta laevigata* (F. Smith,**

1858), no estado de São Paulo. 1973. Tese (Livre-Docência) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Rio Claro.

VILLESEN, P.; GERTSCH, P.J.; FRYDENBERG, J.; MUELLER, U.G.; BOOMSMA, J.J. Evolutionary transitions from single to multiple mating in fungus-growing ants. **Mol. Ecol.**, v. 8, p.1819–1825, 1999.

VILLESEN 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.**, v. 269, p.1541–1548, 2002.

WARD, P. S.; BRADY, S. G. Phylogeny and biogeography of the ant subfamily Myrmiciinae (Hymenoptera: Formicidae). **Invert. Syst.**, v. 17, p. 361-386, 2003.

WEBER, N.A. **Gardening Ants, the Attinis.** Phyladelphia: Americal Phylosophical, Society, 1972.

WETTERER, J. K.; SCHULTZ, T. R.; MEIER, R. Phylogeny of Fungus-Growing Ants (Tribe Attini) Based on mtDNA Sequence and Morphology. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 9, p. 42-47, 1998.

XIA, X.; XIE. Z. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. **J. Hered.**, v. 92, p. 371-373, 2001.

ZHANG, D.X.; HEWITT, G.M. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. **Mol. Ecol.**, v. 12, n. 3, p. 563-584, 2003.

4. CAPÍTULO II

Sistemática Molecular de *Acromyrmex balzani* (Hymenoptera: Formicidae) baseada em seqüências de DNA mitocondrial

4.1. RESUMO

A formiga *Acromyrmex balzani* (Hymenoptera: Formicidae) é uma importante praga das pastagens em toda a América do Sul, por ter larga distribuição geográfica e ser cortadeira de gramíneas. Portanto, ampliar o conhecimento sobre esta espécie é fundamental para o controle de pragas e também para estudos em biogeografia de invertebrados. Devido ao embasamento da sistemática de formigas em caracteres morfológicos, sua história taxonômica é marcada por controvérsias de identificação e classificação, ao ser considerada como espécie ou subespécie de *Acromyrmex*

landolti. Na tentativa de resolver a taxonomia desta espécie, nós geramos seqüências nucleotídicas mitocondriais de exemplares de *A. balzani* e *A. landolti*, com o objetivo de identificar os grupos gênicos naturais das espécies através da filogenia molecular. Este estudo resultou na obtenção de uma única árvore mais parcimoniosa com forte estrutura geográfica, indicando *A. balzani* e *A. landolti* como um grupo monofilético. Esse grupo é formado por distintas populações de formigas, que podem constituir subespécies ou mesmo novas espécies, mas que representam a classificação natural das espécies.

Palavras chaves: *Acromyrmex balzani*, DNA mitocondrial, filogenia, formigas cortadeiras.

4.2. ABSTRACT

The *Acromyrmex balzani* (Hymenoptera: Formicidae) ant is considered an important plague of the pastures in South America for being geographically widespread as well as a grass cutter. Therefore, extending the knowledge of this species is essential to control plagues, and also for studies in invertebrate biogeography. Since systematics of ants is based on morphologic characters, its taxonomic history is marked by identification and classification controversies when regarded as species or subspecies of *Acromyrmex landolti*. In an attempt to solve the taxonomy of such species, mitochondrial DNA sequences of *balzani* and *landolti* specimen were analyzed, with the aim of identifying the natural genetic groups of the species through molecular phylogeny. This study resulted in the attainment of a single more parsimonious tree with strong geographic structure, indicating *balzani* and *landolti* as a monophyletic group.

This group is formed by distinct ant populations that can constitute subspecies or even new species; however, they represent the natural classification of the species.

Key-words: *Acromyrmex balzani*, mitochondrial DNA, phylogeny, leaf-cutting ants.

4.3. INTRODUÇÃO

A formiga *Acromyrmex balzani* Emery, 1890 é considerada uma importante praga das pastagens da América do Sul, por ser cortadeira exclusiva de gramíneas, com registros de ataque em plantações de arroz, campos naturais e cerrados, terrenos cultivados, principalmente os pastos (DELABIE et al., 1997; GONÇALVES, 1961;).

Sua história taxonômica é marcada por controvérsias, que residem no fato de ser considerada como uma espécie ou uma subespécie de *Acromyrmex landolti*. Isto ocorre porque, nas formigas *Acromyrmex*, a classificação de alguns táxons é dificultada, devido ao embasamento da sistemática em caracteres morfológicos, muitos dos quais com variabilidade individual e polimorfismos nas diferentes castas de um mesmo ninho (MAYHÉ-NUNES, 1991), gerando equívocos tanto de nomenclatura quanto de identificação.

A distribuição geográfica descrita para a espécie inclui Paraguai (Assunção – localidade-tipo), Uruguai, Argentina, Peru, Bolívia, Uruguai (BRANDÃO, 1991; FOWLER, 1988) e no Brasil, as cinco regiões geográficas, exceto os Estados do Amazonas, Roraima e Pará (FORTI e BOARETTO, 1997; GONÇALVES, 1961; RANDO e FORTI, 2005).

A ampla distribuição geográfica descrita é o resultado da capacidade de migração e adaptação a diversos ambientes, com diferentes condições ecológicas. Tanto a migração quanto a adaptação são variáveis do processo evolutivo envolvidas na manutenção da variabilidade genética das populações, que ocorre através do fluxo de genes, mutações e recombinações genéticas. É a variabilidade genética que leva ao isolamento de algumas populações, e conseqüentemente à especiação (FUTUYMA, 1992).

Para estudar a variabilidade genética atuante na relação entre as diversas populações, seqüências de DNA mitocondrial (mtDNA) têm sido freqüentemente usadas na família Formicidae para caracterização de subgrupos taxonômicos, permitindo estudos de caráter evolutivo e filogenético, além da identificação de novos grupos (ASTRUC et al., 2004; AYLA et al., 1996; BAUR et al., 1995; CHIOTIS et al., 2000; CROZIER et al., 1995; WARD e BRADY, 2003; WETTERER et al., 1998).

Uma região do genoma mitocondrial mostrou-se muito apropriada para a diferenciação e estudos evolutivos de populações de *Acromyrmex balzani* e *Acromyrmex landolti*: o espaçador intergênico (IGS), localizado entre os genes mitocondriais codificadores do Citocromo-oxidase I (COI) e de RNA transportador de Leucina (Leu tRNA). Este espaçador possui grande variação entre espécies e subespécies de formigas atíneas, sendo caracterizado pelo alto conteúdo de A e T (adenina e timina) e baixo índice de homoplasia, possibilitando encontrar padrões de diversificação biológica e evolução, permitindo inferências filogenéticas (BACCI et al., 2001).

Assim, este estudo objetiva a caracterização molecular de diferentes populações de *Acromyrmex balzani*, coletadas em diferentes regiões do Brasil, através da determinação da sequência nucleotídica da região gênica mitocondrial incluindo os locos COI, IGS, Leu tRNA e COII. A classificação da espécie em grupos naturais será determinada através de inferências filogenéticas a partir das sequências mitocondriais geradas para *Acromyrmex balzani* e *Acromyrmex landolti*.

4.4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.4.1. Amostragem Taxonômica

A espécie estudada foi a formiga *Acromyrmex balzani*, coletada em diferentes regiões do Brasil, selecionadas ao acaso. Foram realizadas diversas coletas de *Acromyrmex balzani*, obtendo-se dados sobre as coordenadas geográficas (latitude e longitude) de cada local coletado (Tabela 4.1. e Figura 4.1). Além disso, foram também coletados exemplares de *Acromyrmex landolti* da Colômbia, Guyana Francesa (localidade-tipo) e Amapá (Brasil) para as análises filogenéticas comparativas (Tabela 4.2.).

Cada coleta representou um ninho diferente (com o referido código de acesso), do qual foram coletadas diferentes castas de formigas, inclusive rainhas, quando possível, para a coleção entomológica (Depositada no Laboratório de Evolução Molecular do CEIS-IB-UNESP/RC), armazenagem de testemunhos e análises moleculares. Para cada ninho consideraremos somente uma sequência nucleotídica mitocondrial representativa, uma vez que

não detectamos polimorfismos moleculares entre castas de indivíduos do mesmo ninho, por se tratar de uma molécula de herança dominante.

Os espécimes coletados foram identificados através da chave para soldados de *Acromyrmex* encontrada na revisão do subgênero *Moellerius* em Fowler (1988), com base também nas respectivas áreas de ocorrência. Essa chave foi escolhida após análise das outras chaves propostas para a identificação das espécies (Capítulo III), por ser a mais compatível com os resultados encontrados. Junto a cada exemplar coletado foram adicionadas informações sobre o local de coleta com as coordenadas geográficas – ponto georreferenciado através de GPS (Global Position System).

Tabela 4.1 Espécimes coletados de *Acromyrmex balzani*.

Código	Local de Coleta	longitude (W)	latitude (S)
E 262	Rio Claro-SP	-47,5444	-22,3952
E 294	Botucatu-SP	-48,46	-22,9
E 308	Rio Claro – SP	-47,5444	-22,3952
E 408	Pedra Preta – MT	-54,474	-16,623
E 616	Matão – SP	-48,3497	-21,6568
E 618	S. J. Rio Preto – SP	-49,3405	-20,8509
E688	Faz. Vitória-GO	-48,0363	-18,1553
E698	Araçatuba-SP	-50,43808	-21,23451
E848	Gandu-BA	-39,487	-13,744
E904	B. Rocha-BA	-39,6598	-14,1872
E905	B. Rocha-BA	-39,6598	-14,1872
E913	V.Grande-MT	-56,1142	-15,624
E967	Pernambuco	-35,512	-8,5893
E968	Pernambuco	-35,512	-8,5893
E969	B. Rocha-BA	-39,66	-14,1872
E994	Rio Claro-SP	-47,544	-22,395
E1121	Rio Claro-SP	-47,544	-22,395

4.4.2. Extração de DNA

A extração de DNA foi feita a partir de formigas operárias que foram trituradas inteiras através de maceração com o auxílio de um pistilo plástico, no interior de microtubos de 1,5 ml, realizada em banho de gelo, gelo seco ou congelados imediatamente em Nitrogênio líquido. O material triturado foi submetido à lise celular através de solução de lise – TNES (Tris 250 mM pH 7,5; NaCl 2M; EDTA 100 mM; SDS 2%) e incubado a 55° C por 3 horas. As proteínas foram precipitadas com NaCl 5M e o DNA genômico precipitado com isopropanol 100 %, lavado com etanol 70 % e solubilizado em tampão TE.

4.4.3. Amplificação dos loci COI, IGS, Leu tRNA e COII

Os marcadores foram amplificados através de reações de PCR. Cada reação continha 100 ng de DNA genômico, 6 pmol de cada iniciador e 1 porção liofilizada de reagente PCR Ready-to-Go (Pharmacia 27-9555-01) dissolvida em água esterilizada. A reação foi realizada nas seguintes condições: uma desnaturação (94° C, 5 min) seguida de 35 ciclos de PCR (94° C-1 min, 47° C-1 min, 72° C-2 min) e uma extensão final (65° C, 15 min), terminando com armazenagem a 4° C. Para o fragmento contendo os loci COI-IGS-Leu tRNA-COII foram utilizados os iniciadores C1-J-2828 (5'-AATATATTATCTTGTTTCATTCTTTCATA-3') e C2-N-3386 (5'-GTTTCATTTGGTCATAAGTTCAGTA-3') (Bacci et al, 2001).

4.4.4. Purificação dos amplicons obtidos

Os marcadores mitocondriais amplificados foram purificados através de cromatografia por afinidade, utilizando GFX™ PCR DNA e Gel Band Purification Kit da GE HealthCare (27-9602-01). O DNA foi quantificado em espectrofotômetro a 260 nm.

4.4.5. Eletroforese

Os produtos de extração de DNA, amplificação e purificação dos produtos de PCR foram analisados e confirmados através de eletroforese em gel de agarose 1 %, em TBE 1X, utilizando marcador de peso molecular (ladder) de 1 kb. A visualização de DNA se deu após imersão dos géis em solução de Brometo de Etídio 1 µg/ml, para saturação dos mesmos, e com o auxílio de transiluminador equipado com lâmpadas para UV longo ~356nm.

4.4.6. Seqüenciamento de DNA

O seqüenciamento dos marcadores mitocondriais foi feito com os mesmos iniciadores utilizados na amplificação de cada um dos segmentos de DNA. A reação de seqüenciamento continha 100 ng de cada amplicon purificado, 6 pmol de iniciador, 2 µL de Tris 100 mM, MgCl₂ 2,5 mM, pH 9.0, 2,5 µL de Big Dye Terminator (PE Applied Biosystems 4314415) e foi conduzida com uma desnaturação inicial (90 seg a 96° C), seguida de 25 ciclos de PCR (12 seg a 96° C, 6 seg a 50° C, 4 min a 60° C). Após a reação, os produtos de seqüenciamento foram precipitados com 80 µL de isopropanol 75%, lavados

com etanol 70% e separados em gel de poliacrilamida em um seqüenciador ABI 377 (PE Applied Biosystems).

4.4.7. Alinhamento das seqüências mitocondriais

As seqüências diretas e reversas de cada amostra foram editadas e as seqüências consenso alinhadas, através de alinhamento múltiplo com o programa ClustalW (THOMPSON et al., 1994) integrado ao programa BIOEDIT Sequence Alignment Editor (HALL, 1999).

4.4.8. Análise dos Resultados

Análises filogenéticas

Com as seqüências editadas e alinhadas, foram realizadas a análise de transições e transversões utilizando o programa DAMBE (XIA e XIE, 2001) e em seguida, as análises filogenéticas de máxima parcimônia, com o programa PAUP* 4b10 (SWOFFORD, 2000). Gaps foram considerados como quinta base, uma vez que também possuem informação filogenética (GIRIBET e WHEELER, 1999). Foram obtidas árvores por meio de busca heurística (SWOFFORD et al., 1996) via adição aleatória com 1000 replicações. Das árvores mais parcimoniosas, foi obtida e apresentada a árvore de consenso semi-estrito. O suporte dos ramos foi inferido pela análise de bootstrap (FELSENSTEIN, 1985; SWOFFORD et al., 1996), conduzida através de busca heurística com 1000 replicações e adição aleatória com 100 replicações e pela análise de Bremer (BREMER, 1994) ou “decay index” conduzida através de busca heurística com 1000 replicações através do programa PRAP –

Parsimony Ratchet Analyses using PAUP* (MÜLLER, 2004). Para servir de grupo externo às formigas *Acromyrmex balzani*, foram empregadas seqüências representativas de outras espécies de *Acromyrmex*, como *Acromyrmex landolti*, *Acromyrmex lundii* e *Acromyrmex heyeri*. Para a árvore apresentada no trabalho, somente duas seqüências de *Acromyrmex lundii* e *Acromyrmex heyeri* foram incluídas, pois o número de grupos externos considerados não gerou alteração na topologia demonstrada. Os cladogramas foram desenhados com o auxílio do programa TreeView (PAGE, 1998) e do programa TreeGraph 1.0rc1 (MÜLLER e MÜLLER, 2004).

4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com os espécimes coletados de *Acromyrmex balzani* e *Acromyrmex landolti*, foram geradas as seqüências nucleotídicas (~570 pares de base) para a porção 3' da região mitocondrial: COI (~152 nucleotídeos), IGS (~200 a 230 nucleotídeos), Leu tRNA (~89 a 95 nucleotídeos) e COII (~170 nucleotídeos), utilizando os iniciadores (forward e reverse) mencionados para o fragmento estudado. As seqüências foram alinhadas, possibilitando a caracterização molecular deste fragmento (Figura 4.2.).

