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

CARACTERIZAÇÃO DE DUAS LINHAGENS SIMPÁTRICAS DE

Atta laevigata

CINTIA MARIA SANTOS BEZERRA

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

Março – 2013

CINTIA MARIA SANTOS BEZERRA

CARACTERIZAÇÃO DE DUAS LINHAGENS SIMPÁTRICAS DE
Atta laevigata

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

Orientador: Prof. Dr. Maurício Bacci Júnior

Coorientador: Prof. Dr. Luíz Carlos Forti

Rio Claro
2013

595.796 Bezerra, Cintia Maria Santos
B574c Caracterização de duas linhagens simpátricas de *Atta*
laevigata / Cintia Maria Santos Bezerra. - Rio Claro : [s.n.],
2013
79 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots., mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Maurício Bacci Júnior
Coorientador: Luiz Carlos Forti

1. Formiga. 2. Biologia molecular. 3. Formigas
cortadeiras. 4. Especiação. 5. DNA mitocondrial. 6. Genitália
masculina. 7. Variação morfológica. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

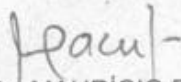
TÍTULO: ESPECIAÇÃO NA FORMIGA CORTADEIRA *Atta laevigata* F. SMITH 1858
(FORMICIDAE: ATTINI)

AUTORA: CINTIA MARIA SANTOS BEZERRA

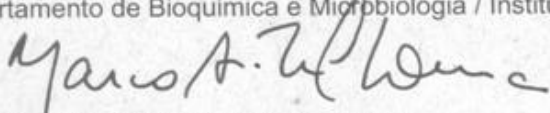
ORIENTADOR: Prof. Dr. MAURÍCIO BACCI JUNIOR

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIZ CARLOS FORTI

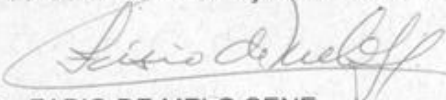
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. MAURÍCIO BACCI JUNIOR

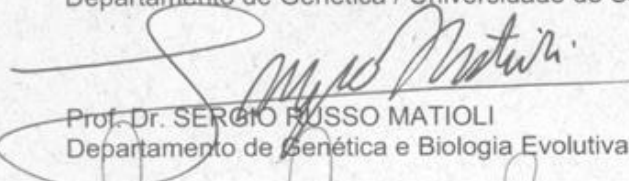
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / Instituto de Biociências / UNESP - Rio Claro


Prof. Dr. MARCO ANTONIO DEL LAMA

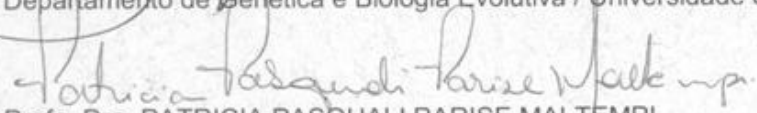
Depto. de Genética e Evolução / Universidade Federal de São Carlos


Prof. Dr. FABIO DE MELO SENE

Departamento de Genética / Universidade de São Paulo


Prof. Dr. SÉRGIO RUSSO MATIOLI

Departamento de Genética e Biologia Evolutiva / Universidade de São Paulo


Profa. Dra. PATRICIA PASQUALI PARISE MALTEMPI

Departamento de Biologia / Instituto de Biociências / UNESP - Rio Claro

Data da realização: 25 de março de 2013.

Dedicatória

*Dedico esta tese aos meus pais Sebastião e Ginalva,
você foram responsáveis pelo alicerce de minha história.*

Agradecimentos

Agradeço a Deus por tudo que me concedeste e por colocar em meu caminho pessoas amigas e preciosas.

Agradeço ao meu amor Gerônimo, que mesmo estando alguns quilômetros de distância, se manteve firme. Muito obrigada pela paciência, compreensão e companheirismo. Você é um presente de Deus. Amo você!

Aos meus pais, em especial a minha mãe, que sempre compartilhou de todos os momentos de minha vida, meu ponto de apoio. Aos meus irmãos Samuel e Denison, as minhas cunhadas Ryvia, Tatiane, Miriam e Rosineire pela força e pelo cuidado para comigo. Não poderia deixar de agradecer aos meus sobrinhos Isly, Inlan e Luiz pelos momentos agradáveis e descontraídos. Amo todos vocês!

Sou muito grata ao Dr. Maurício Bacci, pela orientação, paciência, pelos conselhos, idéias e pela confiança em mim depositada durante a execução deste trabalho. Sob a sua orientação tive a oportunidade de aprender bastante. MUITÍSSIMO obrigada!

Agradeço ao meu coorientador Dr. Luiz Carlos Forti, pelo apoio no trabalho de campo.

Aos meus colegas e amigos do CEIS, Carol, Joaquim, Franco, Paula, Carlos, Mariana, Alexandre Takara, Suzana, Daiane, Necis, Amanda, Ita e Sandra. Muito obrigada pelos momentos alegres.

Sou muito grata a Cynara, Joana, Letícia, Alexandre Somera e Tássio vocês me ajudaram bastante. Em especial a duas pessoas que Deus colocou em minha vida para me ajudar, Sérgio Kakazu e Milene não tenho palavras para expressar a minha gratidão. A todos vocês muito obrigada!

As minhas novas amigas Sueli Sanches, Fabiana Alonso e Cíntia Henrique muito obrigada pela força, ajuda e carinho durante a minha estada em Rio Claro, vocês foram sensacionais. E também aos velhos amigos que mesmo distante sempre torceram por mim Taciana, Marta, Tânia Regina, Ednailza, Estela Ferraz, Daracy, Nicolino e Marcos Luciano. Amo todos vocês!

Por fim, agradeço a Unesp, pela infraestrutura e a Fapesp, pelo apoio financeiro.

Resumo

Resumo

As formigas da tribo Attini apresentam um mutualismo com fungos basidiomicetos. Entre as attíneas, uma das mais derivadas é a formiga cortadeira *Atta laevigata*, que se apresenta com ampla distribuição na América do Sul e dividida em duas linhagens mitocondriais. Esta cortadeira já foi classificada em até três subespécies ou mesmo em duas espécies distintas, mas atualmente é considerada uma única espécie com grande variação morfológica. No presente trabalho, foram analisados indivíduos de 84 ninhos de *A. laevigata* em duas áreas na região Sudeste do Brasil. Nessas áreas foram encontrados indivíduos em ambas as linhagens mitocondriais, denominadas de linhagem I e II. Os machos da linhagem I se apresentaram distintos dos machos da linhagem II, com relação ao peso, dimensões do abdômen e estruturas da genitália. A congruência entre os marcadores morfológicos e mitocondriais sugere que as duas linhagens simpátricas de *A. laevigata* estão reprodutivamente isoladas, caracterizando um processo de especiação em andamento. Ninhos de ambas as linhagens de *A. laevigata* contiveram o mesmo fungo mutualista, *Leucoagaricus gongylophorus*, em três grupos gênicos distintos. Portanto, o processo de especiação em *A. laevigata* não foi causado por uma especialização no cultivo de um determinado grupo de fungo. Indivíduos simpátricos de linhagens distintas puderam realizar o voo nupcial simultaneamente. No entanto, análises de quatro loci mitocondriais e seis loci microssatélites mostraram que cada fêmea em uma das linhagens é fecundada exclusivamente (ou ao menos predominantemente) por machos da mesma linhagem. Portanto, há uma barreira pré-zigótica levando ao isolamento reprodutivo entre indivíduos simpátricos de linhagens distintas. Esta barreira foi provavelmente causada pelas diferenças corpóreas dos machos, incluindo a genitália, que dificulta, ou mesmo impede, a cópula entre indivíduos de linhagens distintas.

Palavras-chaves: barreira pré-zigótica, formiga cortadeira, linhagem mitocondrial, variação morfológica.

Abstract

Ants of Attini tribe have a mutualism with basidiomycete fungi. Among Attini ants, one of the most derived species is the leafcutter ant *Atta laevigata*, which has a wide distribution in South America and split into two mitochondrial lineages. This leafcutter has been classified into three subspecies or even up into two distinct species, but nowadays is considered a single species with great morphological variation. In this study, we analyzed 84 individuals from nests of *A. laevigata* located in two areas of southeastern region of Brazil. Individuals from both mitochondrial lineages, called lineage I and II, were found in those areas. Males of lineage I were different from males of lineage II, concerning weight, dimensions of the abdomen, and genitalia structures. The congruence between morphological and mitochondrial markers suggests that the two sympatric lineages of *A. laevigata* are reproductively isolated, characterizing a speciation process in progress. Nests of both *A. laevigata* lineages contained the same mutualistic fungus, *Leucoagaricus gongylophorus*, in three distinct genetic groups. Therefore, *A. laevigata* speciation process was not caused by a specialization in the cultivation of a particular group of fungi. Sympatric individuals of distinct lineages could perform the nuptial flight simultaneously. However, analysis of four mitochondrial and six microsatellite locus showed that each female from a lineage is fertilized exclusively (or at least predominantly) by one to six males from the same lineage. Thus, there is a pre zygotic barrier leading to reproductive isolation between sympatric individuals of distinct lineages. This barrier was probably caused by physical differences of males (including the genitalia) that makes it difficult, or even prevents the mating between individuals of different lineages.

Keywords: pre zygotic barrier, mitochondrial lineage, morphological variation

SUMÁRIO

	Página
INTRODUÇÃO GERAL.....	10
OBJETIVOS	20
REFERÊNCIAS	22
CAPÍTULO I.....	25
Characterization of two sympatric and morphologically distinct lineages of <i>Atta laevigata</i> F. SMITH 1858 (Formicidae: Myrmicinae: Attini)	
Resumo	27
Abstract	28
Introduction	29
Results	30
Discussion	31
Conclusion	33
Materials and methods	33
List of abbreviation used	36
Authors' contributions	36
Acknowledgements	36
Figure legends	36
References	38
Tables	40
Figures	43
Appendix.....	48
CAPÍTULO II	49
Fatores envolvidos com a especiação em <i>Atta laevigata</i> F. Smith 1858 (Formicidae: Myrmicinae: Attini)	
Resumo	51
Abstract	52
Introdução	53
Material e métodos	55
Resultados	59
Discussão	72
Conclusão	75
Referências	76
CONCLUSÃO FINAL	78

Introdução

Introdução geral

As formigas cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae) são as mais apomórficas dentro da tribo Attini de formigas cultivadoras de um fungo mutualista. São classificadas em dois gêneros: *Atta*, conhecidas popularmente como saúvas, e *Acromyrmex*, conhecidas como quenquéns. São consideradas herbívoros generalistas, atacando uma grande variedade de plantas (CHERRETT, 1989). Consumindo mais vegetação que qualquer outro herbívoro de diversidade semelhante (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

As formigas cortadeiras recebem esse nome porque cortam as plantas e transportam os fragmentos para o interior do ninho. Sobre estes fragmentos cultivam um fungo simbiote, *Leucoagaricus gongylophorus*, que lhes serve de fonte de alimento e enzimas (MÜLLER et al., 2001; SILVA et al., 2003; SILVA-PINHATI et al., 2004). Esse mutualismo proporciona benefícios a ambos os organismos: o fungo fornece nutriente e enzimas que facilitam degradação do material vegetal, a formiga coleta e prepara o substrato para o crescimento do fungo (SIQUEIRA, 1998; SILVA et al., 2003) e oferece um ambiente livre de competidores através da aplicação de compostos antibióticos por elas produzidos (CURRIE et al., 1999). Este fungo apresenta-se como duas linhagens simpátricas e distribuídas indistintamente entre espécies de *Atta* e de *Acromyrmex* (SILVA-PINHATI et al., 2004).

As cortadeiras são endêmicas da região neotropical (WEBER, 1972; HÖLLDOBLER; WILSON 1990). As saúvas ocorrem em todos os países americanos, exceto no Chile, em algumas ilhas das Antilhas e no Canadá (MARICONI, 1970; WEBER, 1972) e também até altitude de 2500 m acima do nível do mar (HOLLDOBLER; WILSON 1990). Dentre as saúvas, destacamos *Atta laevigata* F. Smith, 1858, conhecida popularmente como “saúva cabeça de vidro” caracterizada por apresentar soldados com cabeça e gáster brilhantes e sem pelos (ANJOS et al., 1998).