Apesar de apresentarem algumas substituições e translocações nucleotídicas, as moléculas de COI e COII são bastante conservadas entre os espécimes, pois regiões codificadoras têm uma taxa mutacional e evolutiva menor quando comparadas às regiões controladoras e aos espaçadores intergênicos no genoma mitocondrial. A região do Leu tRNA, também mostrou-se conservada entre os espécimes, apenas com pequenas substituições

nucleotídicas. Já a região IGS, não codificadora, mostrou-se bastante variável, com mudanças do tipo indel (inserção-deleção) de nucleotídeos.

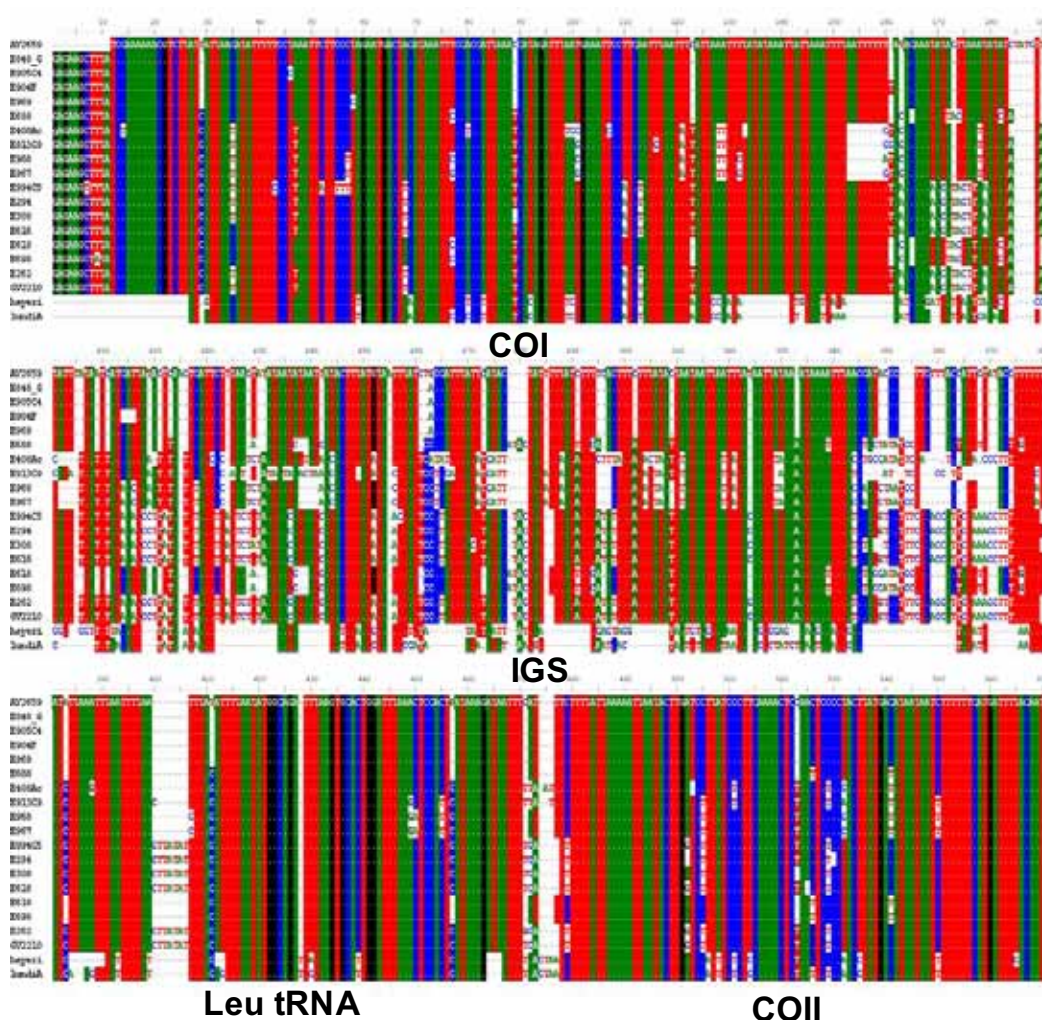


Figura 4.2 Alinhamento múltiplo da região do mtDNA, incluindo os *loci* COI, IGS, Leu tRNA e COII (região inicial) das sequências geradas de *Acromyrmex balzani* e *Acromyrmex landolti*. Os pontos nas seqüências indicam as posições conservadas e as letras representam as substituições nucleotídicas.

Devido à controvérsia taxonômica existente para o grupo *balzani*, foi realizada uma análise filogenética conjunta entre os espécimes coletados de *Acromyrmex balzani* e os espécimes coletados de *Acromyrmex landolti*. Assim, com as seqüências alinhadas, foi obtido o consenso estrito do cladograma mais

parcimonioso, considerando os locos COI, IGS, Leu tRNA e COII juntos e como grupos externos, *Acromyrmex lundii* e *Acromyrmex heyeri*. A figura 4.3. mostra a árvore mais parcimoniosa, obtida na análise de 630 caracteres, sendo 345 constantes e 199 informativos para parcimônia.

Observamos a formação de dois grupos irmãos (Grupo 1 e Grupo 2) entre os espécimes de *Acromyrmex balzani* e *Acromyrmex landolti* seqüenciados, ambos com clados estruturados geograficamente e largamente distribuídos. Os clados foram identificados através da chave taxonômica encontrada em Fowler, 1988.

Grupo 1 – espécimes de *Acromyrmex balzani* de Mato Grosso e Pernambuco

Grupo 2 – formado por três clados: **2.1.** espécimes de *Acromyrmex balzani* do

Estado de São Paulo;

2.2. espécimes de *Acromyrmex balzani* da Bahia e espécimes de *Acromyrmex landolti* da Guiana Francesa;

2.3. espécimes de *Acromyrmex balzani* de São Paulo e espécimes de *Acromyrmex landolti* de Amapá e Colômbia.

A árvore filogenética apresentada demonstra que existem quatro grupos gênicos entre as populações analisadas de *Acromyrmex balzani* e dois grupos gênicos entre as populações de *Acromyrmex landolti*, todos refletindo a ampla distribuição geográfica das espécies.

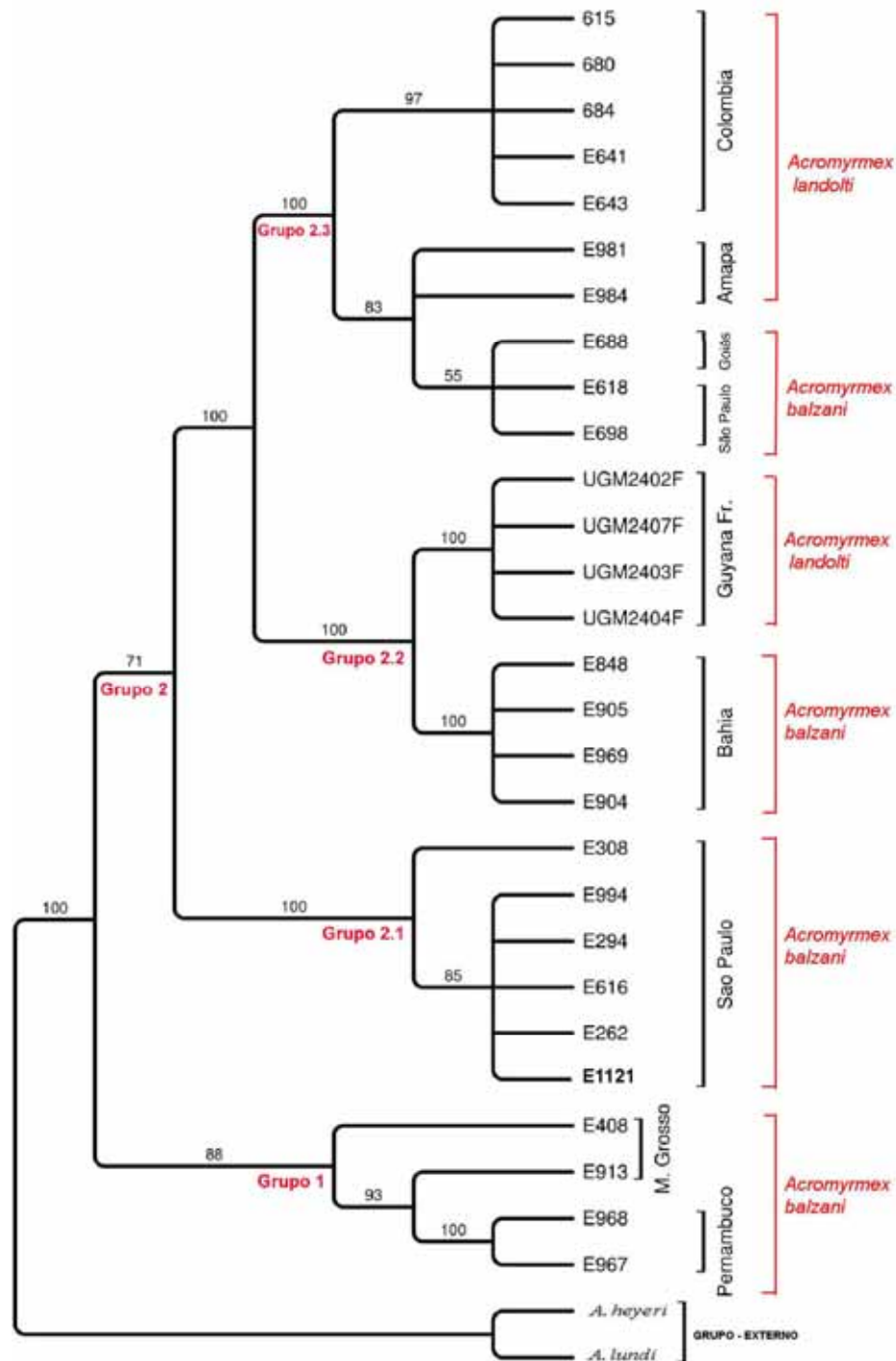


Figura 4.3. Consenso estrito entre as 9 árvores mais parcimoniosas (377 passos) obtidas a partir de 199 caracteres informativos para parcimônia dos *loci* COI, IGS, Leu tRNA e COII de 17 espécimes de *Acromyrmex balzani*, 11 de *Acromyrmex landolti*, um de *Acromyrmex heyeri* e um de *Acromyrmex lundt* (grupos externos). São mostrados os valores de *bootstrap*, acima dos nós. CI = 0.8170, HI = 0.1830 e RI = 0.8783.

O Grupo 2 desta filogenia demonstra que as duas espécies compartilham semelhanças genéticas que as agruparam em clados comuns. Desse modo, os grupos encontrados podem ser identificados como um complexo de espécies, denominado *balzani-landolti*. Esse complexo é monofilético, formado por dois grupos gênicos (G1= *balzani* e G2= *landolti* + *balzani*), que refletem a classificação natural das espécies.

As semelhanças genéticas estão provavelmente acompanhadas de semelhanças morfológicas que realmente dificultam a separação demonstrada com a filogenia e justificam as controvérsias apontadas para a taxonomia do grupo. Portanto, os caracteres morfológicos utilizados até agora para diferenciar as duas espécies, não são eficientes para a classificação das mesmas em grupos naturais.

Assim, marcadores mitocondriais associados a análises filogenéticas de certa forma contornam as dificuldades da sistemática baseada em dados morfológicos e resolvem a história evolutiva de grupos naturais.

Para concluirmos se as espécies nominais, *Acromyrmex balzani* e *Acromyrmex landolti*, realmente representam um complexo de espécies ou se uma delas deve ser rebaixada ao status de subespécie, é necessário ampliar a área amostrada e realizar análises com outros marcadores moleculares, principalmente de herança codominante.

4.6. CONCLUSÃO

As análises filogenéticas realizadas indicam que a espécie *Acromyrmex balzani* faz parte de um complexo de espécies incluindo *Acromyrmex landolti*.

O grupo *landolti-balzani* é monofilético com clados estruturados geograficamente, que representam distintas populações de formigas. O fato de *Acromyrmex balzani* pertencer ao mesmo grupo gênico de *Acromyrmex landolti*, demonstra que as espécies compartilham semelhanças genéticas. Essas semelhanças explicam a dificuldade da morfologia em classificar naturalmente as espécies. Assim, marcadores mitocondriais associados a análises filogenéticas de certa forma contornam as dificuldades da sistemática baseada em dados morfológicos e resolvem a história evolutiva de grupos naturais. Esses grupos, do ponto de vista genético, podem constituir possivelmente subespécies ou mesmo novas espécies.

4.7. REFERÊNCIAS

- ASTRUC, C.; JULIEN, J. F.; ERRARD, C.; LENOIR, A. Phylogeny of ants (Formicidae) based on morphology and DNA sequence data. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 31, p. 880-893, 2004.
- AYALA, F.J.; WETTERER, J.K.; LONGINO, J.T.; HARTL, D.L. Molecular phylogeny of *Azteca* ants (Hymenoptera: Formicidae) and the colonization of *Cecropia* trees. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 5, p. 423-428, 1996.
- BACCI JR., M. et al. A molecular marker for evolution studies of closely related specimens of higher Attini ants. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 30., 2001, Caxambu.
- BAUR, A.; CHALWATZIS, N.; BUSCHINGER, A.; ZIMMERMANN, F.K. Mitochondrial DNA sequences reveal close relationships between social parasitic ants and their host species. **Curr. Genet.**, v. 28, p. 242-247, 1995.
- BRANDÃO, C.R.F. Adendos ao catálogo abreviado das formigas da região neotropical (Hymenoptera: Formicidae). **R. Bras. Ent.**, v.35, n.2, p. 319-412, 1991.
- BREMER, K. Branch support and tree stability. **Cladistics**, v. 10, p. 295-304, 1994.

CHIOTIS, M.; JERMIIN, L. S.; CROZIER, R. H. A molecular frame-work for the phylogeny of the ant subfamily Dolichoderinae. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 17, p. 108-116, 2000.

CROZIER, R. H.; DOBRIC, N.; IMAI, H.T.; GRAUR, D.; CORNUET, J. M.; TAYLOR, R. W. Mitochondrial-DNA sequence evidence on the phylogeny of Australian jack-jumper ants of the *Myrmecia pilosula* complex. **Evol.**, v. 4, p. 20-30, 1995.

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

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p. 783-791, 1985.

FORTI, L. C.; BOARETTO, M. A. C. **Formigas Cortadeiras**: Biologia, Ecologia, Danos e Controle. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 1997. 61 p.

FOWLER, H.G. Taxa of Neotropical grass-cutting ants, *Acromyrmex* (*Moellerius*) (*Hymenoptera: Formicidae: Attini*). **Científica**, v. 16, n. 2, p. 281-296, 1988.

FUTUYMA, D. J. **Biologia Evolutiva**. 2. ed. Ribeirão Preto: Ed. Soc. Bras. Gen., 1992. 646p.

GIRIBET, G.; WHEELER, W.C. On gaps. **Mol. Phyl. Evol.**, v.13, n. 1, p. 132-143, 1999.

GONÇALVES, C.R. O Gênero *Acromyrmex* no Brasil (*Hym. Formicidae*). **Studia Ent.**, v.4, p. 113 -173, 1961.

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

MAYHÉ-NUNES, A. J. **Estudo de *Acromyrmex* (*Hymenoptera: Formicidae*) com ocorrência constatada no Brasil**: subsídios para uma análise fiogenética. 1991. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

MÜLLER, J.; MÜLLER, K. TreeGraph: automated drawing of complex tree figures using an extensible tree description format. **Mol. Ecol. Notes**, v. 4, p. 786-788, 2004.

MÜLLER, K. PRAP - calculation of Bremer support for large data sets. **Mol. Phyl. Evol.**, v. 31, p. 780 -782, 2004.

PAGE, R. D. M. **TreeView**: Tree drawing software for Apple Macintosh and Microsoft Windows, versão 1.5.2. Glasgow: Institute of Biomedical & Life Sciences, University of Glasgow, 1998.

RANDO, J. S. S.; FORTI, L. C. Ocorrência de formigas *Acromyrmex* Mayr, 1865, em alguns municípios do Brasil. **Acta Sci. Biol. Sci.**, Maringá, v. 27, n. 2, p. 129-133, 2005.

SWOFFORD, D. L.; OLSEN, G. J.; WADDELL, P. J.; HILLIS, D. M. Phylogenetic Inference. In Hillis, D.M.; Moritz, C.; Mable, B. K. (Ed.), **Mol. System.**, Sunderland: Sinauer, 1996. p.407-425.

SWOFFORD, D.L. **Phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0b4a**. Champaign: Illinois Natural History Survey, 2000.

THOMPSON, J.D.; HIGGINGS, D.G.; GIBBSON, T.J. ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gaps penalties and weight matrix choice, **Nuc. Ac. Res.** 1994.

WARD, P. S.; BRADY, S. G. Phylogeny and biogeography of the ant subfamily Myrmicinae (Hymenoptera: Formicidae). **Invert. Syst.**, v. 17, p. 361-386, 2003.

WETTERER, J. K.; SCHULTZ, T. R.; MEIER, R. Phylogeny of Fungus-Growing Ants (Tribe Attini) Based on mtDNA Sequence and Morphology. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 9, p. 42-47, 1998.

XIA, X.; XIE, Z. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. **J. Hered.**, v. 92, p. 371-373, 2001.

5. CAPÍTULO III

Caracterização morfológica de populações de *Atta laevigata* e *Acromyrmex balzani* (Hymenoptera: Formicidae)

5.1. RESUMO

A identificação morfológica das espécies de formigas de interesse econômico representa um dos processos mais difíceis em estudos de levantamento da biodiversidade ambiental, pois a taxonomia de formigas é baseada em caracteres morfológicos, que são polimórficos e podem gerar dúvidas tanto de nomenclatura quanto de identificação. Diante disso, a validade dos níveis específico e subespecífico de alguns táxons de formigas, como *Atta laevigata* e *Acromyrmex balzani*, é questionável, com controvérsias sobre as divisões e denominações dos subgrupos taxonômicos. A dificuldade de identificação pode ser contornada com o uso de marcadores moleculares e

inferências filogenéticas, que possibilitam diferenciar geneticamente espécimes de diversos locais, permitindo a classificação dos mesmos em grupos naturais. Na tentativa de encontrar correlações entre a morfologia e a genética, e evidências morfológicas da estruturação filogenética dos grupos gênicos anteriormente definidos para *Atta laevigata* e *Acromyrmex balzani*, foi realizada a caracterização morfológica externa dos espécimes, com base nas chaves taxonômicas de identificação atualmente aceitas. Nossos resultados apontam a existência de incongruências e polimorfismos nos caracteres morfológicos analisados.

Palavras-chaves: formigas cortadeiras, *Atta laevigata*, *Acromyrmex balzani*, caracterização morfológica, identificação taxonômica.

5.2. ABSTRACT

Morphologic identification of ants' species with economic interest represents one of the most difficult processes in environmental biodiversity studies, since ants' taxonomy is based on morphologic characters, which are polymorphic and can lead to nomenclature and identification uncertainties. Faced with this, the validity specific and subspecific levels of some ant taxa, such as *Atta laevigata* and *Acromyrmex balzani*, is questionable, filled with controversies over the divisions and denominations of the taxonomic subgroups. The identification difficulty can be resolved by using molecular markers and phylogenetic inferences that help to genetically differentiate specimens from diverse places, allowing the classification of the same specimens in natural groups. In an attempt to find correlations between morphology and genetics, as well as

morphologic evidences of phylogenetic structure in the genetic groups previously defined for *Atta laevigata* and *Acromyrmex balzani*, the external morphologic characterization of specimens was carried through, based on the identification keys currently accepted. Our results show the existence of incongruities and polymorphism in the morphologic characters analyzed.

Key-words: leaf-cutting ants, *Atta laevigata*, *Acromyrmex balzani*, morphologic polymorphism, taxonomy identification.

5.3. INTRODUÇÃO

Presentes em quase todos os lugares, as formigas são um grupo surpreendentemente diverso de insetos dos ecossistemas tropicais, atuando em vários níveis nesses sistemas – como predador e presa, detritívoros, mutualistas e herbívoros (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990, 1994).

Assim, as formigas têm o potencial para monitorarem mais sensivelmente dados de biodiversidade do que muitos outros organismos capazes de indicar mudanças ambientais, como plantas e peixes. Devido a esse potencial, o levantamento de formigas em uma determinada área tem sido visto como uma importante questão em estudos de biodiversidade e conservação ambiental. (AGOSTI et al., 2000).

A parte mais difícil de um levantamento de formigas é o processo de identificação morfológica (AGOSTI et al., 2000). Isto ocorre porque a identificação taxonômica é baseada em caracteres morfológicos, que são polimórficos nas diferentes castas de um ninho, e, considerando-se a mesma casta, em ninhos distintos, os caracteres são muitas vezes escassos, gerando

equivocos tanto de nomenclatura quanto de identificação (MAYHÉ-NUNES, 1991).

Diante disso, a validade dos níveis específico e subespecífico de alguns táxons de formigas é questionável, com controvérsias sobre as divisões e denominações dos subgrupos taxonômicos (WILD, 2004). Essa situação pode ser observada em *Atta laevigata*, atualmente classificada sem subespécies ou variedades (BOLTON, 1995) embora já tenham sido propostas algumas subdivisões para a espécie (GONÇALVES, 1942) e *Acromyrmex balzani*, por possuir uma história taxonômica marcada por controvérsias, que residem no fato de ser considerada como uma espécie ou uma subespécie de *Acromyrmex landolti* (FOWLER, 1988; GONÇALVES, 1961; MAYHÉ-NUNES, 1991).

Para contornar a dificuldade de identificação, o uso de marcadores moleculares e inferências filogenéticas demonstraram ser possível, diferenciar geneticamente, espécimes de *Atta laevigata* e *Acromyrmex balzani* de diferentes locais, permitindo a classificação dos mesmos em grupos naturais (Capítulos I e II). Desse modo, é provável que muitas espécies como *Atta laevigata* e *Acromyrmex balzani*, representem um complexo contendo várias espécies ou subespécies, que são morfológicamente ainda muito parecidas, dificultando sua diferenciação e identificação.

Na tentativa de detectar os caracteres morfológicos diferenciais entre os grupos gênicos anteriormente encontrados em *Atta laevigata* e *Acromyrmex balzani*, foi realizada a caracterização morfológica externa dos espécimes com base nas chaves taxonômicas de identificação para as espécies. A definição

prévia dos grupos, através da filogenia molecular, serviu como guia para orientar as análises morfológicas realizadas.

Assim, este trabalho teve como objetivo encontrar correlações morfológicas, possíveis sinapomorfias e evidências da estruturação dos grupos gênicos anteriormente definidos, entre todos os espécimes seqüenciados de *Atta laevigata* e *Acromyrmex balzani*, com base nas informações obtidas sobre a sistemática do gênero *Atta* e *Acromyrmex*. Além disso, o presente trabalho procurou demonstrar a dificuldade da identificação taxonômica de formigas cortadeiras baseada em caracteres morfológicos, utilizando duas espécies como modelos importantes para ilustrar a situação tratada.

5.4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os exemplares utilizados de *Atta laevigata* e *Acromyrmex balzani* foram os mesmos utilizados (mesma casta) para as análises filogenéticas das espécies (Tabelas 3.2. e 4.1.). Para a caracterização morfológica de *A. balzani* também foram utilizados os espécimes coletados de *Acromyrmex landolti* (Tabela 4.2). Representantes de cada coleta foram separados e mantidos em etanol 70 % como testemunhas. Foi também montada uma coleção entomológica de referência, em via seca, para as análises morfológicas.

Os espécimes coletados foram identificados através das descrições originais e das revisões taxonômicas encontradas na chave de soldados de *Atta* de Gonçalves (1942), na chave de operárias de *Acromyrmex* segundo Gonçalves (1961) e Mayhé-Nunes (1991) e a chave para soldados de

Acromyrmex encontrada na revisão do subgênero *Moellerius* em Fowler (1988).

Essas chaves taxonômicas orientaram a análises morfológicas realizadas.

A análise morfológica externa dos exemplares coletados foi realizada através de registro fotográfico utilizando microscópio estereoscópico Leica MZ16, com sistema de iluminação Leica CLS 150X, acoplado a câmara digital Leica DFC 320, com software de aquisição, arquivamento, tratamento e análise das imagens.

A análise seguiu inicialmente um trabalho exploratório, para localização dos caracteres morfológicos conhecidos e listados nas chaves de identificação, com a posterior coleta e organização dos dados.

5.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.5.1. Caracterização morfológica de *Atta laevigata*

A caracterização morfológica de *Atta laevigata*, foi realizada para todos os espécimes de cada grupo gênico anteriormente descrito (Capítulo I), Grupo 1 e Grupo 2, considerando a casta de soldados (Figura 5.1).

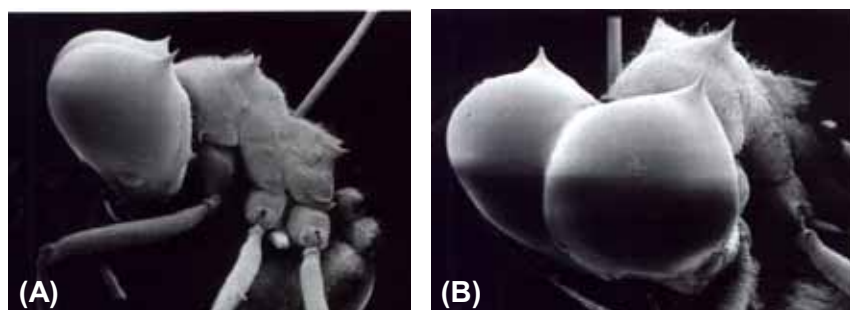


Figura 5.1 Soldados de *Atta laevigata*. (A) Vista lateral e (B) Vista frontal.

Os caracteres morfológicos considerados para análise foram os propostos na chave de identificação para a espécie encontrada em Gonçalves (1942) (Tabela 5.1 e Figura 5.2.). Esses caracteres foram analisados em todos os espécimes coletados, apontando as concordâncias e discordâncias que pudessem gerar alteração na chave de identificação até então proposta.

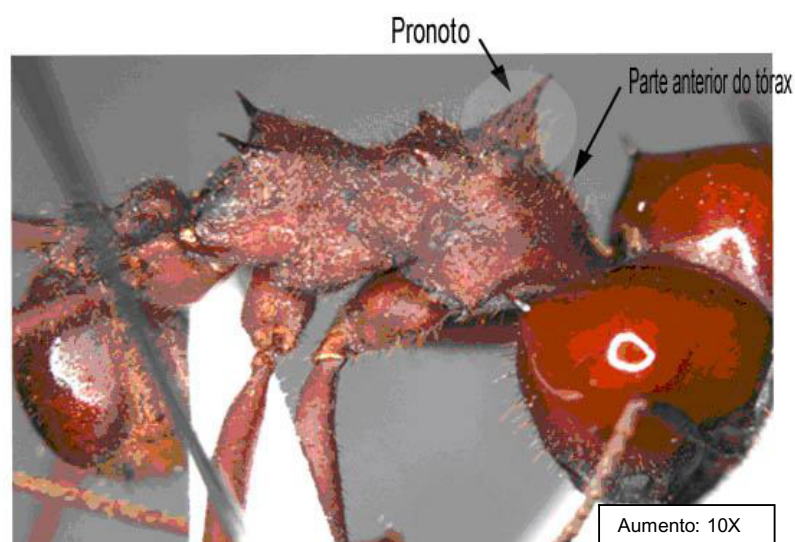
Tabela 5.1 Caracteres Morfológicos utilizados para Identificação de soldados *Atta laevigata*, de acordo com Gonçalves, 1942.

**Caracteres Morfológicos para Identificação de soldados
de *Atta laevigata* (Gonçalves, 1942)**

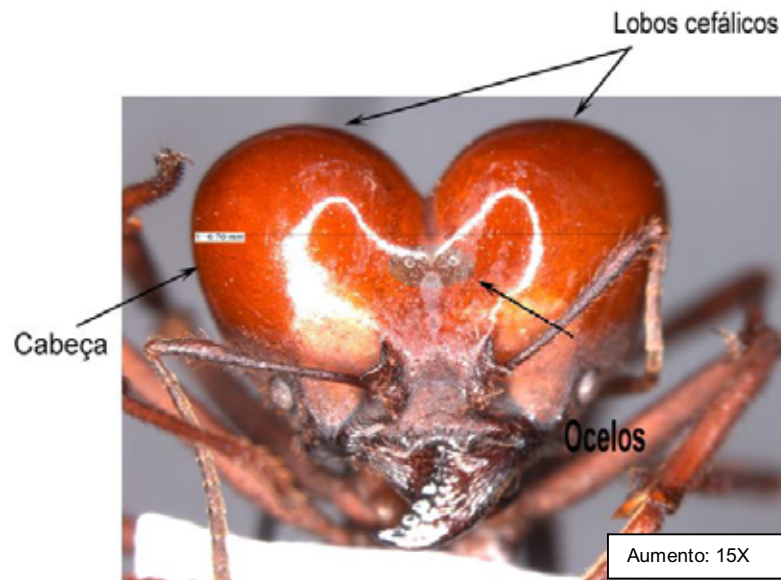
1. Cabeça bem desenvolvida.
 2. Cabeça e primeiro segmento do gáster muito brilhantes e completamente glabros.
 3. Cabeça sem reticulação fina, apenas com pontuação fina e esparsa, pouco aparente.
 4. Pêlos eretos do pronoto e da parte anterior do tórax abundantes.
 5. Lobos cefálicos arredondados, sem tubérculos.
 6. Dois ocelos pequenos, às vezes ausentes.
 7. Espinhos Mesonotais Anteriores grossos, cônicos, divergentes e mais curtos que os epinotais.
 8. Espinhos Mesonotais Posteriores formando um só tubérculo ou terminando em dois pequenos espinhos.
 9. Espinhos Epinotais pouco alongados, espiniformes, dirigidos para trás e para cima.
 10. Pernas com pêlos curtos.
-

Figura 5.2 Ilustração dos caracteres utilizados para a identificação de soldados de *Atta laevigata*, baseada nos caracteres morfológicos propostos por Gonçalves, 1942 (Tabela 5.1).