A. laevigata tem na Venezuela o extremo Norte de sua distribuição e ocupa praticamente todas as regiões do Brasil, exceto a Região Sul (Figura 1) (DELABIE et al., 2011). Essas formigas nidificam na beira de estradas, em terrenos arenosos, em vegetação rasteira ou capoeiras e na periferia de áreas de mata (DELABIE et al., 1997) e são consideradas pragas agrícolas. Um único ninho adulto de saúva pode chegar a até 20 anos de idade e (WEBER, 1996) conter aproximadamente oito milhões de operárias, todas geradas a partir de uma única rainha (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

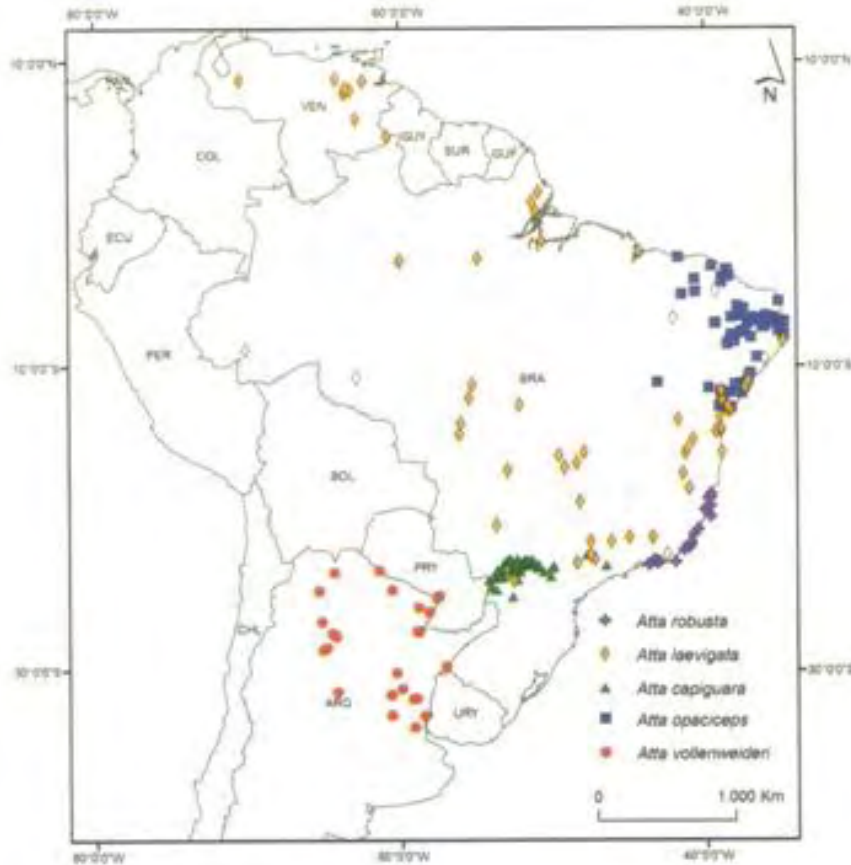
Ninhos adultos investem muita energia na produção de machos e fêmeas (KELLER, 1995), que, em um determinado período do ano, se acasalam e dispersam, num fenômeno

denominado de reviada (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). A revoada acontece em períodos diferentes em cada região brasileira (MARICONI, 1970; DELLA LUCIA; BENTO, 1993; DELABIE et al., 2002). No estado de São Paulo a revoada ocorre entre os meses de setembro a dezembro em dias de calor após chuvas fortes (AUTUORI, 1941).

Nesta fase as formas reprodutivas (as fêmeas içás e os machos bitus) saem do formigueiro para realizarem seu voo nupcial. Mas, antes de abandonarem o formigueiro, as içás carregam um *pellet* de fungo mutualista em sua cavidade infrabucal (KERR, 1961) para cultivo de seu próprio jardim.

O acasalamento acontece no ar e, durante o voo nupcial, os machos liberam um feromônio responsável pela atração sexual das fêmeas da mesma espécie (MARICONI, 1970). Há evidências genéticas e morfológicas indicando de que os machos são capazes de copular com várias fêmeas (BAER; BOOMSMA, 2004; FJERDINGSTAD, BOOMSMA, 1997) e que as fêmeas podem acasalar com até oito machos (KERR, 1961; FJERDINGSTAD; BOOMSMA, 1997; BAER et al., 2006). Depois do acasalamento, o macho morre e a rainha começa a escavação de um novo formigueiro.

Figura 1: distribuição de *A. laevigata*



A. laevigata como modelo de especiação

Selecionamos *A. laevigata* como objeto de estudo porque Vinha et al. (2007), através de marcadores mitocondriais, evidenciou duas linhagens simpátricas de *A. laevigata*, nas regiões Norte e Sudeste do Brasil (Figura 2). Outras análises filogenéticas que incluíram várias espécies do gênero *Atta*, também com base em marcadores mitocondriais, também evidenciaram evidenciaram dois clados irmãos em *A. laevigata* (Figura 3 a, b) (SOLOMON et al., 2008; BACCI et al., 2009). Portanto, o contexto histórico dos estudos envolvendo *A. laevigata*, leva-nos a pensar que pode haver um processo de especiação em andamento, fazendo dessa cortadeira um potencial modelo de estudo em processos de especiação.

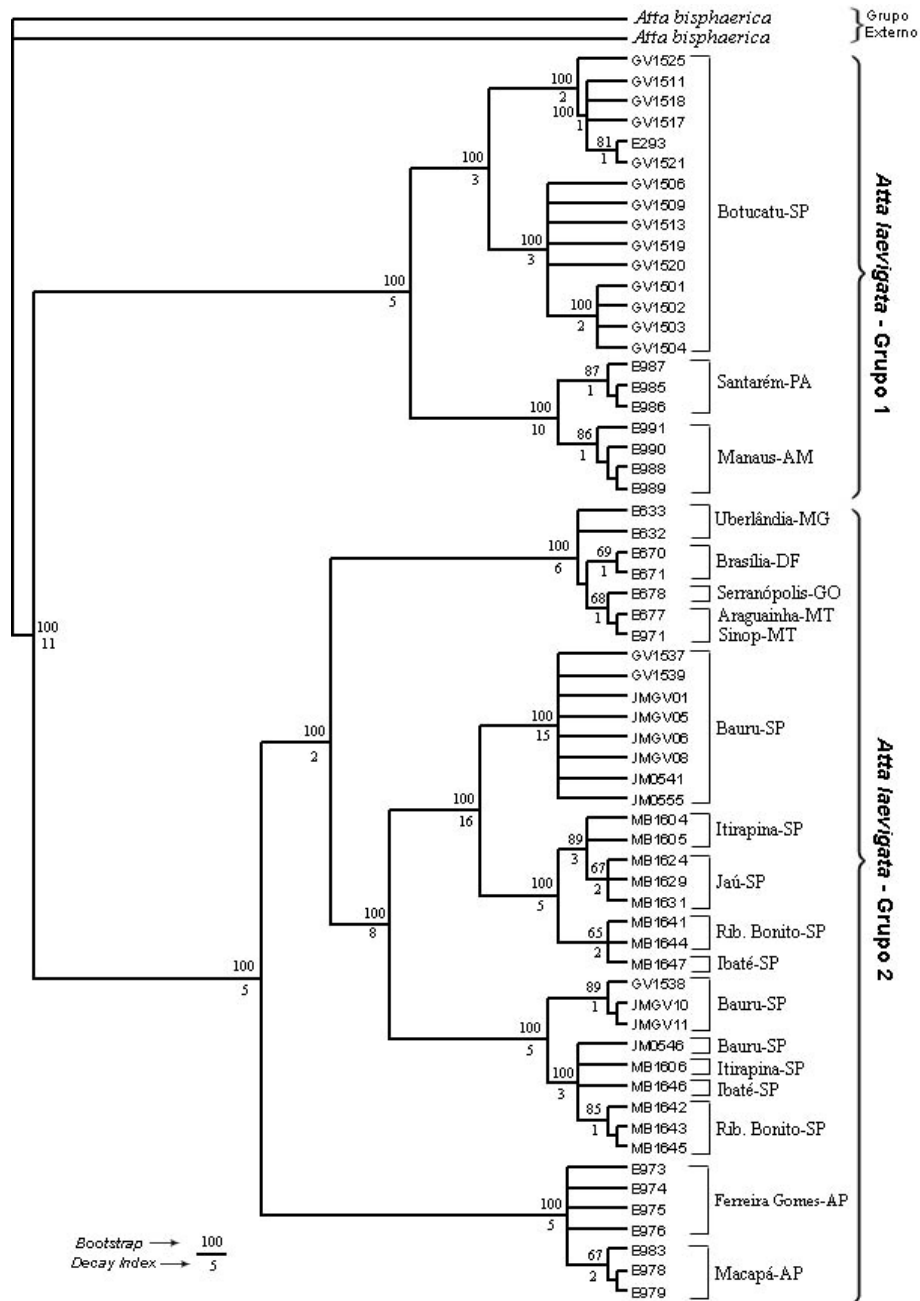
A especiação (formação de novas espécies) tem sido considerada o evento chave da evolução. Entender seus mecanismos é uma questão intrigante para os cientistas, pois é um processo bastante complexo e várias forças evolutivas estão envolvidas.

Durante o processo de especiação, as linhagens chegam a divergir e acabam se modificando ao longo do tempo, de tal forma que o intercruzamento não pode mais ocorrer (COYNE; ORR, 1998). Deste modo, a especiação completa-se com o surgimento do isolamento reprodutivo. Isso pode ser evidenciado através da observação de diferenças no comportamento reprodutivo, da incompatibilidade no tamanho e na estrutura dos órgãos reprodutores, da inexistência de descendentes ou da formação de híbridos estéreis se eles existirem. Ocorrendo alguma dessas possibilidades, o isolamento reprodutivo está completo confirmando, desse modo, o sucesso do processo de especiação (BROWN; LOMOLINO, 2006).

Além da evidência das duas linhagens, *A. laevigata* já foi classificada em até três subespécies (GONÇALVES, 1942; BORGMEIER, 1950) ou mesmo em duas espécies distintas *Atta silvai* e *A. laevigata*. Gonçalves, 1982 descreveu *A. silvai* com base na morfologia das operárias e formas sexuada, mas atualmente é considerada uma única espécie com grande variação morfológica (DELABIE, 1998).

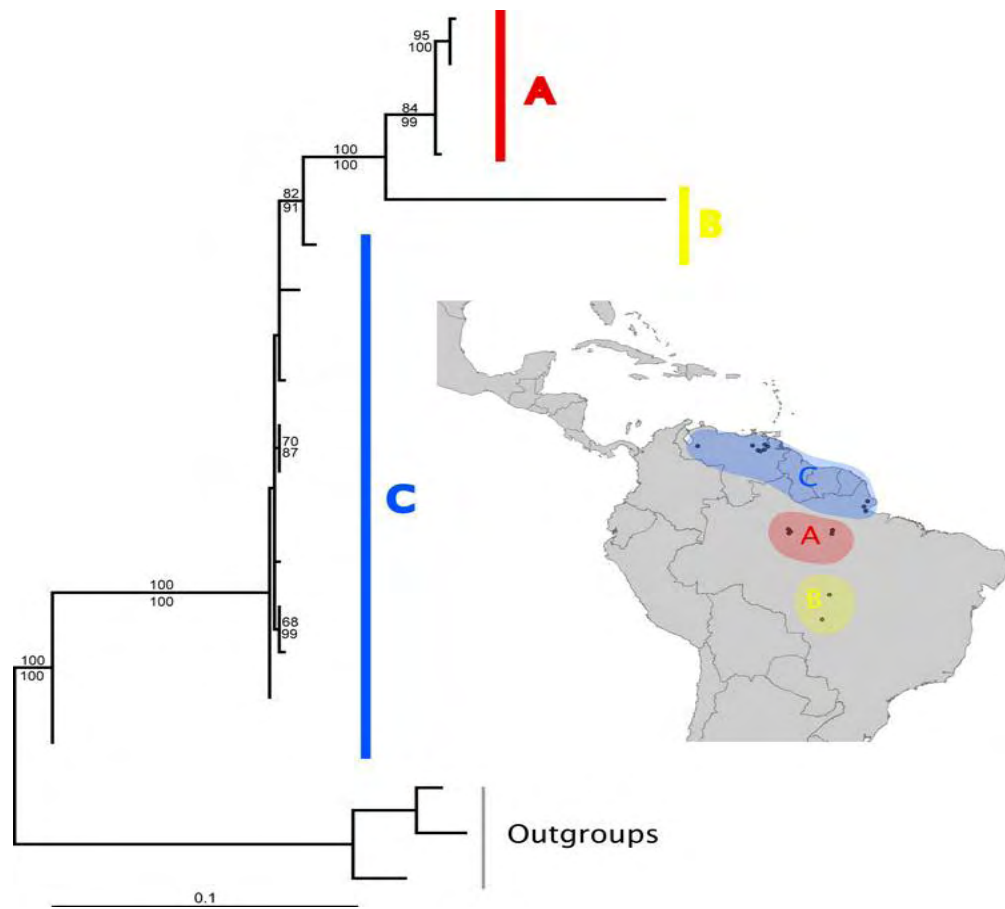
A variabilidade fenotípica encontrada em *A. laevigata* dificulta a aplicação de um único método tradicional para estudos taxonômicos, pois as chaves dicotômicas que existem são aplicáveis apenas às operárias maiores. Alguns autores já chamavam atenção para importância da genitália masculina no estudo da sistemática do gênero *Atta* (MAYR, 1868; GONÇALVES, 1942; BORGMEIER, 1950). Para uma análise mais acurada da morfologia, é necessário estudar as operárias com as formas sexuadas correspondentes (GONÇALVES, 1942).

Figura 2 - Evidência de dois grupos gênicos distintos de *A. laevigata*



Vinha et al., 2007

Figura 3a - Árvore filogenética de *A. laevigata* evidenciando três clados irmãos.



Solomon et al., 2008

Figura 3b - Análise filogenética do gênero *Atta* evidenciando dois clados irmãos de *A.*



Bacci et al., 2009

Marcadores moleculares utilizados no presente estudo

Atualmente, existe uma grande quantidade de marcadores moleculares descritos e que têm sido empregados com o intuito de compreender melhor as variações genéticas dos indivíduos e populações. Os marcadores moleculares como o DNA mitocondrial e os nucleares (*Rhodopsina*, *Wingless*, *Fator de alongação1*, microssatélites e *DMC1*) foram empregados para distinguir as linhagens e investigar os fatores envolvidos na diferenciação das populações de *A. laevigata*.

O DNA mitocondrial é um marcador muito utilizado em estudos evolutivos e sistemáticos em formigas (MARUYAMA et al., 2008; WYSOCKA et al., 2011;

GOROPASHNAYA et al., 2012). Este marcador apresenta características interessantes para tais estudos, pois são herdados predominantemente da linhagem materna, apresentam alta taxa mutacional e abundância, uma vez que se encontram em grande número de cópias por célula (AVISE et al., 1987; MORITZ et al., 1987). O DNA mitocondrial foi também utilizado no presente estudo, pois já evidenciou os dois clados de *A. laevigata*.

Os microssatélites são de herança Mendeliana codominante, rápida evolução e com altas taxas de mutação, além de serem altamente polimórficos (ZHANG; HEWITT, 2003). Foram usados no presente estudo com a finalidade de verificar a existência de alelos exclusivos e para registrar também a contribuição da linhagem paterna.

Selecionamos também os marcadores nucleares *DMC1*, *Fator de alongação1*, *Rhodopsina*, *Wingless*, porque são genes de cópia única no genoma (PETERSEN; SEBERG, 2002; HELGASON et al., 2003; DANFORTH et al., 2004), o que evita problemas advindos da duplicação gênica e possibilita detectar polimorfismo e caracterizar o isolamento reprodutivo em *A. laevigata*.

Áreas de estudo

Selecionamos as regiões de Bauru e Botucatu, porque elas contêm grande quantidade de ninhos de *A. laevigata* e são relativamente próximas à UNESP de Rio Claro, o que facilita a coleta e observação das formigas.

Apresentação dos capítulos

No presente estudo, encontramos resultados interessantes que deram origem a dois trabalhos. O primeiro artigo mostra que há indivíduos simpátricos em duas linhagens mitocondriais distintas em ambas as regiões geográficas estudadas. Mostra também que há diferenças morfológicas relacionadas ao aparelho reprodutor entre os machos de cada uma das linhagens. A congruência entre marcadores morfológicos e mitocondriais confirmou a existência um processo de especiação ocorrendo em *A. laevigata*.

No segundo trabalho decorrente do presente estudo, foram investigados os possíveis eventos envolvidos com a diferenciação das populações em *A. laevigata*. Um desses fatores foi o voo nupcial, que poderia ocorrer em períodos diferentes para cada uma das linhagens, acompanhando o isolamento reprodutivo.

O segundo evento investigado foi a coespeciação entre as formigas e seu fungo mutualista. As razões desse estudo foram duas: a proposta de que o cultivo de fungos mutualistas distintos poderia ser a razão para o surgimento de duas espécies de Attini no gênero *Cyphomyrmex* (SCHUTLZ et al., 2002); a existência de dois grupos gênicos do fungo *Leucoagaricus gongylophorus*, simbiote das formigas cortadeiras (SILVA-PINHATI et al., 2004). O terceiro evento investigado foi a fecundação, verificando se machos de uma determinada linhagem estariam impedidos de fecundar fêmeas de outra linhagem de *A. laevigata*. Ou seja, verificar se há um isolamento reprodutivo pré-zigótico entre as linhagens.

Objetivos

1.1 Objetivo Geral

O objetivo central desse estudo é caracterizar o grau de diferenciação na formiga *A. laevigata*.

1.1.1 Objetivos específicos

- Caracterizar geneticamente as formigas através de marcadores mitocondriais e nucleares.
- Analisar a genitália dos machos e verificar se existem diferenças morfológicas.
- Observar se há quebra no sincronismo temporal do voo nupcial.
- Caracterizar geneticamente o fungo mutualista *Leucoagaricus gongylophorus* através de marcadores nucleares e verificar se a co-especiação poderia estar relacionada com o processo de especiação.
- Analisar o conteúdo da espermateca das fêmeas fecundadas para obter mais informações sobre o comportamento reprodutivo de *A. laevigata*.

REFERÊNCIAS

- AUTUORI, M. Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp. Hymenoptera: Formicidae). Evolução do saúveiro (*Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908). **Arquivos do Instituto Biológico**, n.12, p. 197-228, 1941.
- AVISE, J. C.; ARNOLD, J.; BALL, R. M.; FERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J. E.; REEB, C. A.; SAUNDERS, N. C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, v. 18, p. 489–522, 1987.
- BACCI, M.; SOLOMON, S. E.; MUELLER, U. G.; MARTINS, V. G.; CARVALHO, A. O. R.; VIEIRA, L. G. E.; SILVA-PINHATI, A. C. O. Phylogeny of leafcutter ants in the genus *Atta* Fabricius (Formicidae: Attini) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 51, p. 427-37, 2009.
- BAER, B. Male reproductive investment and queen mating-frequency in fungus-growing ants. **Behavioral Ecology**, v. 15, n. 3, p. 426-432, 2004.
- BAER, B.; BOOMSMA, J. J. male reproductive investment and queen mating-frequency in fungus-growing ants. **Behavioral Ecology**, v. 15, n.3, p. 426-432, 2004.
- BORGMEIER, T. Estudos sobre *Atta* (Hym. Formicidae). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 48, p. 239-292, 1950.
- BROWN, J. H.; LOMOLINO, M. V. **Biogeografia**. 2ª ed. Ribeirão Preto, SP: Ed. FUNPEC, p. 224-255, 2006.
- CHERRETT, J.M. Leaf-cutting ants. In: LIETH, H.; WERGER, M. J.A. **Tropical rain forest ecosystems: biogeographical and ecological studies**. Amsterdam: Elsevier, 1989, p. 473-488.
- COYNE, J. A.; ORR, H. A. The evolutionary genetics of speciation *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, v. 353, p. 287-305, 1998.
- CURRIE C. R., MULLER U. G., MALLOCH D. The agricultural pathology of ant fungus gardens. **PNAS**. v. 96, p. 7998-8002, 1999.
- DANFORTH, B. N.; BRADY, S. G.; SIPES, S. D.; PEARSON, A. Single-Copy Nuclear Genes Recover Cretaceous-Age Divergences in Bees. **Syst. Biol.**, v. 53, n.2, p. 309–326, 2004.
- DELABIE, J. H. C.; NASCIMENTO, I. C.; FONSECA, E.; SRRILLO, 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**, Ilhéus, v. 9, n.2, p. 49-58, 1997.
- DELABIE, J. C. H: *Atta silvai* Gonçalves, sinônimo júnior de *Atta laevigata* (Fred Smith) (Hymenoptera, Formicidae, Attini). **Revista Brasileira de Entomologia**, v.2, n.4, p. 339-341, 1998.

DELABIE, J. H. C.; NASCIMENTO, I. C. do; MARIANO, C. S. F. Estratégias de reprodução e dispersão em formigas Attines, com exemplos do Sul da Bahia. In: Congresso Brasileiro de Entomologia, XIX., 2002, Manaus. **Resumos** Congresso de Entomologia, Manaus: Sociedade Entomológica do Brasil, 2002.

DELABIE, J. C. H.; ALVES, H. S. R.; REUSS-STENZEL, G. M.; CARMO, A. F. R.; NASCIMENTO, I. C. Distribuição das formigas-cortadeiras dos gêneros *Acromyrmex* e *Atta* no novo mundo. In: DELLA LUCIA, T. M.; **Formigas-Cortadeiras da Bioecologia ao Manejo**. Viçosa: Ed. UFV, 2011. p. 80-101.

FJERDINGSTAD E.J.; BOOMSMA J.J. Variation in size and sperm content of sexuals in the leafcutter ant *Atta colombica*. **Insectes Soc.**, 44:209–218, 1997.

GONÇALVES, C. R. Contribuição para o conhecimento do gênero *Atta* Fab., das formigas saúvas. **Sociedade Brasileira de Agronomia**, v.5, p. 333-358. 1942.

GOROPASHNAYA AV, FEDOROV VB, SEIFERT B, PAMILO P: Phylogenetic relationships of Palaearctic *Formica* species (Hymenoptera, Formicidae) based on mitochondrial cytochrome B sequences. **PloS one**, v.7, n.7, p. e41697, 2012.

HELGASON, T.; WATSON, I. J.; YOUNG, J. P. W. Phylogeny of the *Glomerales* and *Diversisporales* (Fungi: Glomeromycota) from actin and elongation factor 1-alpha sequences. **Federation of European Microbiological Societies – Microbiology Letters**, Birmingham v. 229, n. 1, p. 127-132, 2003.

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

KELLER, L. Social Life: the paradox of multiple-queen colonies. **Trends Ecol. Evol.**, v. 10, p. 355-360, p. 1995.

KERR, W. E. Acasalamento de rainhas com vários machos em duas espécie da tribo Attini (Hymenoptera, Formicidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v.21, n.1, p.45-48, 1961.

MARICONI, F.A.M. As saúvas. Ed. Agrônômica **Ceres**. 167p. São Paulo, 1970.

MARUYAMA M, STEINER FM, STAUFFER C, AKINO T, CROZIER RH, SCHLICK-STEINER BC: A DNA and morphology based phylogenetic framework of the ant genus *Lasius* with hypotheses for the evolution of social parasitism and fungiculture. **BMC evolutionary biology**, v. 8, n. 237, p. 1-15, 2008.

MORITZ, C.; DOWLING, T. E.; BROWN, W. M. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, Palo Alto, v. 18, p. 269–292, 1987.

MUELLER U.G.; SCHULTZ T.R.; CURRIE C.R.; ADAMS R.M.; MALLOCH, D. The origin of the attine ant-fungus mutualism. **Quarterly Review of Biology**. New York, v.76, n.2, p. 169-197, 2001.

PARKER, P. G.; SNOW, A. A.; SCHUG, M. D.; BOOTON, G. C.; FUERST, P. A. What Molecules Can Tell Us about Populations: Choosing and Using a Molecular Marker. **Ecology**, v. 79, n. 2, p. 361-382, 1998.

PETERSEN G.; SEBERG O. Molecular Evolution And Phylogenetic Application of DMC1. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 22, n. 1, p. 43-50, 2002.

SCHULTZ, T. R.; SOLOMON, S. A.; MUELLER, U. G. VILLESEN, P.; BOOMSMA, J. J.; ADAMS, R.M.M.; NORDEN, B. Cryptic speciation in the fungus-growing ants *Cyphomyrmex longiscapus* Weber and *Cyphomyrmex muelleri* Schultz and Solomon, new species (Formicidae, Attini). **Insectes Sociaux**, v. 49, n. 4, p. 331-343, 2002.

SILVA, A.; BACCI M.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A. Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. **Journal of Insect Physiology**, v. 49, p. 307-313, 2003.

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

SIQUEIRA, C. G.; BACCI, JR. M.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A. Metabolism of plant polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. **Applied Environmental Microbiology**, v. 64, n. 12, p. 4820-4822, 1998.

SOLOMON, S. E.; BACCI, MAURICIO; MARTINS, J.; VINHA, G. G.; MUELLER, ULRICH G. Paleodistributions and comparative molecular phylogeography of leafcutter ants (*Atta* spp.) provide new insight into the origins of Amazonian diversity. **PloS one**, v. 3, n. 7, p. 2738, 2008.