CHAVE ILUSTRADA PARA IDENTIFICAÇÃO DE *Atta laevigata* (Gonçalves, 1942)



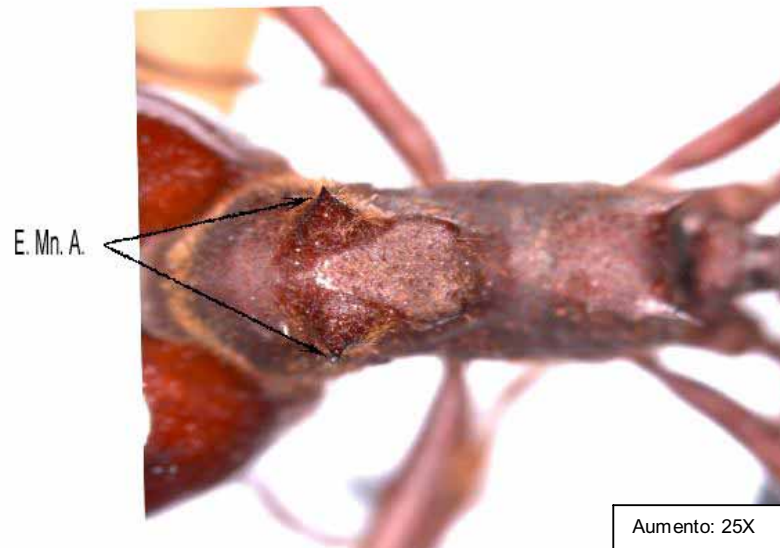
Pêlos eretos do pronoto e da parte anterior do tórax abundantes.



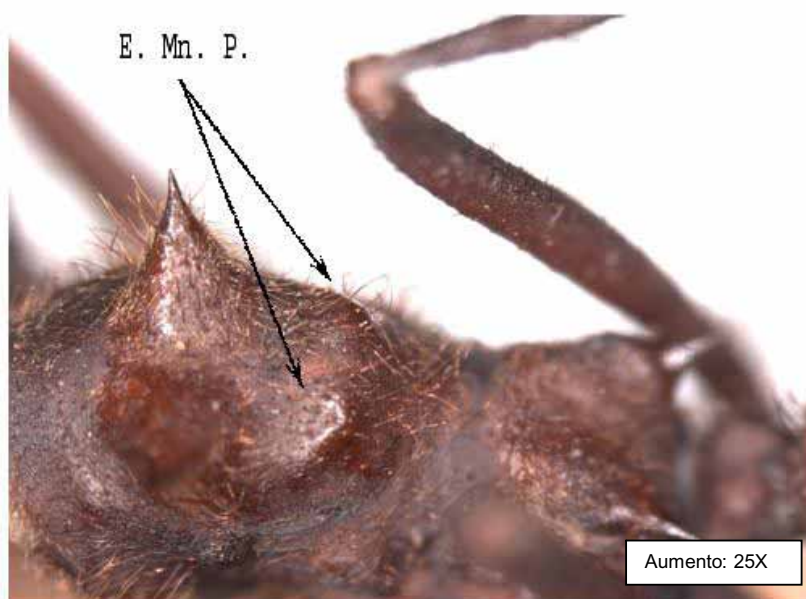
Dois **ocelos** pequenos, às vezes ausentes.

Cabeça bem desenvolvida podendo atingir até 7 mm de largura.

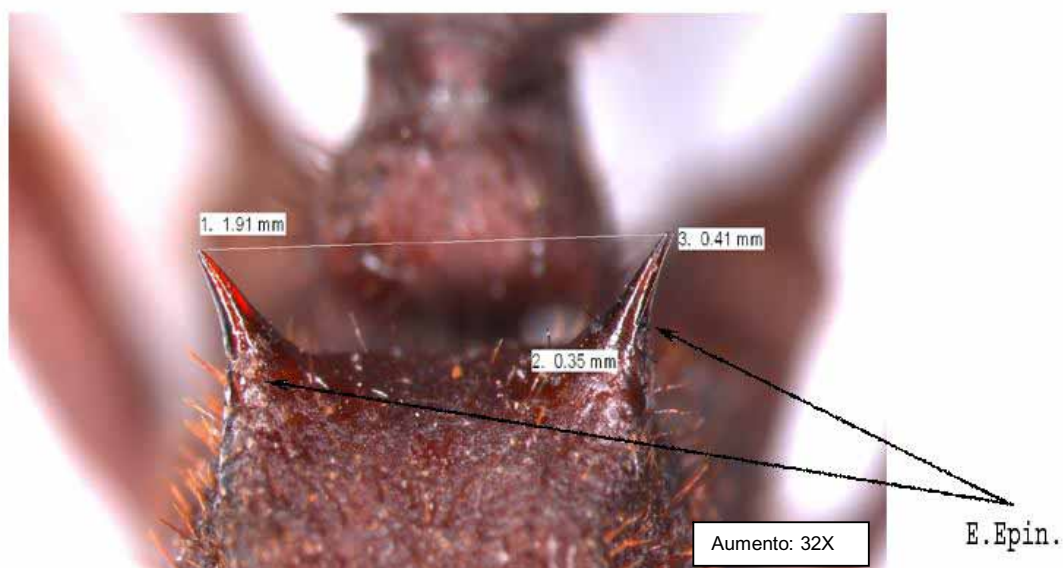
Lobos cefálicos arredondados, sem tubérculos.



Espinhas Mesonotais Anteriores (E. Mn. A.)
grossos, cônicos, divergentes e mais curtos
que os Espinhos Epinotais (E. Epin.).



Espinhas Mesonotais Posteriores (E. Mn. P.)
formando um só tubérculo, às vezes terminado
em 2 pequenos espinhos.



Espinhas Epinotais (E. Epin.) pouco alongados,
espiniformes, dirigidos para trás e um pouco para cima.



Cada caráter foi analisado de maneira qualitativa, excluindo assim observações sobre as medidas das estruturas e caracteres com alto nível de variação intraespecífica, como a coloração dos indivíduos.

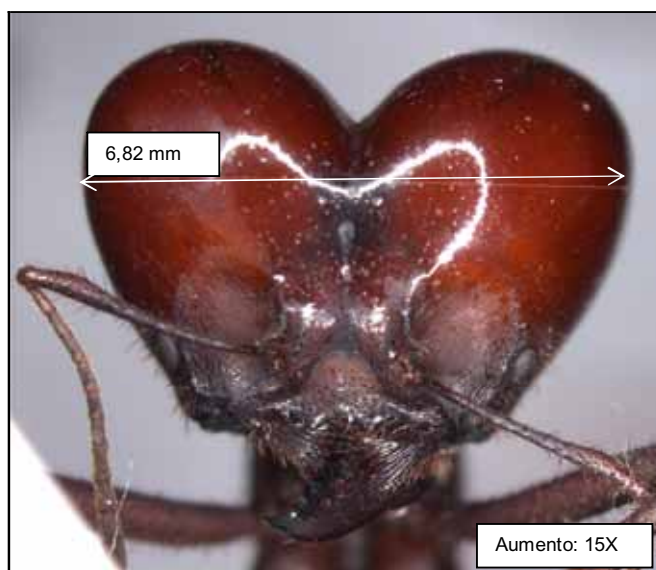
Assim, variações em tamanho, extremidade, curvatura e largura dos caracteres foram detectadas de modo visual, não mensurável, apenas para fins ilustrativos e de caracterização, em todos os espécimes coletados.

Os caracteres considerados foram examinados em todos os indivíduos dos dois grupos (G1 e G2), de modo que as concordâncias (Tabela 5.2) e discordâncias (Tabela 5.3) encontradas refletem o padrão encontrado para os dois grupos. Abaixo são mostradas essas considerações com o seu exemplo mais representativo. Para cada exemplo são apontados os espécimes que apresentaram tal consideração.

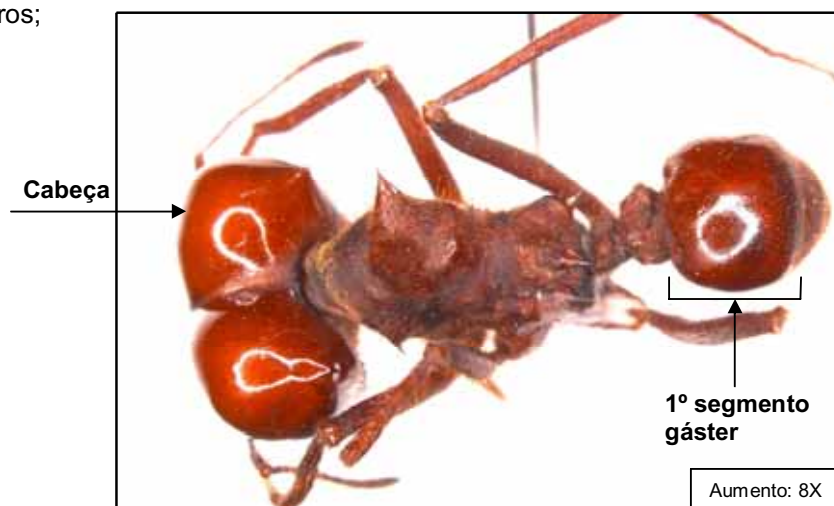
Tabela 5.2 Concordâncias encontradas na análise dos soldados de *Atta laevigata*. São mostrados o caráter (de acordo com Gonçalves, 1942 – Tabela 5.1.), o respectivo exemplo representativo e em quais espécimes foi observado.

CONCORDÂNCIAS ENCONTRADAS:

1. As cabeças são bem desenvolvidas, chegando até 6,82mm de largura;



2. A cabeça e o primeiro segmento do gáster são muito brilhantes e completamente glabros;



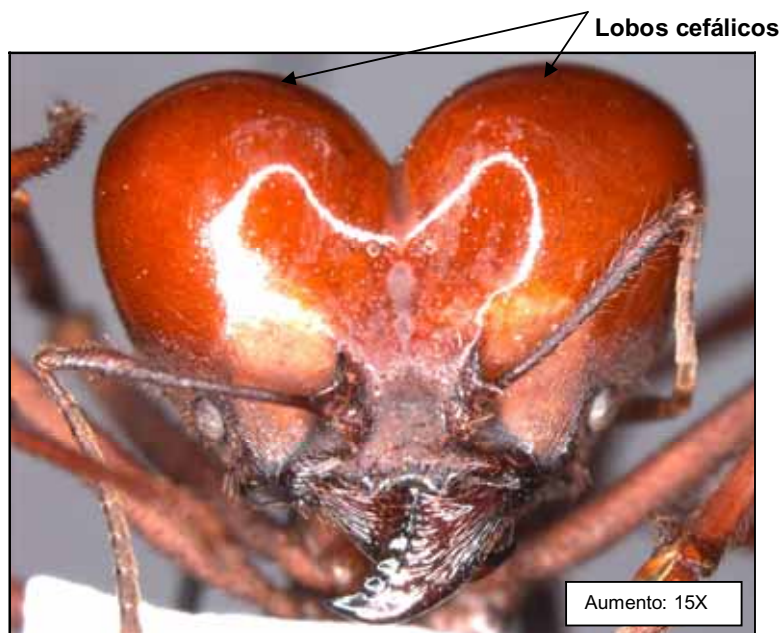
3. A cabeça possui pontuação fina e esparsa, pouco aparente;



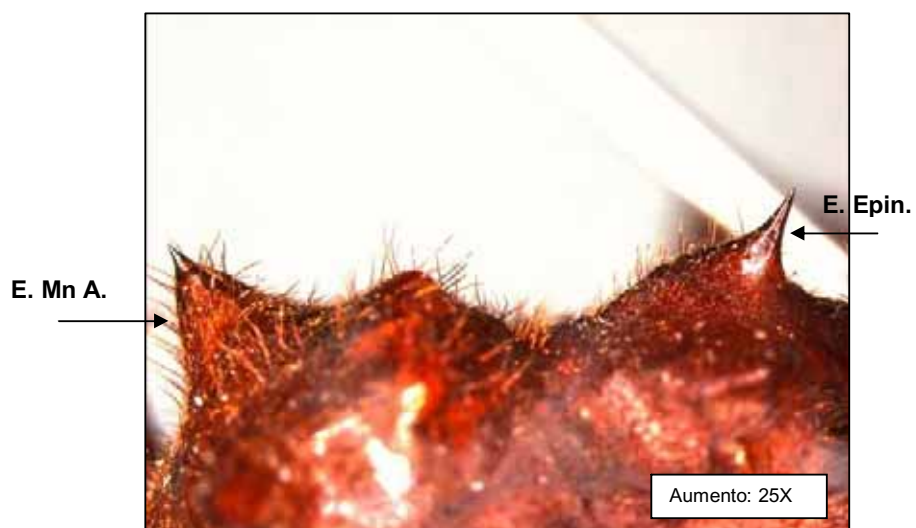
4. Os pêlos do pronoto e da parte anterior do tórax são eretos e encontrados em abundância;



5. Os lobos cefálicos são arredondados e sem tubérculos;



7. Espinhos Mesonotais Anteriores (E. Mn. A.) grossos, cônicos, divergentes e mais curtos que os epinotais (E. Epin.);



8. Foram encontrados dois padrões de Espinhos mesonotais posteriores (E. Mn. P.): terminando em um só tubérculo (a) ou em dois pequenos espinhos (b).

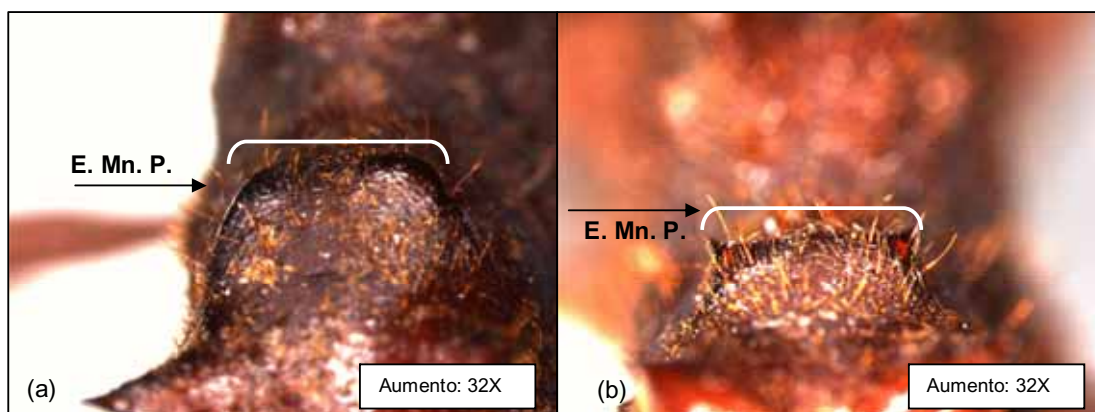


Tabela 5.3 Discordâncias encontradas na análise dos soldados de *Atta laevigata*. São mostrados o caráter (de acordo com Gonçalves, 1942 – Tabela 5.1.) e o respectivo exemplo.