VINHA, G. G. **SISTEMÁTICA MOLECULAR de *Atta laevigata* (Smith 1858) e *Acromyrmex balzani* (Emery 1890)**. Rio Claro, 2007. 133f. Dissertação (Mestrado em Biologia celular e Molecular) – Universidade Estadual Júlio Mesquita, Rio Claro, 2007.

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

WEBER, N. A. Fungus-Growing Ants. **Science**, v. 153, p. 587-604, 1996.

WYSOCKA A, KRZYSZTOFIK L, KRZYSZTOFIK A, ZOŁNIERKIEWICZ O, OJDOWSKA E, SELL J: Low genetic diversity in Polish populations of sibling ant species: *Lasius niger* (L.) and *Lasius platythorax* Seifert (Hymenoptera, Formicidae). **Insectes sociaux**, v. 58, p.191–195, 2011.

ZHANG. DE-X.; G. M. HEWITT. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. **Molecular Ecology**, v.12, p. 563-584, 2003.

Capítulo I

Artigo submetido para publicação no Journal Frontiers in Zoology

**Characterization of two sympatric and morphologically distinct lineages of *Atta laevigata*
F. SMITH 1858 (Formicidae: Myrmicinae: Attini)**

Bezerra, C. M. S¹

Email: cintiams_bezerra@yahoo.com.br

Somera, A. F¹

Email: afsomera@rc.unesp.br

Verza, S. S¹

Email: sandraverza@yahoo.com

Bacci, M^{1*}

Email: mbacci@rc.unesp.br

¹Instituto de Biociências, UNESP - Univ Estadual Paulista, *Campus* Rio Claro, Centro de Estudos de Insetos Sociais.

*Corresponding author

Maurício Bacci Júnior

Centro de Estudos de Insetos Sociais,

Universidade Estadual Paulista, Av. 24A, n. 1515 – Bela Vista,

Zip Code: 13506-900 – Rio Claro, SP – Brazil. Tel.: +55 19 3526 4165;

Fax: +55 19 3534 8523; e-mail: mbacci@rc.unesp.br

Resumo

A formiga cortadeira *Atta laevigata* já foi classificada em duas espécies distintas, denominadas *A. laevigata* e *A. silvai*, mas atualmente é considerada uma única espécie com grande variação morfológica. A morfologia da genitália dos machos tem sido utilizada com sucesso na sistemática das cortadeiras. As análises do DNA mitocondrial e nuclear têm sido também utilizadas para estudos evolutivos e sistemáticos em formigas. O presente trabalho apresenta resultados de mapeamento de 89 ninhos, genotipagem de operárias maiores e análise da morfologia de machos *A. laevigata* em duas áreas geográficas do sudeste e de amostras da localidade de Maraú (BA), local tipo de *A. silvai*. Uma operária foi genotipada em cada um dos ninhos analisados, dividindo-os em duas linhagens mitocondriais, que se mostraram simpátricas nas regiões do Sudeste. Todos os ninhos de Maraú foram agrupados na linhagem I. Todavia, não foi possível separar os indivíduos em linhagens distintas, com base nos marcadores nucleares. Em 15 ninhos do Sudeste foi possível acompanhar a produção anual de alados de 2009 a 2011. Os machos da linhagem I foram mais pesados e maiores do que os machos da linhagem II. As dimensões de abdômen, estipe, cardo e volsela, além do peso corpóreo, distinguiram significativamente as linhagens uma da outra. Machos atípicos com genitália variante foram encontrados com mais frequência na linhagem II do que na linhagem I. A genitália variante não foi uma característica diferencial, embora foi encontrada em indivíduos de ambas as linhagens. Já nos indivíduos com genitália normais foi possível detectar caracteres diferenciais entre as linhagens, associados ao peso corpóreo e dimensões do abdômen e da genitália. Esses caracteres diferenciais foram congruentes com os dados genéticos. A congruência entre marcadores moleculares e morfológicos separando linhagens simpátricas sugere um processo de especiação ocorrendo em *A. laevigata*.

Palavras-chaves: Formiga cortadeira, DNA mitocondrial, variação morfológica, genitália masculina.

Abstract

The *Atta laevigata* ant has already been classified into two distinct species, *A. laevigata* and *A. silvai*. However, recent studies have suggested that *A. laevigata* is a single species with appreciable variations. The morphology of the male genitalia has been successfully used for systematic identification and species delimitation of *A. laevigata*. Furthermore, analysis of mitochondrial and nuclear DNA sequence has also been widely used for evolutionary studies in ants. Here, we combined genetic and morphological studies to characterize *A. laevigata* in two geographic areas in Southwest Brazil and in Maraú (BA), which is the type locality of *A. silvai*. Specifically, *A. laevigata* nests were mapped, worker ants were genotyped by mitochondrial DNA, and the morphology of male genitalia was examined. Based on mitochondrial DNA genotyping of 89 workers collected from different nests, *A. laevigata* comprised two lineages (I and II). The lineages were sympatric, as members from each lineage were detected in both studied area in Southwest Brazil. Individuals from the type locality of *Atta silvai* were grouped in the mitochondrial lineage I. However, the nuclear markers could not distinguish the lineages of *A. laevigata*. In 15 nests from Southwest Brazil, it was possible to follow the annual production of winged ants from 2009 to 2011. The males from lineage I were heavier and larger than the males from lineage II. Measurements of the abdomen, stipites, thistle, volsella, and body weight, provided sufficient discrimination between the two lineages. Variant males with atypical genitalia were found more often in lineage II than in lineage I. Rates of variant males with atypical genitalia were not a distinguishing feature between lineage I and lineage II ants, as both lineages harbored individuals with atypical genitalia. However, the two lineages were differentiated based on body weight, dimensions of the abdomen, and structure of male genitalia. Moreover, these characteristics were consistent with genetic data. Congruence between molecular and morphological markers for distinct lineages suggests that an ongoing process of speciation in *A. laevigata*.

Keywords: leaf-cutter ant, mitochondrial DNA, morphological variation, male genitalia.

Introduction

With a little more than 230 valid species, the Attini tribe includes fungus-growing ants [1, 2], which are endemic to the Americas [3,4]. The genera *Atta* and *Acromyrmex* are most derived in the Attini tribe. Identification criteria for the species *Atta laevigata* have traditionally been vague. The species was classified into either three subspecies [5, 6].

Gonçalves in 1982 [7] described a new species of ant similar to *A. laevigata* called *Atta silvai* that was found in the south of Marau, Bahia, Brazil. The description was based on worker ants and sexual forms. The characteristics that justified the new species were based on worker ants who had head and gaster with few hairs, being the head narrower than that of *A. laevigata* and females with more shiny gaster. The analysis also showed that the male genitalia extremity had a thinner V slit than that found in *A. laevigata*.

Delabie in 1998 [8] compared samples of *A. silvai* with *A. laevigata* present in several locations, including Marau, and contested the existence of *A. silvai*. According to this author, *A. laevigata* shows a marked within species morphological variation in relation to other species of Attini tribe. This variation creates intermediate phenotypes in *A. laevigata* soldiers and large workers and between individuals from different geographical regions. So, these variations would have been mistaken as species diagnostics for *A. silvai*. The brightness of the gaster of female found in *A. silvai* was also observed in other *A. laevigata* individuals in different geographic regions. The author also examined the male genitalia and noted no morphological differences. The difference in sagittae would therefore be the product of technical artifacts of desiccation. Finally, the author concluded that *A. silvai* is synonymous with *A. laevigata*.

A viable method towards systematic identification and classification of *Atta* and other insects is the examination of the reproductive system of males [5, 6, 9-11], which is morphologically diverse throughout evolution [12]. In addition to morphological data, mitochondrial markers are important markers in the genetic characterization of ants [13-15]. Thus, the present study aimed to map *A. laevigata* nests in two geographic area in Brazil, genotype individuals from each nest using mitochondrial and nuclear markers, and compare morphological variations of the male genitalia by traditional morphometrics.

Results

Sampling and mapping of nests workers ants from 89 *A. laevigata* nests mapped in the Botucatu, Bauru and Marau, were collected from September 2009 to March 2011 (Figure 1). 33 males from Botucatu and 22 males from Bauru were collected from 15 nests (Table 1). These individuals were deposited into the Entomological Collection of the Laboratory of Molecular Evolution at the State University Júlio de Mesquita Filho.

Molecular analyses

A soldier from each nest was genotyped, resulting in 89 sequences [GenBank access # xxxxxxxx to yyyyyy] of the mitochondrial DNA region (472 bp) comprising *COI*, intergenic spacer (*IGS*), *Leu-tRNA*, and *COII*. Analysis of the intergenic spacer (*IGS*), revealed two distinct lineages in *A. laevigata*. However, the *IGS* sequence was excluded from subsequent examinations because it was highly variable and caused noise in the network of haplotypes.

Consistent with the *IGS* sequence analysis, the phylogenetic relationship among haplotypes revealed two distinct and sympatric lineages of *A. laevigata* (Figure 2). The 89 sequences were classified into 15 haplotypes: lineage I was represented by haplotypes 1-8 and 15; and lineage II was represented by haplotypes 9-14. The haplotype 15 was found in Marau. Haplotypes 12 and 13 were the predicted ancestors and others seem to be evolutionarily more recent. The distribution of haplotypes was not related to geographic location, because haplotypes 4, 10, 12 and 13 were detected in both regions.

Sequences of nuclear genes were obtained from a small subset of workers and showed no differences between individuals of distinct mitochondrial lineages in rhodopsin (519 bp), wingless (381 bp) or *EF-1 α F2* (475 bp) (Appendix).

Morphological analysis

Atypical genitalia morphologic variation was found in 20 of 75 collected males in lineage I and lineage II (Table 1). These males were called morph II and described separately (see below). The remaining 55 males without genitalia variation were further examined. The *t*-Test showed lineage I males were heavier and larger than lineage II males. Moreover, the volsella length, thistle width, stipites length, and dimensions of the abdomen (Table 2) were distinct in both lineages. The results were subjected to multivariate analysis using multivariate analysis

of variance (MANOVA). This analysis showed that the two lineages were morphologically different ($\text{Pr}(>F) = 5.409\text{e-}07$, $\text{Df residuals} = 52$).

Polymorphisms

In general, the analyzed traits were more variable in lineage II than in lineage I (Figure 3). Figure 3 also shows that the thistle width, stipites length, body dimensions and abdominal length and height were somewhat variable while the sagittae and volsella measurements were highly variable in lineage II.

Atypical genitalia variation

Morph II genitalia was detected in three of the 25 (12%) subjects in lineage I and 17 of 50 (34%) subjects in lineage II. Two out of five lineage I nests (40%) contained subjects with morph II genitalia, while in lineage II, eight of 10 nests (80%) had subjects with morph II genitalia. The inclusion criteria for atypical genitalia variation included: large angle in the dorso-ventral projection of the stipites and sagittae, and short thistle (Figure 4).

Discussion

The results show congruence between mitochondrial markers and morphological data. They indicate that *A. laevigata* is formed by two distinct gene pools. Indeed, the haplotype network formed by the median-joining method (Figure 2) confirmed the presence of two distinct lineages. Haplotypes 12 and 13 were likely ancestral haplotypes because of their frequent occurrence in population and wide geographic distribution [16, 17]. Evolutionarily recent haplotypes were located at the ends of the network and were present within the geographical regions occupied by ancestral haplotypes [17]. Haplotypes in lineage I were not geographically isolated from haplotypes in lineage II, indicating that lineage I and lineage II ants were sympatric in both Botucatu and Bauru regions of southeastern Brazil.

Through traditional morphometric data, we found that the two lineages are different in their body dimensions (length, height, and weight) and genitalia (length of the volsella and width of the stipites and thistle) (Table 2). These structures have proven to be good parameters for distinguishing the two lineages. Most of these characteristics showed low variance (Figure 3, Table 2), which contributed to the clear demarcation of the two lineages. Although the body

weight and dimensions of volsella were highly variable, they still signified the presence of two lineages in *A. laevigata*. However, the sagittae measurements were too variable to distinguish between lineages.

Sagittae polymorphism has been previously described [6] and controversially used to suggest the existence of *A. silvai* as a distinct species from *A. laevigata* [8]. Therefore, special attention should be given to the structural features and dimensions of sagittae, although in our study these characteristics did not distinguish the two genetic and phenotypic lineages we identified in *A. laevigata*. Still, sagittae structure is useful for differentiating species of the genus *Atta* [6]. The stipites and volsella measurements provide discrimination potential not only for *Atta* species [5], but for both lineages in *A. laevigata*. Body dimensions and thistle width have not been used previously to differentiate *Atta* species.

The finding that sympatric lineages of *Atta laevigata* are also morphologically distinct from each other, suggest each of these lineages compose a distinct isolated species. The finding that individuals from Marau are within the lineage I, reinforce the proposition that *Atta laevigata* lineage I should be called *Atta silvai*.

We analyzed morph II genitalia rate in the lineage I or II of *A. laevigata*. Lineage II ants had a higher rate of morph II genitalia; twice the rate of lineage I ants if normalized by the number of nests and almost three times if normalized by the number of individuals. Despite these differences, morph II genitalia was not a suitable metric to characterize *A. laevigata* since both lineages contained individuals with this genitalia variation.

The formation of morph II genitalia can result from the accumulation of deleterious traits in haploid males, which would be minimized in heterozygous and diploid females. It is possible that the morphological changes, which are more drastic in haploid males, hinder copulation. Thus, the annual production of a large number of males in leaf-cutter ants [18,19], including in *A. laevigata*, may be an strategy to guarantee that a sufficient number of fertile males not presenting morph II genitalia is produced.

The results presented here indicate the presence of two lineages within *A. laevigata* that are morphologically and genetically discernable. Congruence between genotypic and phenotypic examinations suggests that the two sympatric lineages are reproductively isolated. Thus, it is possible that there is a barrier for mating between individuals of these two lineages.

Morphological differences between male genitalia have been previously proposed to act as reproductive barriers, explained by a mechanism known as lock and key [12,20]. It is possible that the differences between lineage I and lineage II, including the dimensions of the genitalia (volsella, stipites and thistle) and body size, are related to a pre-zygotic reproductive isolation.

Future experiments are needed to verify the existence of barriers and their possible influences on the reproductive isolation of the two lineages of *A. laevigata*.

Conclusion

We identified and characterized two sympatric and morphologically distinct lineages of *A. laevigata*. The body dimensions (length, height and weight) and genitalia structure (volsella length, stipites width, and thistle width) were good characteristics for distinguishing the two lineages. It is likely that these differences hinder reproduction between sympatric individuals of different lineages of *A. laevigata*, suggesting a reproductive barrier. Therefore, it seems that a process of speciation took place, splitting *A. laevigata* in two distinct isolated species. One of these species dominates the region of Marau, which is the type locality of a previously proposed species of *Atta* called *Atta silvai*. Therefore, our results reinforce the proposition of *Atta silvai* as a new species.

Materials and Methods

Sample collection

Workers ants of *A. laevigata* were collected with tweezers, immediately placed in vials containing 100% ethanol, and stored at -20 °C for further analyses. Males were collected from the orifice of each nest with forceps and stored in 70% ethanol at room temperature until they were used for morphological analysis. The worker ants were collected in pasture area, edge of cerrado, grange, farmstead, roadsides and in urban area (Table 3). At each sampling point, were determined the latitude and longitude with a GPS (Global Positioning System) and through the program ArcGIS (1999) were elaborated maps.

Molecular analyses

Genomic DNA extraction

DNA was extracted from the head of major workers ants from each nest following the protocol described by Martins *et al.* [21]. Individual specimens were crushed in 1.5 ml microcentrifuge tubes containing 500 µl of ice-cold TNES (Tris NaCl-EDTA-SDS) solution

(250 mM Tris Base (Promega, Madison, WI), pH 7.5, 2 M NaCl (Merck, Darmstadt, Germany), 100 mM EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid; Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, MO), 2% SDS (Sodium dodecyl sulfate; Promega, Madison, WI). Then, 5 µl of 20 mg / ml proteinase K (USB Corporation, Cleveland, OH, cat # 76230Y) was added to the tubes and the mixture was incubated for 3 h at 55 °C, followed by addition of 5 µl of 4 mg / ml RNase A (Calbiochem, San Diego, CA, cat # 556746) and 30 min incubation at 37 °C. Proteins were precipitated by adding 200 µl of 5 M NaCl and centrifuged to pellet. The supernatant was collected and DNA was precipitated with 100% isopropanol, washed with 70% ethanol, centrifuged, dried and resuspended in 30 µl TE buffer (pH=8.0).

DNA amplification

DNA amplification was performed in 30 µl reactions using a buffer containing 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 2.5 mM KCl (cat # EPO402 Fermentas), 1.5 mM MgCl₂ (Fermentas cat # EPO402); 0.4 mM dNTP mix (Fermentas cat # RO192), ~ 100 ng DNA template, and ultra-pure water. For mitochondrial markers, 10 pmol ANT-F primer (5'-ATTCATTCTTATCTTGAAATATTATTTC-3'), 10 pmol ANT-RG primer (5'-TTCATAAGTTCAGT ATCATTGGTG - 3') (Martins et al. 2007) were used. PCR reactions were performed following the program: an initial cycle at 94°C for 5 min, followed by 40 cycles of 94°C for 60 s, 47°C for 60 s and 68°C for 2 min and a final extension of 68°C for 15 min. The nuclear markers long-wavelength opsin (rhodopsina), wingless and elongation factor 1- α (*EF-1 α F2*) were amplified using the primers described in Schultz & Brady (2008). PCR reactions were performed following the program: an initial cycle at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of 94°C for 60 s, 50°C for 45 s and 68°C for 2 min.

PCR products were purified with GFX PCR DNA Gel Band Purification Kit (GE Healthcare cat # 27-9602-01).

DNA Sequencing

Sequencing was performed in a final volume of 20 µl containing 20 ng DNA template, 6 pmol primers, 1 µl BigDye (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA, cat # 4336919), 2.0 µl buffer (200 mM Tris.HCl and 5 mM MgCl₂) and ultra-pure water. PCR reactions were performed following the program: an initial cycle at 96°C for 2 min, followed by 28 cycles of 96°C for 45 s, 50°C for 30 s and 60°C for 4 min.

The sequencing products were purified and then resolved in an ABI3500 sequence automated machine (Applied Biosystems) on the Laboratory of Molecular Evolution, CEIS at the State University Júlio de Mesquita Filho.

Sequence analysis

Sequences were edited with BIOEDIT 7.0.5 software [22] and aligned with CLUSTALW [23] using default parameters. The haplotype network was analyzed with NETWORK 4.5 [24].

Morphological Analysis

Male external genitalia were removed in saline (0.9% NaCl) under a stereoscopic microscope. Analyses of external structures were based on studies published by Gonçalves in 1942 [5] and by Borgmeier in 1950 [6]. Males were removed from the 70% ethanol, left at room temperature for about 1 h to dry and then their mass was determined. Each male were measured for the nine indicated characteristics with the aid of a stereoscopic microscope with software Pro Auto Montage version 5.02.0096. Height and length of the abdomen were taken in lateral view. The genitalia of each male was photographed at various angles, with the goal of assembling a digital archive. Measurements of the male genitalia were performed in ventral view: (a) thistle width (b) the stipites length, (c) sagittae length (d) sagittae width (e) volsella length, (f) volsella width (g) opening sagittae (Figure 5).

Statistical analysis

The normality of results was evaluated by D'Agostino-Pearson 1973 test [26]. Statistical analyses were performed using the R 2.14.0 software [27]. MANOVA $p \leq 0.05$ was used to assess the equality of the lineages. The values of body size were expressed as mean and standard deviation. The *t*-Test was used to investigate the differences between the lineages regarding the same body size. Polymorphisms were estimated by the variance of each body size. The variances of body measurements were normalized to dimensionless values with lower and upper limits equal to 0 and 100, respectively. The results were displayed in graphs constructed in Origin 6.0 software.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

List of abbreviation used

pb: base pair; PCR: polymerase chain reaction

Authors' Contributions

CMSB conducted field and laboratory work, and drafted the manuscript. AFS performed the statistic analysis. SSV collaborated with the laboratory work and provided comments on the manuscript. MBJ led the research, contributed to data interpretation and manuscript writing. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgements

We thank Mauricio Silveira, Luiz Carlos Forti for help with field collections, Tassio Brito, Dr. Fábio Akashi for help in taking the photos, Sergio Kakazu for assistance with DNA sequencing and FAPESP for financial support.

Figure legends

Figure 1. Collection area of *A. laevigata*.

Figure 2. Haplotype network based on mitochondrial sequences comprising the *COI*, *Leu-tRNA*, and *COII* genes. Diameter of each circle is proportional to the frequency of the haplotype. The blue color represents individuals from Bauru, yellow color represents individuals from Botucatu and red color represents individuals from Marau. Numbers in green indicate the nests used in morphological analyses of males. The red dots represent unsampled and predicted haplotypes.

Figure 3. Polymorphisms of the male characteristics. A: thistle width, B: length of stipites; C: sagittae length, D: sagittae width, E: volsella length, F: volsella width; G: opening of the lateral expansion of sagittae, H: width of abdomen, I: length of the abdomen, J: wet mass. * Structures that presented low polymorphism.

Figure 4. External genitalia of *A. laevigata* males in lineages I and II. Ventral view: lineage I (a) and lineage II (b); lateral view: lineage I (c) and lineage II (d). Variation genitalia, ventral view: lineage I (e) and lineage II (f); lateral view: lineage I (g) and lineage II (h).

Figure 5. Morphmetry of *A. laevigata* male genitalia. (a) thistle width (b) stipites length, (c) sagittae length (d) sagittae width (e) volsella length, (f) volsella width and (g) sagittae opening.

Reference

1. Bolton B: *Synopsis and classification of Formicidae*. Gainesville: Memoirs of the American Entomological Institute; 2003.
2. Klingenberg C, Brandão, RF: **Revision of the fungus-growing ant genera *Mycetophylax* Emery and *Paramycetophylax* Kusnezov rev. sta., and description of *Kalanthomyrmex* n. gen. (Formicidae: Myrmicinae: Attini)**. *Zootaxa* 2009, **31**:1–31.
3. Weber NA: *Gardening ants. The Attines*. Philadelphia: Memoirs of the American Philosophical Society; 1972.
4. Mehdiabadi NJ, Schultz TR: **Natural history and phylogeny of the fungus-farming ants (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae: Attini)**. *Myrmecol News* 2009, **13**: 37-55.
5. Gonçalves CR: **Contribuição para o conhecimento do gênero *Atta* Fab., das formigas saúvas**. *Sociedade Brasileira de Agronomia* 1942, **5**: 333-358.
6. Borgmeier T: **Estudos sobre *Atta* (Hym. Formicidae)**. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1950, **48**: 239-292.
7. Gonçalves CR: ***Atta silvai* nova espécie de formiga saúva (Hymenoptera, Formicidae)**. *Arq. Univ. Fed. Rural do Rio de Janeiro* 1982, **2**: 173-178.
8. Delabie JCH: ***Atta silvai* Gonçalves, sinônimo júnior de *Atta laevigata* (Fred Smith) (Hymenoptera, Formicidae, Attini)**. *Revista Brasileira de Entomologia* 1998, **(2-4)**: 339-341.
9. Mayr, GL: ***Formicidae***. *Reise der österreichischen Fregatte Novara um die Erde in den Jahren unter den Befehlen des Commodore B. von Wüllerstorff-Urbair*. Zoologischer; 1868.
10. Mutanen MA, Rytönen SE, Lindén JARI, Sinkkonen JA: **Male genital variation in a moth *Pammene luedersiana* (Lepidoptera : Tortricidae)**. *J. Entomol.* 2007, **104**:259–265.
11. Andena S. R.; Mateus S. **Description of the male of *Brachygastra moebiana* Saussure (Hymenoptera: Vespidae; Epiponini)**. *Entomo Brasilis* 2011, **2**: 75-77.
12. Shapiro AM, Porter AH: **The lock-and-key hypothesis: evolutionary and biosystematic interpretation of insect genitalia**. *Annu. Rev. Entomol.* 1989, **34**: 231–245.
13. Maruyama M, Steiner FM, Stauffer C, Akino T, Crozier RH, Schlick-Steiner BC: **A DNA and morphology based phylogenetic framework of the ant genus *Lasius* with hypotheses for the evolution of social parasitism and fungiculture**. *BMC evolutionary biology* 2008, **8**:237.
14. Wysocka a, Krzysztofiak L, Krzysztofiak a, Zołnierkiewicz O, Ojdowska E, Sell J: **Low genetic diversity in Polish populations of sibling ant species: *Lasius niger* (L.) and *Lasius platythorax* Seifert (Hymenoptera, Formicidae)**. *Insectes sociaux* 2011, **58**:191–195.