DISCORDÂNCIAS ENCONTRADAS

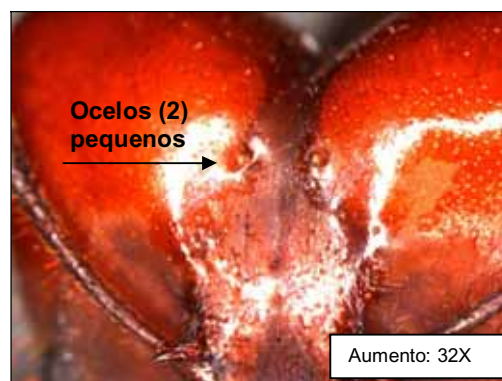
2. No final do 1º segmento do gáster e na lateral da cabeça, próximo aos olhos, foram detectados alguns pêlos curtos;



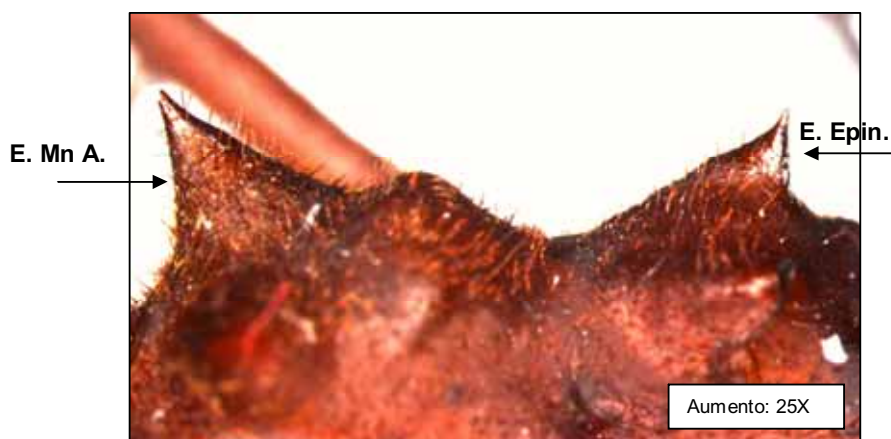
3. A cabeça possui reticulação fina;



6. Os ocelos estão sempre presentes, mas há variação no número (2/ 3) e no tamanho dos mesmos (grande/ pequeno);



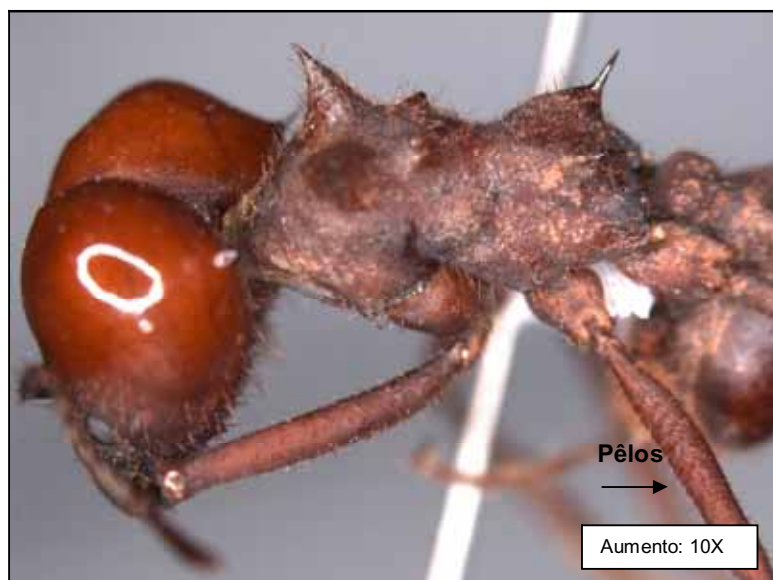
7. Os espinhos mesonotais anteriores (E. Mn. A.) são sempre grossos, cônicos e divergentes, mas foram encontrados alguns mais longos que os espinhos epinotais (E. Epin.);



9. Alguns espinhos epinotais (E. Epin.) são bastante alongados, já outros pouco alongados, e podem ser dirigidos para os lados, para cima ou para trás;

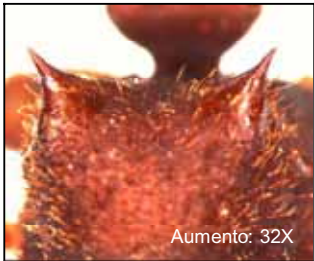
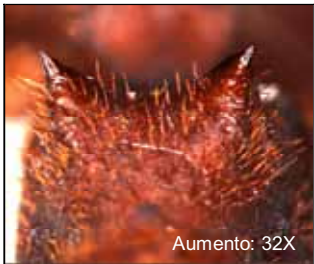


10. Foram observadas pernas com pêlos compridos, equivalentes aos pêlos do pronoto.



Com esta análise, foi possível encontrar algumas variações morfológicas nas estruturas consideradas para os dois grupos. Abaixo, é mostrada a tabela-resumo com o caráter analisado, a respectiva variação encontrada e os exemplos dessa variação nos espécimes analisados (Tabela 5.4.). Para os exemplos, procurou-se selecionar espécimes que fossem de regiões geográficas distintas e também pertencentes a grupos gênicos distintos.

Tabela 5.4 Análise da variação morfológica para a casta dos soldados de *Atta laevigata*. São mostrados o caráter analisado, a variação encontrada e exemplos mais representativos dessa variação.

Caráter: ESPINHO MESONOTAL ANTERIOR		
Variação encontrada	Exemplos	
Formato do espinho	 Aumento: 32X Cônico (GV15-04/ G1)	 Aumento: 32X Tubérculo (MB16-44/ G2)
Caráter: ESPINHO MESONOTAL POSTERIOR		
Variação encontrada	Exemplos	
Formato do espinho	 Aumento: 32X Espiniforme (GV15-04/ G1)	 Aumento: 32X Tubérculo (MB16-41/ G2)
Caráter: ESPINHO EPINOTAL		
Variação encontrada	Exemplos	
Tamanho do espinho	 Aumento: 32X Curto (JMGV14-08/ G2)	 Aumento: 32X Longo (E988/ G1)
Formato do espinho	 Aumento: 32X Cônico (JMGV14-05/ G2)	 Aumento: 32X Espiniforme (GV15-20/ G1)

Caráter: OCELOS	
Variação encontrada	Exemplos
Número de ocelos	 
Tamanho do ocelo	 

Com base nessas análises é possível notar que todos os caracteres morfológicos propostos não são seguros, gerando dúvidas de identificação dos espécimes. O alto grau de polimorfismo encontrado para algumas estruturas demonstra não ser possível identificar com segurança os espécimes através da chave taxonômica proposta.

Além disso, os resultados obtidos com a análise morfológica para os soldados, puderam ser confrontados com as características descritas para as subespécies já propostas de *Atta laevigata*, de acordo com a revisão da espécie em Gonçalves, 1942. (Tabela 5.5).

Tabela 5.5 Quadro comparativo entre as subespécies já propostas para *Atta laevigata* (Gonçalves, 1942).

Espécie	Subespécie	Autor	Descrição Morfológica	Local-Tipo
<i>Atta laevigata</i>	<i>saltensis</i>	Forel, 1913	Pêlos erectos do pronoto raros, ou ausentes; Espinhos mesonotais lisos e brilhantes;	Província de Salta, Argentina
<i>Atta laevigata</i>	<i>saltensis</i> var. <i>obscurata</i>	Gallardo, 1916	Coloração parda enegrecida ou negra	Argentina
<i>Atta laevigata</i>	<i>lizeri</i>	Santschi, 1922	Cabeça angulosa dos lados; Fronte, lados do tórax e pernas, finamente granulados;	Bolívia
<i>Atta laevigata</i>	<i>venezuelensis</i>	Gonçalves, 1942	Pubescência no pronoto; Espinhos epinotais-são mais finos e menores que os mesonotais anteriores;	El Valle, Venezuela

Considerando as características mencionadas acima, examinamos os mesmos exemplares de soldados e observamos que:

- Todos os indivíduos apresentam pêlos em abundância em todo o tórax, principalmente no pronoto, nas pernas e nos segmentos finais do gáster;
- A coloração observada é extremamente variável, com indivíduos apresentando cor parda avermelhada a parda enegrecida, ou castanha;
- Todas as cabeças são arredondadas dos lados;
- Os espinhos mesonotais possuem pêlos e algumas vezes são brilhantes e lisos somente na extremidade dos espinhos;
- Os espinhos epinotais podem ser mais longos que os mesonotais anteriores.

De acordo com as análises, observa-se que não há correlação das características encontradas com aquelas consideradas para qualquer das subespécies já descritas, corroborando para a atual posição taxonômica da espécie sem subespécies.

Com esta análise verificamos a dificuldade da identificação de formigas baseada em caracteres morfológicos, tanto pelo alto grau de polimorfismo quanto pela ausência de caracteres capazes de diagnosticar com segurança a espécie.

Assim, não foi possível fazer qualquer tipo de agrupamento entre os espécimes, nem encontrar qualquer congruência entre os dados moleculares (grupos gênicos) e os dados morfológicos, pois mesmo aqueles indivíduos com padrão morfológico similar (ausência de polimorfismos), apresentaram variações gênicas claras. Portanto, não houve nenhuma sinapomorfia, ou algum caráter diagnóstico que pudesse caracterizar cada grupo gênico determinado.

Além disso, a adaptação de diferentes populações a condições ambientais similares, de uma mesma região geográfica, é fenotipicamente indistinguível, ou seja, não foi observada nenhuma característica morfológica que indique a origem geográfica dos indivíduos.

Baseado nisso, duas populações de ocorrência próxima, como Botucatu-SP (G1) e Bauru-SP (G2) poderiam ser consideradas como espécies simpátricas, que possuem diversidade genética habitando a mesma faixa geográfica, mas que são morfolologicamente indistinguível. É possível notar também populações vivendo em diferentes locais, que não apresentam variação gênica significativa, a ponto de separá-las filogeneticamente, demonstrando um alto índice de similaridade entre as seqüências, mas que apresentaram polimorfismos morfológicos claros, como nos espécimes de Uberlândia-MG, Brasília-DF, Serranópolis-GO, Araguainha-MT e Sinop-MT.

5.5.2. Caracterização morfológica de *Acromyrmex balzani*

Acromyrmex balzani possui uma história taxonômica marcada por controvérsias, que residem no fato de ser considerada como uma espécie ou uma subespécie de *Acromyrmex landolti*. Assim, a caracterização morfológica para esta formiga foi baseada na análise das chaves taxonômicas (GONÇALVES, 1961; FOWLER, 1988; MAYHÉ-NUNES, 1991) propostas para a identificação de *landolti* e *balzani*, considerando os caracteres morfológicos (Figuras 5.3 e 5.4) e informações sobre a distribuição geográfica utilizados para a diagnose de cada grupo.

As chaves taxonômicas propostas por estes três autores foram analisadas para todos os espécimes coletados, marcando as congruências encontradas, ou seja, as concordâncias entre os caracteres morfológicos apontados em cada chave, e as incongruências, ou seja, discordâncias entre as observações contidas nas chaves e o observado no presente estudo.

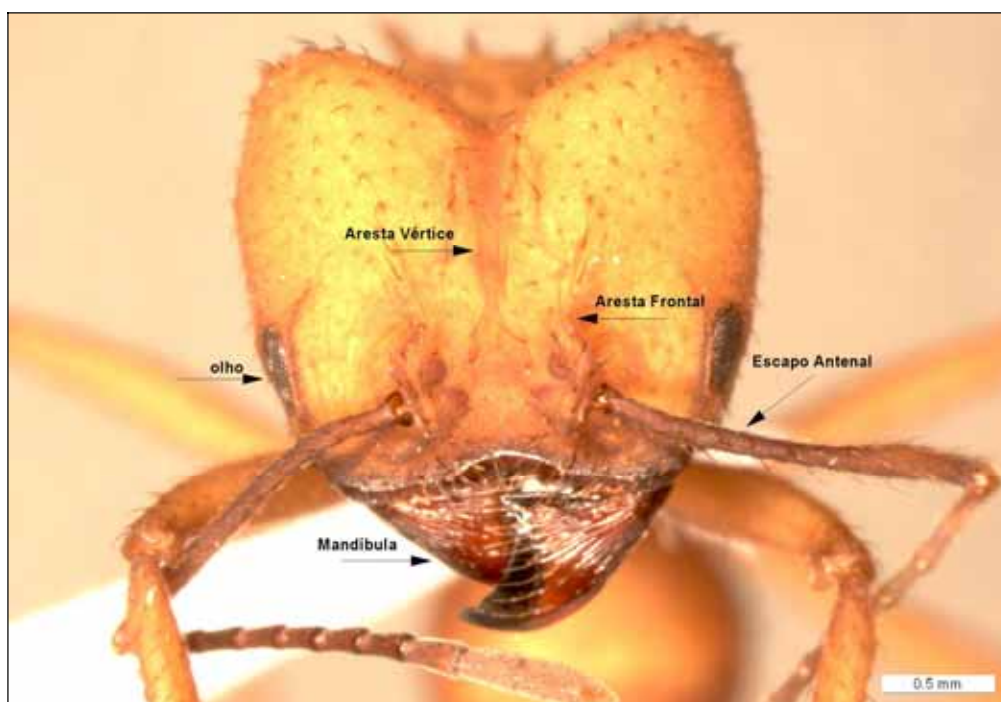


Figura 5.3 Vista frontal de *Acromyrmex balzani*, com os caracteres da cabeça utilizados para o diagnóstico da espécie.



Figura 5.4 Vista lateral de *Acromyrmex balzani* com caracteres importantes para o diagnóstico da espécie: a – espinho occipital, b – espinho pronotal mediano, c – espinho pronotal lateral, d – espinho mesonotal anterior, e – espinho mesonotal posterior, f – crista metanotal, g – espinho epinotal, h – pecíolo (1º segmento), i – pós-pecíolo (2º segmento) e j – 3º segmento gaster.

Abaixo são mostradas as chaves taxonômicas propostas e seus respectivos autores (a, b e c) por ordem cronológica, com as descrições morfológicas para os grupos e as considerações gerais sobre os espécimes analisados.

a) Gonçalves, 1961

Gonçalves (1961) considerou *Acromyrmex (Moellerius) landolti landolti* Forel, 1884 e *Acromyrmex (Moellerius.) landolti balzani* Emery, 1890, rebaixando assim *balzani* à categoria de subespécie de *landolti*, por não ter encontrado diferenças significativas que justificassem a separação em duas espécies. Abaixo são mostrados os caracteres taxonômicos apontados pelo autor para identificação.

Caracteres morfológicos para a identificação de operárias maiores de *A. (M.) landolti landolti* e *A. (M.) landolti balzani* (Gonçalves, 1961), onde são destacadas em cinza as observações diferenciais entre as duas subespécies:

▪ Olhos chatos, não-salientes. Tegumento sem reticulação microscópica. Cabeça e gáster foscos. Gáster tuberculado. Espinhos pronotais laterais e pronotais medianos muito pequenos, tuberculiformes. Espinhos mesonotais anteriores e epinotais bem desenvolvidos..... *A. (M.) landolti landolti*

Locais de Ocorrência: Brasil - AM, PA, MA, PI, CE, RN, PB, PE, AL, BA, MG e MT; Colômbia e Venezuela.

▪ Cabeça um pouco mais estreita e olhos menores que a forma típica. Espinhos mesonotais anteriores com cerca da metade ou pouco menos do seu comprimento na forma típica.....A. (M.) *landolti balzani*

Locais de Ocorrência: Brasil - RS, SC, e SP; Paraguai e Argentina.

Considerações:

Para identificar os espécimes, inicialmente seguiu-se a chave dicotômica para operárias maiores de *Acromyrmex* encontrada em Gonçalves (1961). Todos os espécimes foram identificados até o nível de subgênero *Moellerius* e espécie *landolti*, porém com algumas variações, que não ocorrem em nenhuma outra espécie.

Assim, em todos os espécimes analisados (Tabelas 4.1 e 4.2) observamos que somente o espinho pronotal mediano é pequeno, sendo o pronotal lateral bem desenvolvido (Figura 5.5.). O espinho mesonotal anterior é bem reduzido em relação ao epinotal e pronotal lateral (Figura 5.6) em todos os espécimes. O tamanho da cabeça e dos olhos é relativamente igual entre os espécimes e não deve ser utilizado como caráter diferencial.