15. Goropashnaya AV, Fedorov VB, Seifert B, Pamilo P: **Phylogenetic relationships of Palaearctic *Formica* species (Hymenoptera, Formicidae) based on mitochondrial cytochrome B sequences.** *PloS one* 2012, 7:e41697.
16. Watterson GA. Guess H. A: **Is the most frequent allele the oldest?** *Theoretical Population Biology* 1977, 2: 141-160.
17. Templeton AR: **Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history.** *Molecular ecology* 1998, 7:381–97.
18. Autuori, M: **Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp. Hymenoptera Formicidae)** *Arq. Inst. Biol.* 1950, 19: 325-331.
19. Kerr, WE: **Acasalamento de rainhas com vários machos em duas espécies da Tribo Attini (Hymenoptera Formicidae).** *Rev. Brasil. Biol* 1961, 21: 45-48.
20. Arnqvist G: **The evolution of animal genitalia : distinguishing between hypotheses by single species studies.** *Biological Journal of the Linnean Society* 1997, 60:365–379.
21. Martins J, Solomon SE, Mikheyev AS, Mueller UG, Ortiz A, Bacci M: **Nuclear mitochondrial-like sequences in ants: evidence from *Atta cephalotes* (Formicidae: Attini).** *Insect Mol Biol* 2007, 16: 777-784.
22. Hall TA: **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** *Nucl Acid S* 1999, 41: 95-98.
23. Thompson JD, Higgins, DG, Gibson, TJ: **CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.** *Nucl Acids Res* 1994, 22: 4673-4680.
24. Bandelt HJ, Forster P, Röhl A: **Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies.** *Mol Biol Evol* 1999, 16: 37-48.
25. Polzin, T.; Daneshmand, S. V. Network 4.6.1.0. Fluxus Techonology Ltd. Steiner (MP). **Copyright**, p. 2004-2012, 2003.
26. D'Agostino R, Pearson E: **Tests for departures from normality. Empirical results for the distribution of $\sqrt{b_1}$ and b_2 .** *Biometrika* 1973, 60:613-622.
27. R. Development Core team (2011). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistal Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-070-0, URL <http://WWW.R-project.org/>. Acesso, 27 jun. 2011.

Table 1. Lineage classification of male *A. laevigata* collected from two regions in Brazil. *: Number of males with normal genitalia. #: Number of males with deformed genitalia.

Nest	Lineage	Region	Normal*	Deformed #
N 01	01	Botucatu	5	-
N 02	01	Botucatu	5	-
N 06	01	Botucatu	5	-
N 37	01	Botucatu	3	2
N 74	01	Botucatu	4	1
N 14	02	Botucatu	5	-
N 29	02	Botucatu	4	1
N 30	02	Botucatu	2	3
N 24	02	Bauru	3	2
N 28	02	Bauru	3	2
N 56	02	Bauru	3	2
N 46	02	Bauru	3	2
N 55	02	Bauru	5	-
N 27	02	Bauru	3	2
N 80	02	Bauru	2	3
Total	-	-	55	20

Table 2. Dimensions and results of the *t*-Test for different body structures of males. Dimensões representadas em média $\pm$ desvio padrão. Numbers followed by letter are significantly different according to the *t*- Test. 55 males were examined, lineage I (LI) had 22 subjects and lineage II (LII) had 33 individuals.

	Sagittae (mm)			Volsella (mm)		Thistle (mm)	Stipites (mm)	Abdomen (mm)		Body (g)
	length	width	Expansion (width)	length	width	width	length	width	length	Mass
LI	2.48 $\pm$ 0.19	1.01 $\pm$ 0.07	0.31 $\pm$ 0.43	2.43 $\pm$ 0.18	0.57 $\pm$ 0.05	3.24 $\pm$ 0.15	3.25 $\pm$ 0.13	5.00 $\pm$ 0.29	8.66 $\pm$ 0.46	0.19 $\pm$ 0.01
LII	2.41 $\pm$ 0.10	0.98 $\pm$ 0.26	0.22 $\pm$ 0.06	2.26 $\pm$ 0.34	0.59 $\pm$ 0.05	3.04 $\pm$ 0.18	3.01 $\pm$ 0.15	4.53 $\pm$ 0.25	7.92 $\pm$ 0.47	0.15 $\pm$ 0.02
t	-1.82826	-0.54846	-1.28049	-2.20125	1.40942	-4.28848	-6.12923	-5.81294	-6.29919	-7.08072
p	0.07314	0.58568	0.20595	0.03209 b	0.16455	7.65E-05 b	1.13E-07 b	3.59E-07 b	6.03E-08 b	3.34E-09 b

Table 3. *Atta laevigata* nests collected

Code	Lineage	Site	Longitude	Latitude	Collection area
N 01	I	Botucatu	-48.26565	-22.50366	Pasture
N 02	I	Botucatu	-48.26326	-22.50880	Pasture
N 03	II	Botucatu	-48.26209	-22.50981	Pasture
N 04	I	Botucatu	-48.26175	-22.51077	Pasture
N 05	I	Botucatu	-48.26187	-22.51079	Pasture
N 06	I	Botucatu	-48.26421	-22.50935	Pasture
N 08	II	Bauru	-49.02839	-22.14669	farmstead
N 09	II	Bauru	-49.02839	-22.14669	farmstead
N 10	I	Bauru	-49.02880	-22.14125	grange
N 11	II	Bauru	-49.03626	-22.16520	Pasture
N 12	II	Bauru	-49.03447	-22.16482	Pasture
N 13	II	Bauru	-49.02241	-22.13981	Farmstead
N 14	II	Botucatu	-48.26215	-22.51837	Urban area
N 15	II	Botucatu	-48.25933	-22.51630	Urban area
N 16	II	Botucatu	-48.25908	-22.51620	Pasture
N 17	II	Botucatu	-48.25892	-22.51634	Edge of cerrado
N 19	I	Botucatu	-48.28338	-22.50959	Pasture
N 20	II	Bauru	-49.03543	-22.15233	Pasture
N 21	II	Bauru	-49.03523	-22.15254	Pasture
N 22	II	Bauru	-49.03531	-22.15241	Pasture
N 24	II	Bauru	-49.02978	-22.20037	Urban area
N 26	II	Bauru	-49.01588	-22.23073	Urban area
N 27	II	Bauru	-49.00904	-22.21838	Edge of cerrado
N 28	II	Bauru	-49.00977	-22.21730	Edge of cerrado
N 29	II	Botucatu	-48.26156	-22.50250	Pasture
N 30	II	Botucatu	-48.26143	-22.50229	Pasture
N 31	II	Bauru	-49.01854	-22.23155	Urban area
N 32	II	Botucatu	-48.26156	-22.21730	Pasture
N 33	II	Botucatu	-48.26143	-22.50229	Pasture
N 34	I	Botucatu	-48.26172	-22.51074	Urban area
N 35	I	Botucatu	-48.26168	-22.51059	Urban area
N 36	I	Botucatu	-48.26242	-22.55874	Urban area
N 37	I	Botucatu	-48.25931	-22.55939	Urban area
N 38	I	Botucatu	-48.26274	-22.51061	Pasture
N 39	II	Botucatu	-48.26217	-22.50961	Pasture
N 40	I	Botucatu	-48.26210	-22.50964	Pasture
N 41	I	Botucatu	-48.26252	-22.50986	Pasture
N 42	I	Botucatu	-48.26345	-22.50930	Pasture
N 44	I	Botucatu	-48.26192	-22.50992	Pasture
N 45	I	Botucatu	-48.26219	-22.50966	Pasture
N 47	II	Bauru	-49.00978	-22.21727	Edge of cerrado
N 48	II	Bauru	-49.00905	-22.21834	Edge of cerrado
N 49	II	Bauru	-49.00906	-22.21839	Edge of cerrado
N 50	II	Bauru	-49.02571	-22.21188	Urban area
N 51	I	Botucatu	-48.26212	-22.59096	Pasture
N 52	II	Botucatu	-48.2206	-22.50967	Pasture
N 53	I	Botucatu	-48.26220	-22.50967	Pasture
N 54	II	Botucatu	-48.25944	-22.51641	Pasture
N 55	II	Bauru	-49.01597	-22.21502	Urban area
N 56	II	Bauru	-49.01597	-22.21079	Edge of cerrado
N 57	II	Bauru	-49.00486	-22.21079	Edge of cerrado
N 58	II	Bauru	-49.00486	-22.21079	Edge of cerrado
N 59	II	Bauru	-49.00484	-22.21002	Edge of cerrado
N 60	II	Bauru	-49.00461	-22.23155	Urban area
N 61	II	Bauru	-49.01854	-22.21182	Urban area
N 62	II	Bauru	-49.02563	-22.21091	Edge of cerrado

Continuation - table 3

Code	Lineage	Site	Longitude	Latitude	Área de coleta
N 63	II	Bauru	-49.00328	-22.22906	Edge of cerrado
N 65	II	Bauru	-49.00292	-22.87810	Edge of cerrado
N 66	II	Bauru	-49.00154	-22.20792	Edge of cerrado
N 67	II	Bauru	-49.00133	-22.20773	Edge of cerrado
N 68	II	Bauru	-49.00145	-22.20785	Edge of cerrado
N 69	II	Bauru	-49.00277	-22.20839	Edge of cerrado
N 70	II	Bauru	-49.00214	-22.14084	Edge of cerrado
N 71	II	Bauru	-49.05156	-22.23724	Edge of cerrado
N 72	II	Bauru	-49.05134	-22.23710	Edge of cerrado
N 73	II	Bauru	-49.05137	-22.23711	Edge of cerrado
N 74	I	Botucatu	-48.25788	-22.55907	Edge of cerrado
N 77	II	Marau	-14.12932	-39.03521	Urban area
N 79	II	Bauru	-49.00228	-22.20840	Edge of cerrado
N 80	II	Bauru	-49.00758	-22.21648	Edge of cerrado
N 81	II	Bauru	-49.00839	-22.21670	Edge of cerrado
N 82	II	Bauru	-49.01099	-22.21678	Edge of cerrado
N 83	II	Bauru	-49.01263	-22.21677	Edge of cerrado
N 84	II	Bauru	-49.01288	-22.21673	Edge of cerrado
N 85	II	Bauru	-49.01098	-22.21680	Edge of cerrado
N 86	II	Bauru	-49.00462	-22.21305	Edge of cerrado
N 87	II	Bauru	-49.00715	-22.21641	Edge of cerrado
N 88	II	Bauru	-49.01005	-22.21703	Edge of cerrado
N 89	II	Bauru	-49.00293	-22.20879	Edge of cerrado
N 90	II	Bauru	-49.01151	-22.21680	Edge of cerrado
N 91	II	Bauru	-49.01505	-22.21571	Edge of cerrado
N 92	II	Bauru	-49.00741	-22.21649	Edge of cerrado
N93	II	Bauru	-49.00870	-22.21679	Edge of cerrado
N94	II	Bauru	-49.22220	-22.20790	Edge of cerrado
N95	II	Bauru	-49.25932	-22.55940	Edge of cerrado
N96	II	Marau	-39.00727	-14.06705	Roadsides
N97	II	Marau	-39.01182	-14.06205	Roadsides
N98	II	Marau	-39.03150	-14.21507	Roadsides
N99	II	Marau	-39.00665	-14.06900	Roadsides

Figure 1

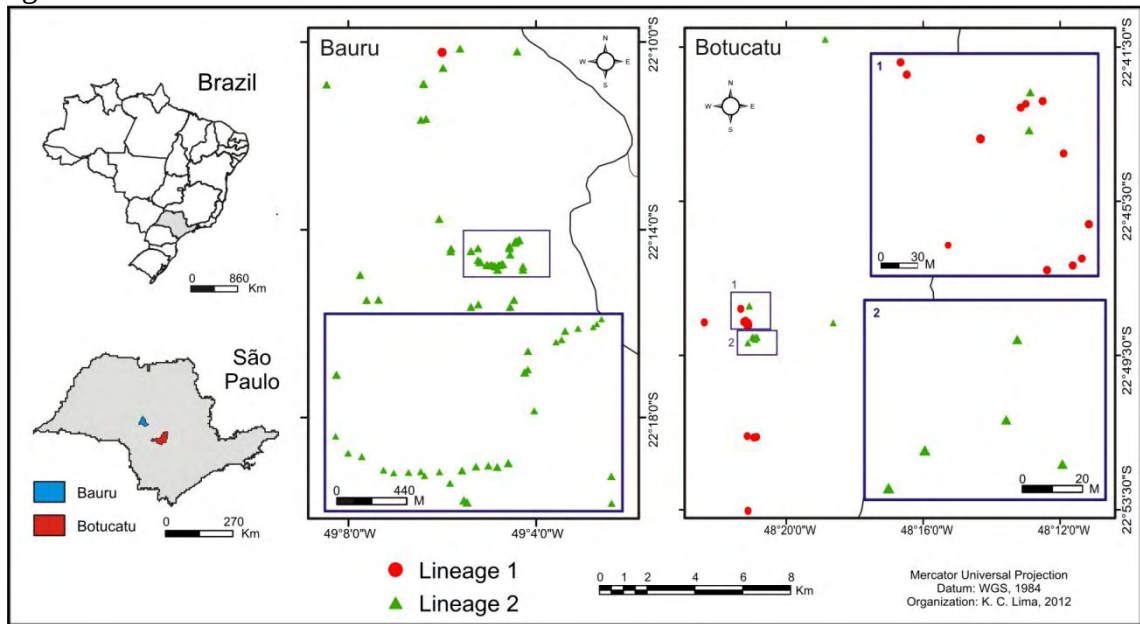


Figure 2

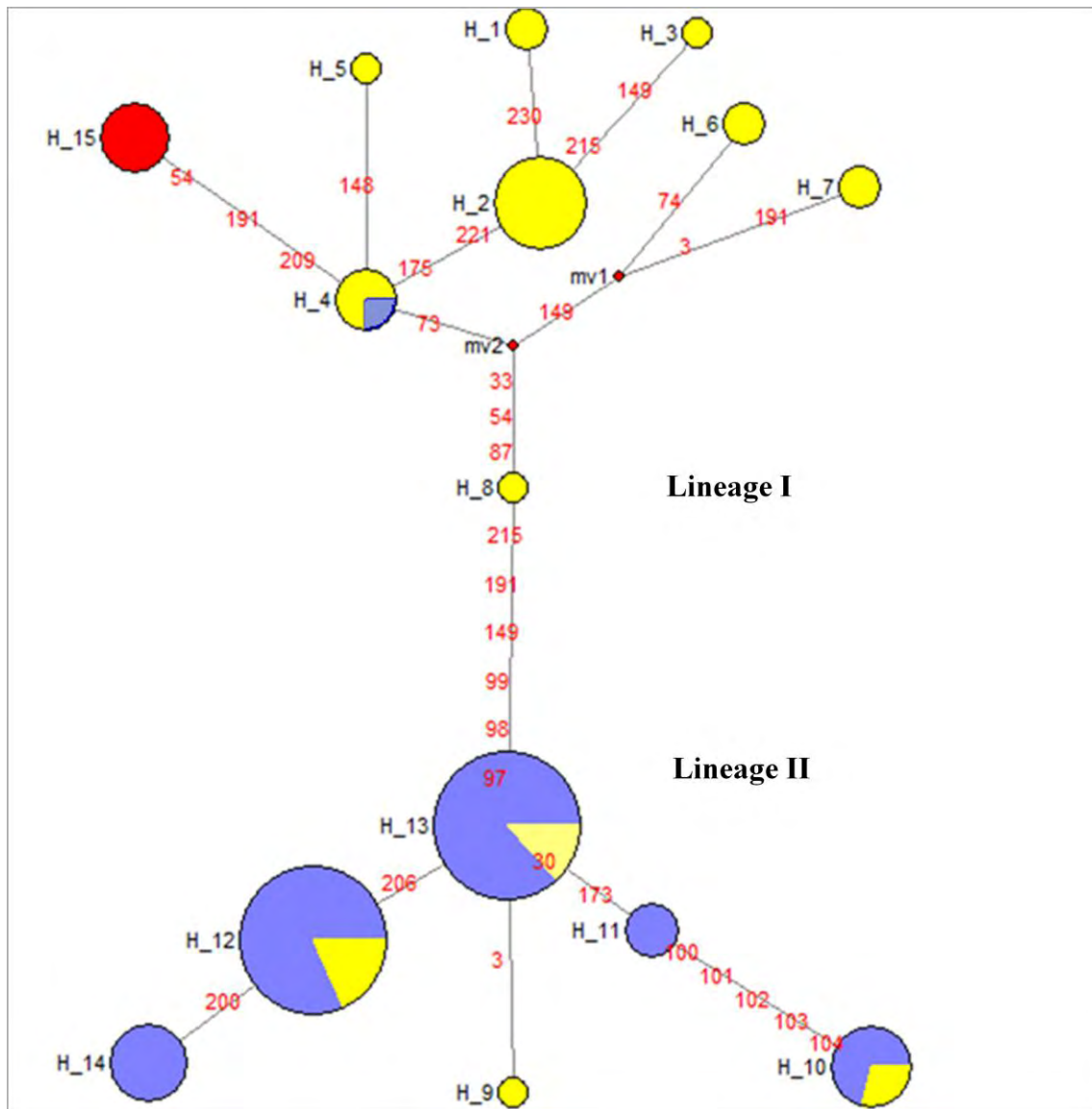


Figure 3

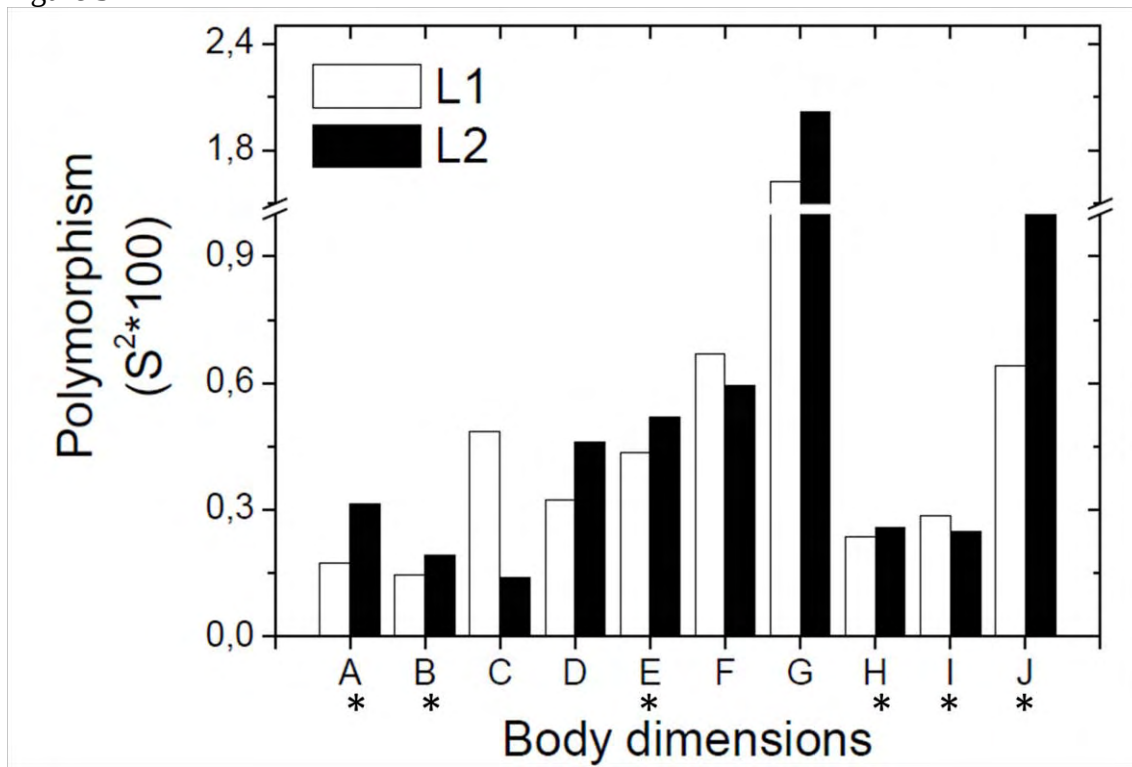


Figure 4

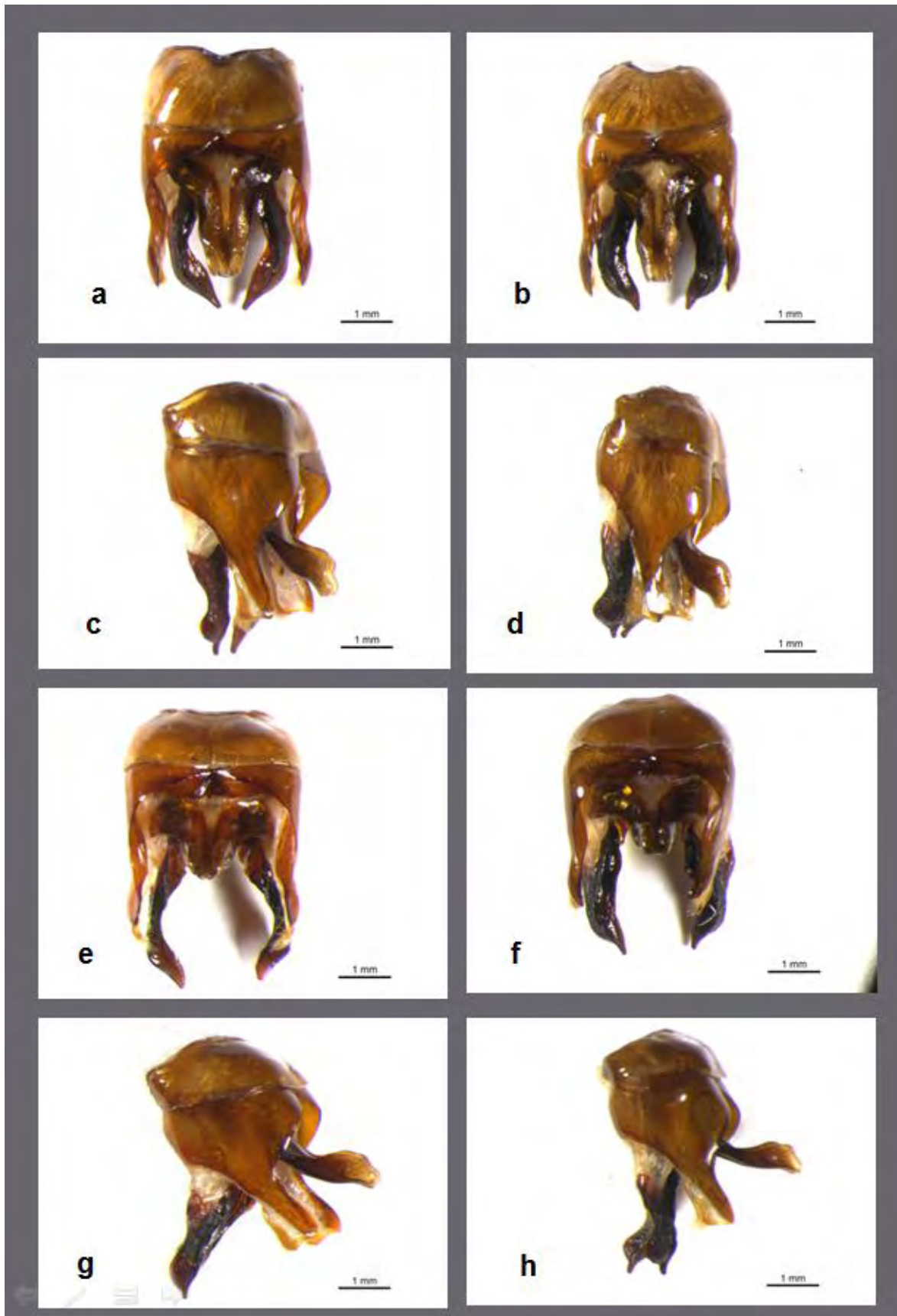
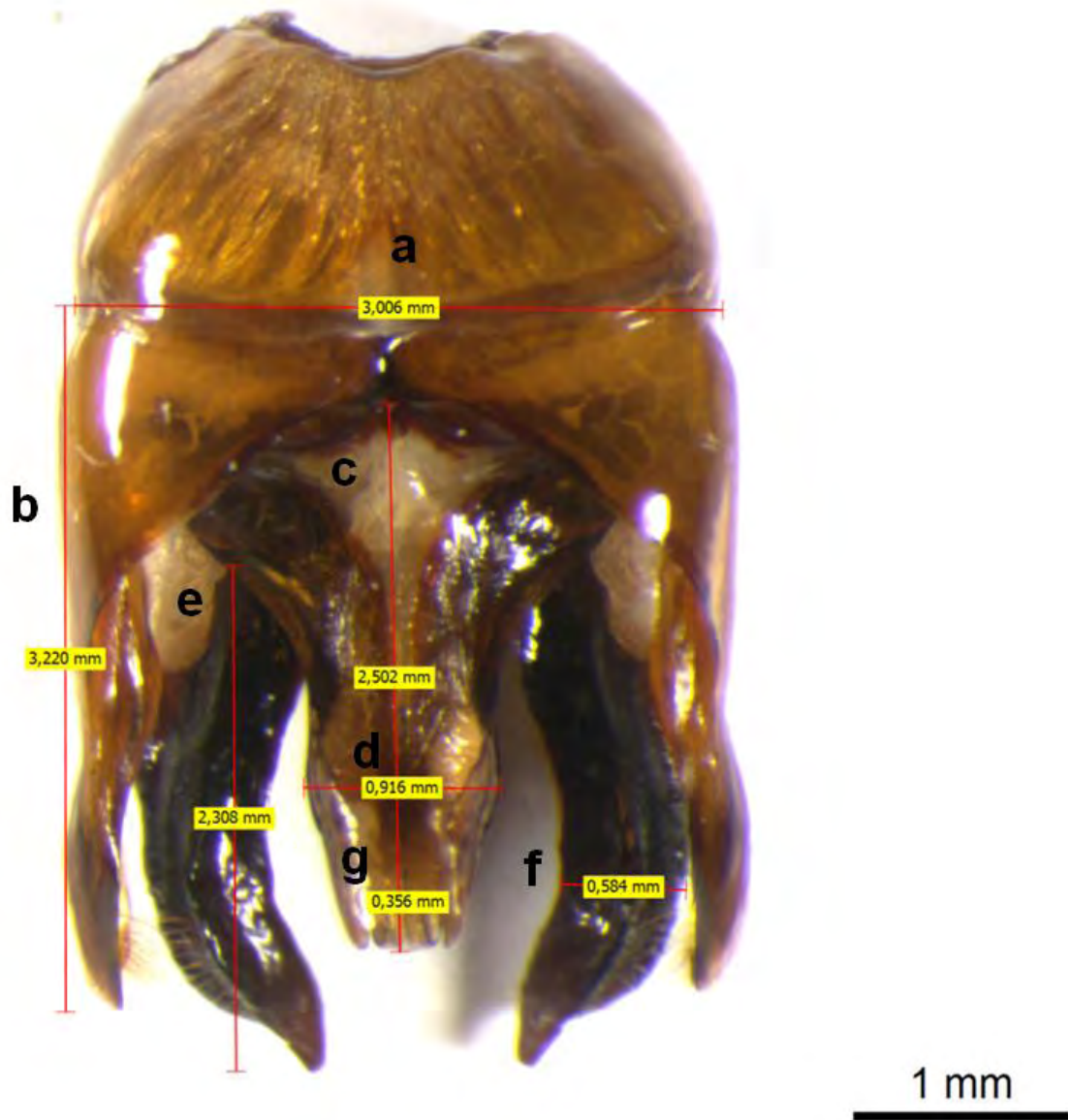