Portanto, uma vez que todos os espécimes analisados apresentam o espinho mesonotal anterior reduzido, caráter apontado como diferencial entre as subespécies, não é possível classificar nenhum dos espécimes.

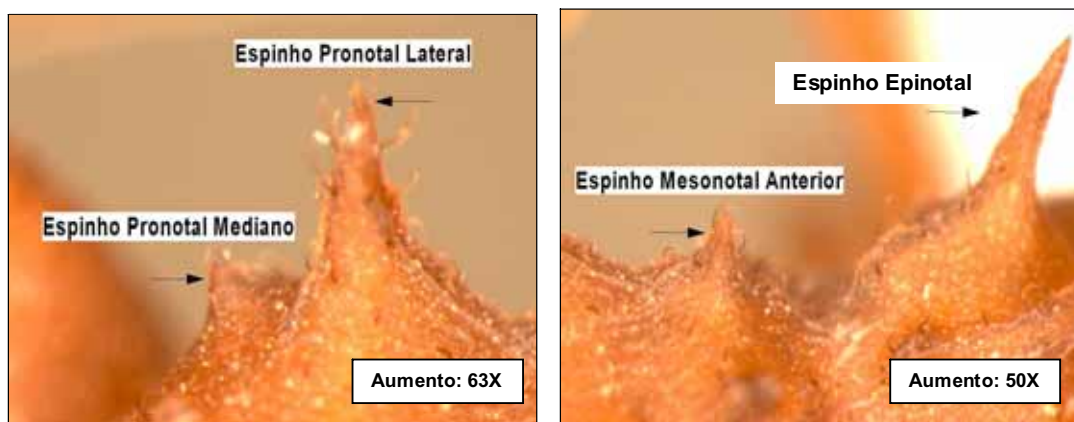


Figura 5.5 Espinho Pronotal Lateral e Mediano **Figura 5.6** Espinho Mesonotal Anterior e Epinotal

O espinho mesonotal é proposto como desenvolvido para *landolti*, mas foi observado como reduzido. Para *balzani*, o mesmo espinho é proposto com tamanho menor que o de *landolti*, mas não foi possível fazer essa comparação, uma vez que todos possuem tamanho reduzido.

Desse modo, com base nos caracteres taxonômicos propostos, não conseguimos identificar e classificar com segurança nenhum dos espécimes analisados, devido à variação encontrada nos caracteres propostos. Esses caracteres também não são seguros e efetivos para a diferenciação das subespécies.

Não houve como estabelecer relações entre as regiões geográficas observadas pelo autor e os locais de coleta amostrados neste estudo, pois não foi possível identificar corretamente os espécimes. Também não foi realizada nenhuma correlação com os resultados moleculares e com os grupos anteriormente definidos.

b) Fowler, 1988

Fowler (1988) considerou *Acromyrmex (M.) landolti* Forel, 1884 e *Acromyrmex (M.) balzani* Emery, 1890, restabelecendo assim, o *status* de espécie de *balzani*, com base na morfologia de operária. Abaixo são mostrados os caracteres taxonômicos apontados pelo autor para identificação.

Caracteres morfológicos para a identificação de operárias maiores de *A. (M.) landolti* e *A. (M.) balzani* (Fowler, 1988), onde são destacadas em cinza as observações diferenciais entre as duas espécies:

- Olhos pequenos, não-salientes. Espinho occipital tuberculiforme e reduzido. Espinho pronotal lateral bem desenvolvido, orientado para a região anterior do corpo.....*A. (M.) landolti*
Localização geográfica: ao Norte da América do Sul.
- Olhos pequenos, não-salientes. Espinho occipital tuberculiforme a proeminente, sendo mais conspícuo que em *landolti*. Espinho pronotal lateral ereto e orientado para a região posterior do corpo.....*A. (M.) balzani*
Localização geográfica: restrita ao sul da Bacia Amazônica.

Considerações:

Para identificar os espécimes, inicialmente seguiu-se a chave dicotômica para operárias maiores do subgênero *Moellerius* encontrada em Fowler (1988) e em seguida, os caracteres propostos para cada espécie.

Observamos dois dos caracteres propostos para a identificação das espécies em um mesmo espécime (E968 e E1121), o que dificultou a

identificação dos mesmos. Abaixo vemos o espinho occipital reduzido (caráter referido a *landolti*) e o espinho pronotal lateral ereto e orientado posteriormente (caráter referido a *balzani*) (Figura 5.7).

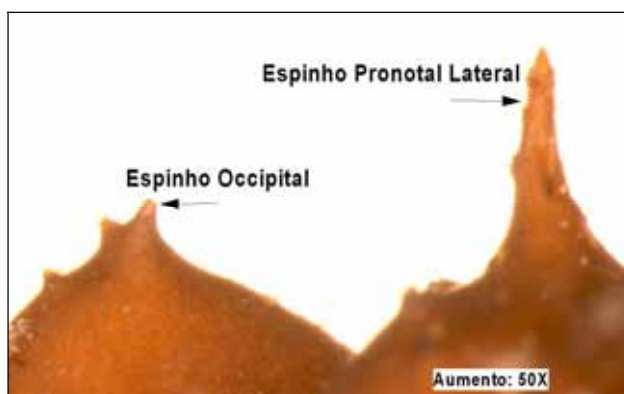


Figura 5.7 Espinho Occipital reduzido e Espinho Pronotal Lateral orientado posteriormente.

Assim, conseguimos identificar com base nos caracteres morfológicos definidos nessa chave taxonômica, todos os demais espécimes analisados e classificá-los como *A. (M.) landolti* (Figura 5.8) ou *A. (M.) balzani* (Figura 5.9), definindo os grupos (referência aos grupos filogenéticos, obtidos a partir das análises moleculares, com a respectiva espécie nominal e códigos de identificação :

G. 1 - *A. (M.) balzani*: E408, E913, E967

G. 2.1 - *A. (M.) balzani*: E308, E994, E262, E294, E616

G. 2.2 – *A. (M.) balzani*: E904; E905; E848, E969

A. (M.) landolti: UGM050724-02; UGM050724-03; UGM050724-04;
UGM050724-07.

G. 2.3 - *A. (M.) balzani*: E688, E618, E698

A. (M.) landolti: E981, E984, 615, 680, 684, E641, E643

De acordo com o autor, *A. (M.) landolti* ocorre ao Norte da América do Sul, coerente com nossos resultados para a espécie (Capítulo II), com amostragens na Colômbia, Guyana Francesa e Amapá (Brasil). Para *A. (M.) balzani* é indicada a localização ao sul da Bacia Amazônica, também coerente com a nossa amostragem.

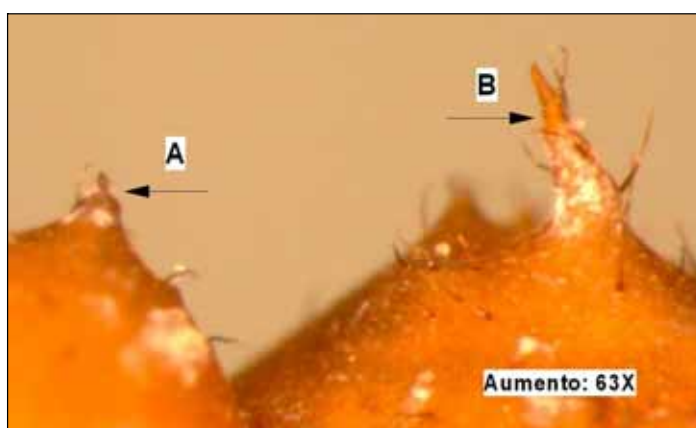


Figura 5.8 *A. (M.) landolti*: **A.** Espinho occipital reduzido; **B.** Espinho pronotal lateral bem desenvolvido e orientado anteriormente.

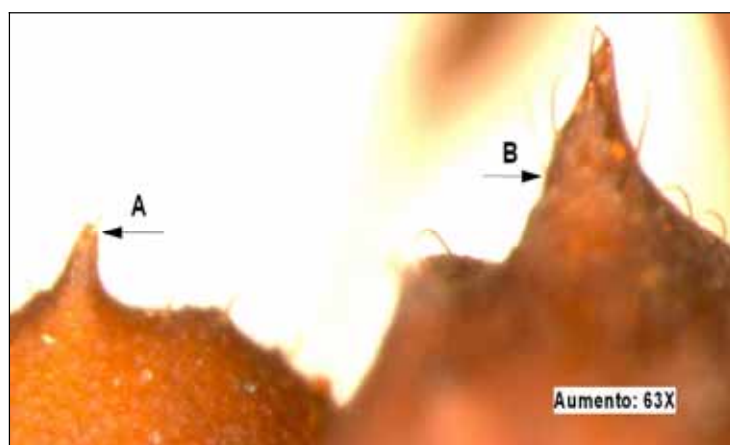


Figura 5.9 *A. (M.) balzani*: **A.** Espinho occipital proeminente, mais conspícuo; **B.** Espinho pronotal lateral ereto e orientado posteriormente.

c) Mayhé-Nunes, 1991

Mayhé-Nunes (1991) considerou *Acromyrmex (M.) landolti landolti* Forel, 1884 e *Acromyrmex (M.) landolti balzani* Emery, 1890, seguindo a proposta de Gonçalves (1961) com *balzani* como subespécie de *landolti*, por considerar difícil separar os dois táxons em espécies distintas. Abaixo são mostrados os caracteres taxonômicos apontados pelo autor para identificação.

Caracteres morfológicos para a identificação de operárias maiores de *A. (M.) landolti landolti* e *A. (M.) landolti balzani* (Mayhé, 1991), onde são destacadas em cinza as observações diferenciais entre as duas subespécies:

▪ Espinhos epinotais com o comprimento maior que a distância interna entre eles na base. Espinhos occipitais alongados. Arestas do vértice ausentes *A. (M.) landolti landolti*

Locais Observados: Colômbia, Venezuela e Guiana.

▪ Espinhos epinotais com o comprimento quase igual ou menor que a distância interna entre eles na base. Espinhos occipitais tuberculiformes. Arestas do vértice presentes *A. (M.) landolti balzani*

Locais Observados: Brasil - GO, MS, SP e SC.

Considerações:

Para identificar os espécimes, inicialmente seguiu-se a chave dicotômica para operárias maiores de *Acromyrmex* proposta por Mayhé-Nunes (1991). Todos os espécimes foram identificados até o nível de subgênero *Moellerius* e

espécie *landolti*, mas com algumas variações que não fizeram referência a nenhuma das espécies descritas. Em seguida, os caracteres propostos para as subespécies *landolti* e *balzani* foram analisados.

Os espécimes do Grupo 2.3. (615, 680, 684, E641, E643, E981, E984, E688, E618 e E698) foram identificados como *A. (M.) landolti landolti*, pois as observações encontradas foram congruentes com os caracteres apontados para a descrição da espécie. Os espécimes E994 e E1121 (Grupo 2.1.) foram identificados como *A. (M.) landolti balzani*, devido às similaridades encontradas com as descrições propostas e são espécimes coletados no Estado de São Paulo, concordando com a distribuição geográfica proposta para a subespécie.

Os demais espécimes, descritos a seguir, geraram dúvidas quanto à identificação, pois observamos caracteres que fazem referência tanto a *A. (M.) landolti landolti* quanto a *A. (M.) landolti balzani*, em um mesmo indivíduo.

Assim, foram encontradas as seguintes incongruências:

- Espécimes (UGM050724-02, E294) sem arestas do vértice (*landolti*) (Figura 5.10.), porém com espinhos epinotais com o comprimento menor que a distância interna entre eles (*balzani*) (Figura 5.11.) e espinhos occipitais tuberculiformes (*balzani*) (Figura 5.12.).
- Espécimes (UGM050724-03, UGM050724-04, UGM050724-07, E308, E408, E913, E968) com espinhos epinotais com o comprimento maior que a distância interna entre eles (*landolti*) (Figura 5.13.) e espinhos

occipitais alongados (*landolti*) (Figura 5.14.), mas com arestas do vértice (*balzani*) (Figura 5.15.).

- Espécimes (E848, E904, E905, E969) com espinhos epinotais com o comprimento maior que a distância interna entre eles (*landolti*) (Figura 5.13.), porém com espinhos occipitais tuberculiformes (*balzani*) (Figura 5.12.) e arestas do vértice presentes (*balzani*) (Figura 5.15.).
- Espécimes (E967, E616, E262) com espinhos epinotais com o comprimento menor que a distância interna entre eles (*balzani*) (Figura 5.11.) e arestas do vértice presentes (*balzani*) (Figura 5.15.), mas com espinhos occipitais alongados (*landolti*) (Figura 5.14.).

Além disso, observamos entre os espécimes estudados, a ocorrência de táxons identificados como *A. (M.) landolti landolti* com ocorrência nos Estados do Amapá, Goiás e São Paulo, locais não apontados pelo autor.

Exemplos das incongruências encontradas nos espécimes analisados, com base nos caracteres morfológicos propostos por Mayhé-Nunes, 1991:



Figura 5.10 Ausência de Aresta do Vértice

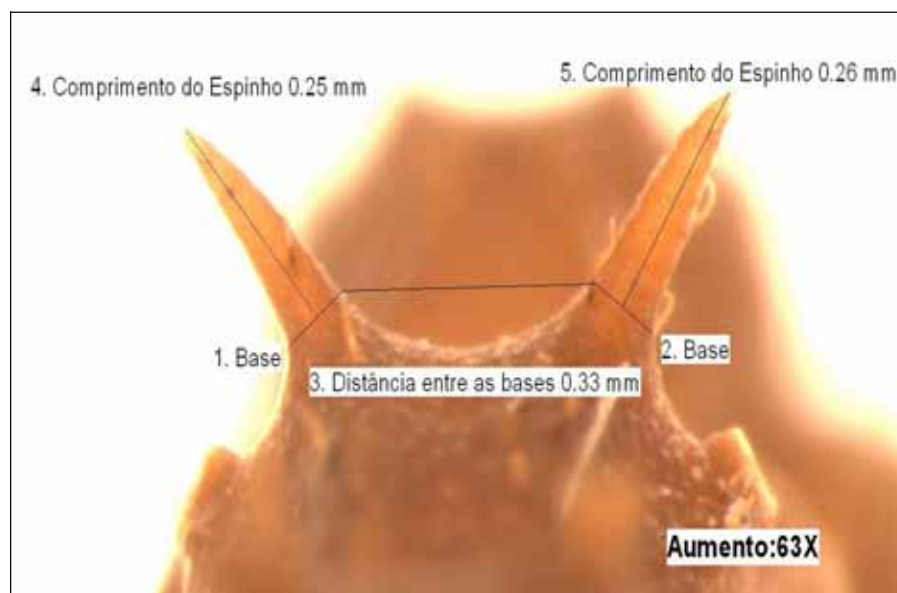


Figura 5.11 Espinhos Epinotais com comprimento menor que a distância interna entre eles.



Figura 5.12 Espinhos Occipitais tuberculiformes



Figura 5.13 Espinhos Epinotais com comprimento maior que a distância interna entre eles



Figura 5.14 Espinhos Occipitais alongados



Figura 5.15 Arestas do Vértice presentes.

Com os resultados acima, podemos concluir que:

A chave proposta por Gonçalves (1961) não deve ser utilizada para a identificação por concentrar caracteres de difícil análise e ausência de descrições específicas com caracteres determinantes e de diferenciação entre os grupos referidos.

A chave elaborada por Fowler (1988) apresentou grandes congruências com as análises filogenéticas moleculares realizadas, apesar de a classificação não ter funcionado para dois espécimes (E968 e E1121). Acreditamos que os caracteres selecionados para a diferenciação dos grupos são de fácil localização, porém podem gerar dúvidas de identificação por tratarem da posição de espinhos, característica que, dependendo da observação, é erroneamente interpretada.

A chave descrita por Mayhé-Nunes (1991) propõe caracteres que podem gerar dúvidas de identificação por envolverem tamanho relativo entre comprimento e distância de espinhos, medidas que podem ser executadas erroneamente, implicando em conclusões indevidas. Consideramos que o caráter presença/ ausência de aresta do vértice não deve ser utilizado, por não ser determinante e exclusivo de cada grupo referido.

Apesar disso, consideramos o método morfológico descrito por Fowler (1988) como o mais adequado para identificação destas formigas, por ter demonstrado mais compatibilidade com os resultados moleculares encontrados.

Também observamos que as descrições geográficas relatadas para os grupos, muitas vezes mostraram-se incongruentes, fato que pode ser devido à

subamostragem das áreas de ocorrência. Além disso, com o crescimento da agropecuária, abertura de rodovias e desmatamentos, a expansão e dispersão devem ser consideradas como fatores de ampliação da distribuição geográfica das espécies.

Assim, podemos resumir nossos resultados com a tabela 5.6., incluindo os espécimes estudados, a classificação molecular (grupos filogenéticos) e a classificação taxonômica, baseada em Gonçalves (1961), Fowler (1988) e Mayhé-Nunes (1991).

Tabela 5.6 Quadro comparativo entre as classificações analisadas (molecular e morfológica) para os espécimes coletados de *Acromyrmex balzani*. Onde, “?” significa dúvida de identificação.

Espécime	Classificação			
	Molecular	Gonçalves, 1961	Fowler, 1988	Mayé-Nunes, 1991
E 408	Grupo 1	?	<i>A. (M.) balzani</i>	?
E 913	Grupo 1	?	<i>A. (M.) balzani</i>	?
E 967	Grupo 1	?	<i>A. (M.) balzani</i>	?
E 968	Grupo 1	?	?	?
E 308	Grupo 2.1	?	<i>A. (M.) balzani</i>	?
E 994	Grupo 2.1	?	<i>A. (M.) balzani</i>	<i>A. (M.) landolti balzani</i>
E 294	Grupo 2.1	?	<i>A. (M.) balzani</i>	?
E 616	Grupo 2.1	?	<i>A. (M.) balzani</i>	?
E 262	Grupo 2.1	?	<i>A. (M.) balzani</i>	?
E 1121	Grupo 2.1	?	?	<i>A. (M.) landolti balzani</i>
UGM050724-02	Grupo 2.2.	?	<i>A. (M.) landolti</i>	?
UGM050724-03	Grupo 2.2.	?	<i>A. (M.) landolti</i>	?
UGM050724-04	Grupo 2.2.	?	<i>A. (M.) landolti</i>	?
UGM050724-07	Grupo 2.2.	?	<i>A. (M.) landolti</i>	?
E 848	Grupo 2.2.	?	<i>A. (M.) balzani</i>	?
E 905	Grupo 2.2.	?	<i>A. (M.) balzani</i>	?
E 969	Grupo 2.2.	?	<i>A. (M.) balzani</i>	?
E 904	Grupo 2.2.	?	<i>A. (M.) balzani</i>	?
615	Grupo 2.3.	?	<i>A. (M.) landolti</i>	<i>A. (M.) landolti landolti</i>
680	Grupo 2.3.	?	<i>A. (M.) landolti</i>	<i>A. (M.) landolti landolti</i>
684	Grupo 2.3.	?	<i>A. (M.) landolti</i>	<i>A. (M.) landolti landolti</i>
E 641	Grupo 2.3.	?	<i>A. (M.) landolti</i>	<i>A. (M.) landolti landolti</i>
E 643	Grupo 2.3.	?	<i>A. (M.) landolti</i>	<i>A. (M.) landolti landolti</i>

E981	Grupo 2.3.	?	<i>A. (M.) landolti</i>	<i>A. (M.) landolti landolti</i>
E 984	Grupo 2.3.	?	<i>A. (M.) landolti</i>	<i>A. (M.) landolti landolti</i>
E 688	Grupo 2.3.	?	<i>A. (M.) balzani</i>	<i>A. (M.) landolti landolti</i>
E 618	Grupo 2.3.	?	<i>A. (M.) balzani</i>	<i>A. (M.) landolti landolti</i>
E 698	Grupo 2.3.	?	<i>A. (M.) balzani</i>	<i>A. (M.) landolti landolti</i>

5.5.3. Discussões Finais:

As dificuldades apontadas com a análise taxonômica das espécies demonstraram que alguns dos caracteres morfológicos podem representar critérios impeditivos para a correta identificação destas formigas.

O alto nível de variação intraespecífica encontrado entre os espécimens analisados pode estar relacionado com o fato de que, apesar de serem geneticamente relacionados, membros de diferentes castas, ou indivíduos de uma mesma casta, podem apresentar polifenismo, ou seja, polimorfismo ambiental (GULLAN e CRASTON, 2005), ou habilidade de animais com o mesmo genótipo desenvolver dois ou mais fenótipos alternativos diferentes (NIJHOUT, 1999).

Alguns autores consideram que, para auxiliar na utilização consistente dos caracteres morfológicos na sistemática destas formigas, seria necessário também analisar as formigas operárias juntamente com suas respectivas formas sexuadas (BORGMEIER, 1950). Essa premissa é dificultada pelo fato das castas sexuadas aparecerem uma vez por ano em épocas que variam de acordo com a latitude na grande extensão geográfica ocupada pelas espécies (FORTI e BOARETTO, 1997). Mas, acreditamos que mesmo com as formas sexuadas não seja possível fazer uma classificação taxonômica inequívoca e congruente com a classificação molecular.

Além disso, durante um longo período, para a classificação das formigas foi utilizado um sistema pentanomial onde eram determinados o gênero, subgênero, espécie, subespécie e variedade/ forma. Isso colaborou para que diversas espécies sofressem alterações em sua classificação, o que, conseqüentemente, gerou constantes mudanças nas coleções de referência e confusões no reconhecimento das espécies.

Portanto, há a necessidade de revisão sistemática destas formigas, *Atta laevigata*, *Acromyrmex landolti* e *Acromyrmex balzani* de importância agrícola e econômica, para um melhor entendimento e reconhecimento das espécies, e também para a adoção de medidas adequadas e específicas de controle. A correta identificação morfológica permitirá realizar levantamentos seguros sobre a ocorrência das mesmas em determinada área e possibilitar monitorar a biodiversidade de ambientes.

5.6. CONCLUSÃO

A caracterização morfológica das espécies demonstrou que *Atta laevigata* possui alto grau de polimorfismo morfológico entre os caracteres selecionados, demonstrando a dificuldade de identificação baseada na taxonomia tradicional. Os caracteres utilizados para a identificação da espécie *Acromyrmex balzani* possuem diversas incongruências que ratificam a história taxonômica da espécie, marcada por controvérsias e divergências de classificação.

Diante dos resultados obtidos com a análise dos espécimes estudados, observamos a dificuldade da sistemática atual baseada em caracteres morfológicos e a falta de suporte da taxonomia tradicional para a correta

identificação dessas espécies, evidenciando que os gêneros *Atta* e *Acromyrmex* necessitam de revisão.

5.7. REFERÊNCIAS

AGOSTI, D.; MAJER, J. D.; ALONSO, L. E.; SCHULTZ, T. R. **Ants**: standard methods for measuring and monitoring biodiversity. Washington: Smithsonian Institution Press, 2000. 280 p.

BOLTON, B. **A new general catalogue of the ants of the world**. Cambridge: Harvard University Press, 1995. 504 p.

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

FORTI, L. C.; BOARETTO, M. A. C. **Formigas Cortadeiras**: Biologia, Ecologia, Danos e Controle. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 1997. 61 p.

FOWLER, H.G. Taxa of Neotropical grass-cutting ants, *Acromyrmex* (*Moellerius*) (Hymenoptera: Formicidae: Attini). **Científica**, v. 16, n. 2, p. 281-296, 1988.

GONÇALVES, C.R. Contribuição para o gênero *Atta* Fabr., das formigas saúvas. **Bol. Soc. Bras. Agronomia**, Rio de Janeiro, v.5, n.3., 1942.

GONÇALVES, C.R. O Gênero *Acromyrmex* no Brasil (Hym. Formicidae). **Studia Ent.**, v.4, p. 113 -173, 1961.

GULLAN, P. J.; CRASTON, P. S. **The insects**: an outline of entomology. 3. ed., Blackwell, 2005. 505 p.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E.O. **The ants**. Cambridge: The Belknap Press of Harvard University Press, 1990.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. **Journey to the Ants**. Cambridge: The Belknap Press of Harvard University, 1994.

MAYHÉ-NUNES, A. J. **Estudo de *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae) com ocorrência constatada no Brasil**: subsídios para uma análise filogenética. 1991. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

NIJHOUT, H. F. Control mechanisms of polyphonic development in insects. **BioScience**, v. 49, p. 181 -192, 1999.

WILD, A. Taxonomy and Distribution of the Argentine Ant, *Linepithema humile* (Hymenoptera: Formicidae). **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v. 97, n. 6, p. 1204-1215, 2004.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As análises moleculares e filogenéticas permitiram evidenciar a existência de dois grupos gênicos simpátricos de *Atta laevigata*, largamente distribuídos pelo Brasil, sugerindo ausência de fluxo gênico entre os espécimes destes grupos, a ponto de separá-los especificamente; e dois grupos irmãos entre os espécimes seqüenciados de *Acromyrmex balzani* - *landolti*, com clados estruturados geograficamente e com ampla distribuição.

As análises morfológicas indicam que para identificação correta das espécies, não é possível utilizar os caracteres morfológicos tradicionalmente considerados para taxonomia de formigas, devido à sua variabilidade e à ausência de caracteres seguros e diagnósticos de cada espécie. Desse modo, a descrição dos grupos estudados baseada nesses caracteres, demonstra ser inválida pelo presente estudo, por gerar dúvidas de identificação e de classificação taxonômica.

Assim, nossos resultados apontam para a necessidade do uso da sistemática molecular como uma ferramenta de estudo adicional à sistemática tradicional, demonstrando a eficiência de marcadores moleculares e inferências filogenéticas para a identificação de grupos naturais entre amostras representativas das espécies estudadas. A sistemática molecular pode ser utilizada também com eficiência para estimar a variabilidade genética de formigas, com potencial para resolver o limite entre espécies do gênero *Atta* e *Acromyrmex*.

7. REFERÊNCIAS

AGOSIT, D.; JOHNSON, N.F. 2003. **La nueva taxonomía de hormigas**. Pages 45-48 in FERNÁNDEZ, F. Introducción a las hormigas de la región neotropical. Instituto Humboldt, Bogotá. 424 pp.

AGOSTI, D.; MAJER, J. D.; ALONSO, L. E.; SCHULTZ, T. R. **Ants: standard methods for measuring and monitoring biodiversity**. Washington: Smithsonian Institution Press, 2000. 280 p.

AGOSTI, D.; JOHNSON, N. F. **Antbase**. 2005. Apresenta informações sobre as espécies de formigas do mundo. Disponível em: <<http://antbase.org/>>. Acesso em 10 abr. 2007.

AMANTE, E. **Influência de alguns fatores microclimáticos sobre a formiga saúva *Atta laevigata* (F. Smith, 1858), *Atta sexdens rubropilosa* (Forel, 1908), *Atta bisphaerica* (Forel, 1908) e *Atta capiguara* (Gonçalves, 1944) (Hymenoptera, Formicidae), em formigueiros localizados no estado de São Paulo**. 1972. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

ASHLEY, M.V.; DOW, B.D. The use of microsatellite analysis in population biology: Background, methods and potential applications. In: SCHIERWATER, B.; STREIT, B.; WAGNER, G.P.; DESALLE, R. **Mol. Ecol. Evol.**: Approaches and Applications. Basel: Birkhauser Verlag, 1994. p. 185–201.

ASTRUC, C.; JULIEN, J. F.; ERRARD, C.; LENOIR, A. Phylogeny of ants (Formicidae) based on morphology and DNA sequence data. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 31, p. 880-893, 2004.

AVISE, J.C.; ARNOLD, J.; BALL, R.M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J.E.; REEB, C.A.; SAUNDERS, N.C. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Ann. Rev. Ecol. Syst.**, v. 18, p. 489-522, 1987.

AVISE, J.C. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**. London: Chapman & Hall, 1994.

AVISE, J.C. **Phylogeography: the history and formation of species**. Harvard: Harvard University Press, 2001. 447 p.

AYALA, F.J.; WETTERER, J.K.; LONGINO, J.T.; HARTL, D.L. Molecular phylogeny of *Azteca* ants (Hymenoptera: Formicidae) and the colonization of *Cecropia* trees. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 5, p. 423-428, 1996.

BACCI JR., M. et al. A molecular marker for evolution studies of closely related specimens of higher Attini ants. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 30., 2001, Caxambu.

BASS, M.; CHERRETT, J.M. Fungal hyphae as a source of nutrients for the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **Physiol. Entomol.**, v. 20, n. 01, p. 1-6, 1995.

BASS, M.; CHERRETT, J.M. Leaf-cutting ants (*Formicidae*, *Attini*) prune their fungus to increase and direct its productivity. **Function. Ecol.**, v. 10, n. 01, p. 55-61, 1996.

BAUR, A.; CHALWATZIS, N.; BUSCHINGER, A.; ZIMMERMANN, F.K. Mitochondrial DNA sequences reveal close relationships between social parasitic ants and their host species. **Curr. Genet.**, v. 28, p. 242-247, 1995.

BOLTON, B. **Identification Guide to the Ant Genera of the World**. Cambridge: Harvard University Press, 1994.

BOLTON, B. **A new general catalogue of the ants of the world**. Cambridge: Harvard University Press, 1995. 504 p.

BOLTON, B. Synopsis and classification of Formicidae. **Memoirs of the American Entomol. Inst.**, v. 71, p. 1-370, 2003.

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

BORGMEIER, T. Revision der gattung *Atta fabricius* (Hymenoptera, Formicidae). **Studia Entomológica**, v.2, p. 321-390, 1959.

BRANDÃO, C.R.F. Adendos ao catálogo abreviado das formigas da região neotropical (Hymenoptera: Formicidae). **R. Bras. Ent.**, v.35, n.2, p. 319-412, 1991.

BRANDÃO, C. R. F.; MAYHÉ-NUNES, A. J, **Um novo gênero de formiga cultivadora de fungus, *Mycetagroicus*, com a descrição de três espécies e comentários sobre a monofilia dos Attini (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae)**. In: XV ENCONTRO DE MIRMECOLOGIA, 15., 2001. p. 389-391.

BREMER, K. Branch support and tree stability. **Cladistics**, v. 10, p. 295–304, 1994.

BROWN JR., W. L. Diversity of ants. In: AGOSTI, D. et al. (Ed.). **Ants: standard methods for measuring and monitoring biodiversity**. Princeton: Smithsonian Institution, 2000. p. 45-79.

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

BUENO, O.C.; CAMPOS-FARINHA, A. E. de C. As formigas domésticas, In MARICONI, F.A.M. (Ed.). **Insetos e outros invasores de residências**. Piracicaba: FEALQ, 1999. p.135-180.

BUHS, J. B. Building on Bedrock: William Steel Creighton and the Reformation of Ant Systematics, 1925–1970. **J. Hist. Biol.**, v. 33, p. 27–70, 2000.

CHERRETT, J. M. History of the leaf-cutting problem. In: LOFGREN, C. .S; VANDER MEER, R. K. (Ed.). **Fire ants and leaf-cutting ants: biology and management**. Boulder: Westview Press, 1986. p. 7-10.

CHIOTIS, M.; JERMIIN, L. S.; CROZIER, R. H. A molecular frame-work for the phylogeny of the ant subfamily Dolichoderinae. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 17, p. 108-116, 2000.

CROZIER, R. H.; DOBRIC, N.; IMAI, H.T.; GRAUR, D.; CORNUET, J. M.; TAYLOR, R. W. Mitochondrial-DNA sequence evidence on the phylogeny of Australian jack-jumper ants of the *Myrmecia pilosula* complex. **Evol.**, v. 4, p. 20-30, 1995.

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

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

- DIEHL-FLEIG, E., **Formigas**: Organização social e ecologia comportamental. São Leopoldo: Editora Unisinos, 1995. 165p.
- ELLEGREN H. Microsatellites: Simple sequence with complex evolution. **Genetics**, v.5, p. 435-445, 2004.
- EMERY, C. Voyage de M. E. Simon au Venezuela (Décembre 1887 - Avril 1888). 7e Mémoire. Formicides. **Ann. Soc. Entomol. Fran.**, v. 6, n. 10, p. 55-76. 1890.
- EMERY, C. Études sur les Myrmicinae. V-VII. **Ann. Soc. Entomol. Belg.**, v. 57, p. 250–262, 1913.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p. 783-791, 1985.
- FERNANDES-MATIOLI, F.M. de C. Noções de Filogenética Molecular. **Biológico**, São Paulo, v.63, n.1/2, p.37-38, jan./dez., 2001.
- FJERDINGSTAD, E.J.; BOOMSMA, J.J.; THORÉN, P. Multiple paternity in the leafcutter and *Atta colombica* – a microsatellite DNA study. **Heredity**, v. 80, p.118–126, 1998.
- FJERDINGSTAD, E.J.; BOOMSMA, J.J. Queen mating frequency and relatedness in young *Atta sexdens* colonies. **Insectes Soc.**, v.47, p.354-356, 2000.
- FOREL, A. Sur la classification de la famille des Formicides, avec remarques synonymiques. **Ann. Soc. Entomol. Belg.**, v. 37, p.161-167, 1893.
- FOREL, A. Fourmis d'Argentine, du Bresil, du Guatemala et de Cuba. **Bull. Soc Valdoise Sci. Nat.**, v. 49, p. 203-250, 1913.
- FORTI, L. C.; BOARETTO, M. A. C. **Formigas Cortadeiras**: Biologia, Ecologia, Danos e Controle. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 1997. 61 p.
- FORTI, L.C. et al. Impacto das mudanças antrópicas na ocorrência de formigas cortadeiras (Hymenoptera, Formicidae). In: SIMPÓSIO DE MIRMECOLOGIA, 26., 2003. p. 141-142.
- FOWLER, H.G.; FORTI, L.C. Economics of grass-cutting ants. In: LOFGREN, C. S.; VANDER MEER, R.K. (Ed.). **Fire ants and leaf-cutting ants**: biology and management. Boulder: West-View Press, 1986. p. 18-35.
- FOWLER, H.G. Taxa of Neotropical grass-cutting ants, *Acromyrmex* (*Moellerius*) (*Hymenoptera: Formicidae: Attini*). **Científica**, v. 16, n. 2, p. 281-296, 1988.

FRANÇOZO, M. F. L.; BRANDÃO, C. R. F. Classificação dos Formicidae. **Biotemas**, v. 6, n. 1, p. 121-132, 1993.

FUTUYMA, D. J. **Biologia Evolutiva**. 2. ed. Ribeirão Preto, 1992. 646p.

GALLARDO, A. Notes systématiques et ethologiques sur lês formis Attines de la Republique Argentine. **Na. Mus. Nac. Hist. Natural**, B. Aires., v. 28, p. 317-344, 1916.

GIRIBET, G.; WHEELER, W.C. On gaps. **Mol. Phyl. Evol.**, v.13, n. 1, p. 132-143, 1999.

GONÇALVES, C.R. Contribuição para o gênero *Atta Fabr.*, das formigas saúvas. **Bol. Soc. Bras. Agronomia**, Rio de Janeiro, v.5, n.3., 1942.

GONÇALVES, C. R. Saúvas do nordeste do Brasil (*Atta* spp., *Formicidae*). **Bol. Fitos.**, v. 5, p. 1-42, 1951.

GONÇALVES, C.R. Distribuição, biologia e ecologia das saúvas. **Divulgação Agronômica**, 1960.

GONÇALVES, C.R. O Gênero *Acromyrmex* no Brasil (*Hym. Formicidae*). **Studia Ent.**, v.4, p. 113 -173, 1961.

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

GULLAN, P. J.; CRASTON, P. S. **The insects**: an outline of entomology. 3. ed., Blackwell, 2005. 505 p.

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

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Principles of Population Genetics**, 3rd. ed. Sunderland: Sinauer, 1997.

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

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E.O. **The ants**. Cambridge: The Belknap Press of Harward University Press, 1990.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. **Journey to the Ants**. Cambridge: The Belknap Press of Harvard University, 1994.

- HUBBEL, S. P.; WIEMER, D. F. Host plant selection by an attine ant. In: JAISSON, P. (Ed.). **Social Insects in the tropics**. Paris: University of Paris Press, 1983. v. 2, p. 54 -133.
- JARNE, P.; LAGODA, P. J. L. Microsatellites, from molecules to populations and back. **Trends Ecol. Evol.**, v. 11, p. 424–429, 1996.
- KUSNEZOV, N. Zoogeografia de las hormigas en Sudamerica. **Acta Zool. Lin.**, v. 18, p. 25-186, 1963.
- LI, Y. C.; KOROL, A. B.; FAHIMA, T.; BEILES, A.; NEVO, E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanism: a review. **Mol. Ecol.**, v. 11, p. 2453-2465, 2002.
- LIM, S.; NOTLEY-MCROBB, L.; LIM, M.; CARTER, D.A. A comparison of the nature and abundance of microsatellites in 14 fungal genomes. **Fungal Genetics and Biology**, v. 41, p. 1025–1036, 2004.
- MARICONI, F.A.M. **As Saúvas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1970. 167p.
- MARTIN, M.M.; WEBER, N.A. The cellulose utilizing capability of the fungus cultured by the Attini ant *Atta colombica tonsipes*. **Ann. Entomol. Soc.**, v.62, p. 1386-1387, 1969.
- MATIOLI, S.R. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Ed. Holos, 2001.
- MAYHÉ-NUNES, A. J. **Estudo de *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae) com ocorrência constatada no Brasil**: subsídios para uma análise fiogenética. 1991. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- MORITZ, C.; DOWLING, T.E.; BROWN, W.M. Evolution of animal mitochondrial DNA: Relevante for population biology and systematics. **Ann. Rev. Ecol. Syst.**, v. 18, p. 269-292, 1987.
- MUELLER, U.G.; REHNER, S.A.; SCHULTZ, T.D. The evolution of agriculture in ants. **Science**, v. 281, p. 2034 -2038, 1998.
- MUELLER, U.G.; WOLFENBARGER, L. AFLP genotyping and fingerprinting. **Trends in Ecol. and Evol.**, v. 14, p. 389 -394, 1999.
- MÜLLER, J.; MÜLLER, K. TreeGraph: automated drawing of complex tree figures using an extensible tree description format. **Mol. Ecol. Notes**, v. 4, p. 786-788, 2004.
- MÜLLER, K. PRAP - calculation of Bremer support for large data sets. **Mol. Phyl. Evol.**, v. 31, p. 780 -782, 2004.

NEI, M.; KUMAR, S. **Molecular Evolution and Phylogenetics**. Oxford: Oxford University Press, 2000.

NIJHOUT, H. F. Control mechanisms of polyphonic development in insects. **BioScience**, v. 49, p. 181 -192, 1999.

ORTIUS-LECHNER, D., GERTSCH, P.J. e BOOMSMA, J.J. Variable microsatellite loci for the leafcutter ant *Acromyrmex echinator* and their applicability to related species. **Mol. Ecol.**, v. 9, p. 114-116, 2000.

PAGE, R. D. M. **TreeView**: Tree drawing software for Apple Macintosh and Microsoft Windows, versão 1.5.2. Glasgow: Institute of Biomedical & Life Sciences, University of Glasgow, 1998.

PAIVA CASTRO, U.; ZAMITH, A. P. L.; MARICONI, F. A. M. Contribuição para o conhecimento da “saúva de vidro” *Atta laevigata* Fred. Smith, 1858. Anais da Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, p. 314-325, 1961.

PEREIRA, R.C. et al. Fatores ambientais e ocorrência Attini em reflorestamento de eucalipto. In: INTERNATIONAL PEST ANT SYMPOSIUM, 6.; ENCONTRO DE MIRMECOLOGIA, 13., 1997, Ilhéus. Anais... Ilhéus: UESC, 1997. p.76.

POWELL, R. J.; STRADLING, D. J. Factors influencing the growth of *Attamyces-bromatificus*, a symbiont of *Attini* ants. **Trans. British Mycol. Soc.**, v. 87, p. 205 - 213, 1986.

RANDO, J. S. S.; FORTI, L. C. Ocorrência de formigas *Acromyrmex* Mayr, 1865, em alguns municípios do Brasil. **Acta Sci. Biol. Sci.**, Maringá, v. 27, n. 2, p. 129-133, 2005.

ROSS, K.G.; SHOEMAKER, D.D.; KRIEGER, M.J.; DEHEER, C. J.; KELLER, L. Assessing genetic structure with multiple classes of molecular markers: a case study involving the introduced fire ant *Solenopsis invicta*. **Mol Biol Evol.**, v. 16, n. 4, 525 – 543, 1999.

RUSSO, C. A. M.; MIYAKI, C.Y.; PEREIRA, S.L. Reconstrução filogenética: Métodos Geométricos. In: MATIOLI, S. R. (Ed.) **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Ed. Holos, 2000. p. 108-136.

SANOS. **Formigas Cortadeiras**. 1999. Disponível em:
<http://www.cati.sp.gov.br/novacati/tecnologias/pragas_agricolas/formigas/formigas_cortadeiras.htm>. Acesso em: 10 nov 2006.

SANTSCHI, F. Myrmicines, dolichoderines et autres formicides neotropiques. **Bull. Soc. Valdoise Sci. Nat.**, v. 54, p. 345-387, 1922.

SIRVIO, A.; GADAU, J.; RUEPPELL, O.; LAMATSCH, D.; BOOMSMA, J.J.; PAMILO, P.; PAGE, R.E. Jr. High recombination frequency creates genotypic

diversity in colonies of the leaf-cutting ant *Acromyrmex echinator*. **J. Evol. Biol.**, v. 19, n. 5, p. 1475-1485, 2006.

SMITH, F. **Catalogue of hymenopterous insects in the collection of the British Museum**. 1858. pt 6, p. 180-187.

SOLÉ-CAVA, A. M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, S. R. (Ed.) **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Ed. Holos, 2000. p. 172-192.

SUMNER, S.; AANEN, D. K.; DELABIE, J.; BOOMSMA, J. J. The evolution of social parasitism in *Acromyrmex* leaf-cutting ants: a test of Emery's rule. **Insect. Soc.**, v. 51, p. 37– 42, 2004.

SWOFFORD, D. L.; OLSEN, G. J.; WADDELL, P. J.; HILLIS, D. M. Phylogenetic Inference. In Hillis, D.M.; Moritz, C.; Mable, B. K. (Ed.), **Mol. System.**, Sunderland: Sinauer, 1996. p.407-425.

SWOFFORD, D.L. **Phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0b4a**. Champaign: Illinois Natural History Survey, 2000.

THOMPSON, J.D.; HIGGINGS, D.G.; GIBBS, T.J. ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gaps penalties and weight matrix choice, **Nuc. Ac. Res.** 1994.

THORÉN, P.A.; PAXTON, R.J.; ESTOUP, A. Unusually high frequency of (CT)_n and (GT)_n microsatellite loci in a yellowjacket wasp, *Vespula rufa* (L.) (*Hymenoptera: Vespidae*). **Insect Mol. Biol.**, v. 4, n. 3, p. 141-148, 1995.

TÓTH, G.; GÁSPAÁRI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome Res.** v.10, p. 967-981, 2000.

TROPPEMAIR, H. **Estudo Zoogeográfico e Ecológico das formigas do gênero Atta (Hymenoptera) com ênfase sobre a Atta laevigata (F. Smith, 1858), no estado de São Paulo**. 1973. Tese (Livre-Docência) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Rio Claro.

VILLESEN, P.; GERTSCH, P.J.; FRYDENBERG, J.; MUELLER, U.G.; BOOMSMA, J.J. Evolutionary transitions from single to multiple mating in fungus-growing ants. **Mol. Ecol.**, v. 8, p.1819–1825, 1999.

VILLESEN 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.**, v. 269, p.1541–1548, 2002.

VINHA, G.G.; SILVA-PINHATI, A.C.O.; BACCI JR., M.; CARVALHO, A.O.R. Comparison of mitochondrial DNA sequences of ants in the species *Atta*

laevigata from different sites in South America. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 33., 2004, Caxambu.

VINHA, G.G.; BACCI JR. M.; PINHATI, A. C. O. S.; CARVALHO, A. O. R. Molecular Phylogeny of *Atta laevigata* (Hymenoptera: Formicidae). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 34., 2005, Águas de Lindóia.

VINHA, G. G.; BACCI JR. M.; ORTIZ, A. R.; MIKHEYEV, A.; SOLOMON, S.; MUELLER, U. Filogenia Molecular de *Acromyrmex (Moellerius) balzani* (Hymenoptera: Formicidae: Attini). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 21., 2006, Recife.

VINHA, G. G.; MARTINS JR., J.; BACCI JR., M. Mitochondrial gene sequencing in different specimens of *Atta laevigata*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 35., 2006, Águas de Lindóia.

WARD, P. S.; BRADY, S. G. Phylogeny and biogeography of the ant subfamily Myrmiciinae (Hymenoptera: Formicidae). **Invert. Syst.**, v. 17, p. 361-386, 2003.

WEBER, N.A. **Gardening Ants, the Attinis**. Philadelphia: American Philosophical Society, 1972.

WETTERER, J. K.; SCHULTZ, T. R.; MEIER, R. Phylogeny of Fungus-Growing Ants (Tribe Attini) Based on mtDNA Sequence and Morphology. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 9, p. 42-47, 1998.

WILD, A. Taxonomy and Distribution of the Argentine Ant, *Linepithema humile* (Hymenoptera: Formicidae). **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v. 97, n. 6, p. 1204-1215, 2004.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

WILSON, E. O. **The insects societies**. Cambridge: Harvard, University Press, 1971.

XIA, X.; XIE, Z. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. **J. Hered.**, v. 92, p. 371-373, 2001.

ZANETTI, R.; JAFFÉ, K.; VILELA, E.F.; ZANUNCIO, J.C.; LEITE, H.G. Efeito da densidade e do tamanho de saúvas sobre a produção de madeira em eucaliptais. **Anais da Soc. Ent. Brasil**, Jaboticabal, v.29, n.1, p. 105-112, 2000.

ZHANG, D.X.; HEWITT, G.M. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. **Mol. Ecol.**, v. 12, n. 3, p. 563-584, 2003.