Figure 5



Alignment of sequences - (long-wavelength [LW] opsin (rhodopsin))

Capítulo II

**Fatores envolvidos com a diferenciação das populações em *Atta laevigata* F. Smith 1858
(Formicidae: Myrmicinae: Attini)**

Cintia Maria Santos Bezerra¹, Sérgio kakazu¹, Letícia Mara Lima Angelini¹, Milene Ferro¹, Maurício Bacci Jr ^{1*}

¹ Instituto de Biociências, UNESP - Univ Estadual Paulista, Campus Rio Claro, Centro de Estudos de Insetos Sociais.

E-mail CMSB: cintiams_bezerra@yahoo.com.br
SK: miaguisam@yahoo.com.br
LMLA: leticiaangelini@yahoo.com.br
MF: mlenef@gmail.com
MB: mbacci@rc.unesp.br

*Corresponding author

Maurício Bacci Júnior

Centro de Estudos de Insetos Sociais,

Universidade Estadual Paulista, Av. 24A, n. 1515 – Bela Vista,

Zip Code: 13506-900 – Rio Claro, SP – Brazil. Tel.: +55 19 3526 4165;

Fax: +55 19 3534 8523; e-mail: mbacci@rc.unesp.br

Resumo

A formiga cortadeira *Atta laevigata* se apresenta dividida em duas linhagens mitocondriais, cada uma delas com machos morfologicamente distintos. A congruência entre os marcadores morfológicos e genéticos sugere que essas formigas estão em processo de especiação. No presente trabalho, foram estudados alguns fatores que poderiam estar relacionados com este processo. Com base em marcadores nucleares, três grupos gênicos do fungo mutualista *Leucoagaricus gongylophorus* foram encontrados associados com fêmeas de ambas as linhagens de *A. laevigata*. Portanto, o processo de especiação não foi acompanhado de uma especialização no cultivo de um determinado grupo de fungo. Formigas simpátricas de linhagens distintas puderam realizar o voo nupcial simultaneamente. No entanto, análises de quatro loci mitocondriais e seis loci microssatélites mostraram que cada fêmea em uma das linhagens é fecundada exclusivamente (ou ao menos predominantemente) por um a seis machos da mesma linhagem. Portanto, há uma barreira pré-zigótica levando ao isolamento reprodutivo entre indivíduos simpátricos de linhagens distintas. Esta barreira foi provavelmente causada pelas diferenças corpóreas dos machos, incluindo a genitália, que dificulta, ou mesmo impede a cópula entre indivíduos de linhagens distintas.

Palavras-chaves: barreira pré-zigótica, comportamento reprodutivo, formiga cortadeira, *Leucoagaricus gongylophorus*, linhagem mitocondrial.

Abstract

The leafcutter ant *Atta laevigata* is divided in two mitochondrial lineages, each one with a morphologically distinct male. The congruence between morphological and genetic markers suggests that a speciation process is in progress for this ant. In the present work, some factors that could be related with this speciation process were studied. Based on nuclear markers, three genic groups of the mutualistic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* were found associated with females from both *A. laevigata* lineages. Therefore, this speciation process was not accompanied by a specialization in the cultivation of a particular group of fungi. Distinct ants' sympatric lineages could perform the nuptial flight simultaneously. However, analysis of four mitochondrial and six microsatellite locus showed that each female from a lineage is fertilized exclusively (or at least predominantly) by one at six males from the same lineage. Thus, there is a pre zygotic barrier leading to reproductive isolation between sympatric individuals of distinct lineages. This barrier was probably caused by physical differences of males (including the genitalia) that makes it difficult, or even prevents the mating between individuals of different lineages.

Keywords: pre zygotic barrier, leafcutter ant, mitochondrial lineage, *Leucoagaricus gongylophorus*, reproductive behavior

Introdução

A reconstrução dos eventos históricos que levaram ao surgimento de uma nova espécie é extremamente difícil e hipotética. Baseia-se em um conjunto de observações e estimativas que se demonstra encaixar em um modelo teórico. Um dos modelos difíceis de demonstrar na natureza é a especiação simpátrica. Esse modelo de especiação se dá quando uma barreira biológica ao intercruzamento se origina dentro dos limites de uma população, sem nenhuma segregação espacial das espécies incipientes (HARRISON, 2012). Por muito tempo, essa teoria foi desfavorecida devido à ausência de evidências empíricas disponíveis. Porém, nos últimos anos surgiram evidências desse tipo de especiação em populações naturais como aves, peixes e insetos (COYNE; PRICE, 2000; ELMER; MEYER, 2010; CROW et al., 2010; BERLOCHER, et al., 2002).

Atta laevigata são formigas cortadeiras que podem ser consideradas como um excelente modelo de especiação, pois formam duas linhagens mitocondriais simpátricas com machos morfologicamente distintos em cada linhagem. Estão, portanto, possivelmente isoladas reprodutivamente (BEZERRA et al., submetido). Portanto, as linhagens representam provavelmente duas espécies biológicas distintas.

No entanto, o intenso polimorfismo morfológico dificulta diferenciar as operárias de cada uma das linhagens utilizando a análise dos espinhos, que são os caracteres informativos à Taxonomia tradicionalmente aceitos. Inexiste, portanto, morfótipo distinto para as operárias pertencentes a cada uma das espécies propostas.

Possivelmente, algumas diferenças foram importantes, ou mesmo determinantes, para resultar na divergência definitiva das espécies através do rompimento da coesão do pool gênico. Entre os fatores que acompanham ou causam o rompimento, podemos supor os seguintes:

a) Quebra no sincronismo temporal do voo nupcial. As formigas, ao longo de sua história natural, desenvolveram estratégias importantes de reprodução e de dispersão (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Uma dessas estratégias é a revoada, fenômeno no qual as formas reprodutivas (içás e bitus) saem do formigueiro para realizarem seu voo nupcial.

A combinação dos fatores climáticos (umidade do ar e do solo, temperatura e vento) e biológicos (maturação sexual e feromônios) é determinante para a sincronização do voo nupcial e crucial para o encontro das formas reprodutivas de ninhos distintos. Se indivíduos de linhagens distintas de *A. laevigata* não acasalarem entre si devido a um assincronismo no

voo nupcial, é interessante pensar que esse evento pode ser um fator importante na determinação da especiação em *A. laevigata*.

b) A co-especiação provocada por cultivo de linhagens distintas do basidiomiceto mutualista obrigatório. As cortadeiras originaram-se há cerca de 10 milhões de anos e desenvolveram um sistema agrícola especializado em coleta de folhas frescas sobre as quais cultivam o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* (SILVA-PINHATI et al., 2004; SCHULTZ; BRADY, 2008). Este fungo apresenta-se como duas linhagens simpátricas em formigas cortadeiras (SILVA-PINHATI et al., 2004). Se cada uma das linhagens de *A. laevigata* cultivasse um grupo de fungo, seria razoável pensar no mutualismo como fator acompanhando a especiação da formiga. Nesse caso, a co-especiação poderia estar relacionada com o processo de especiação dessas formigas. A co-especiação pode ser definida como uma mudança evolutiva em duas espécies, sendo que cada alteração em uma delas exerce uma pressão seletiva sobre a outra, de modo que uma espécie evolui em resposta à outra espécie (JANZEN, 1980). Há registro na literatura que fungo mutualista pode estar envolvido no processo de especiação das formigas Attini. Schutlz et al. (2002) propuseram que o cultivo de fungos distintos por *Cyphomyrmex longiscapus* e *Cyphomyrmex muelleri* pode estar relacionado com a especiação dessas formigas.

c) Frequência de acasalamento. Pequenas diferenças no comportamento reprodutivo poderiam direcionar fêmeas de *A. laevigata* a escolher parceiros geneticamente semelhantes a elas. A análise do conteúdo da espermateca de fêmeas fecundadas seria de suma importância para investigar as que linhagens dos machos que fecundam *A. laevigata*. Se indivíduos de linhagens distintas não acasalarem entre si, a frequência de acasalamento pode estar envolvida na especiação em *A. laevigata*.

Para uma melhor compreensão da história natural dessas formigas, o objetivo do presente trabalho foi buscar evidências desses três fatores no processo de especiação em *A. laevigata*.

Material e métodos

Coleta

Foram coletadas 10 fêmeas virgens (iças) no orifício de cada ninho, com o auxílio de uma pinça para a retirada do *pellet* de fungo da cavidade infrabucal. Após o voo nupcial, procedeu-se a coleta aleatória de fêmeas fecundadas para obtenção da espermateca. As fêmeas foram armazenadas vivas em um pote de gesso umedecido com água destilada e transportadas em ambiente refrigerado.

Um total de 39 fêmeas fecundadas de *A. laevigata*, foram coletadas sendo 19 da linhagem I da região de Botucatu e 20 da linhagem II da região de Bauru. Os indivíduos testemunhas foram depositados na Coleção Entomológica do Laboratório de Evolução Molecular da Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho.

Fungo

Foram utilizados *pellets* de fungo coletados de uma iça por ninho, exceto ninho 02 (linhagem I), do qual dois *pellets* foram coletados como resultado de teste piloto (Tabela 1). As amostras foram armazenadas em etanol 100 % a -80 °C.

Tabela 1: Coleta do fungo simbiote utilizada no presente estudo

Código/ Localização	Linhagem de <i>A. laevigata</i>	Nº de <i>pellets</i> utilizado	Marcador utilizado
N 01 Botucatu	I	01	<i>EF1-α</i> ; <i>DMC1</i>
N 02 Botucatu	I	02	<i>EF1-α</i> ; <i>DMC1</i>
N 19 Botucatu	I	01	<i>EF1-α</i> ; <i>DMC1</i>
N 14 Botucatu	II	01	<i>EF1-α</i> ; <i>DMC1</i>
N 66 Bauru	II	01	<i>EF1-α</i> ; <i>DMC1</i>
N 24 Bauru	II	01	<i>EF1-α</i> ; <i>DMC1</i>
N 56 Bauru	II	01	<i>DMC1</i>
N 80 Bauru	II	01	<i>EF1-α</i> ; <i>DMC1</i>
N 85 Bauru	II	01	<i>EF1-α</i> ; <i>DMC1</i>

Genotipagem da espermateca

As fêmeas foram dissecadas para a retirada da espermateca e estocadas a seco em freezer a -80 °C. As cabeças foram armazenadas em álcool 100% e estocadas em freezer a -20° C para uma posterior identificação molecular. Com o auxílio de um microscópio estereoscópico e de

alfinete estéril, a espermateca foi perfurada e o sêmen foi coletado cuidadosamente com uma micropipeta.

Extração de DNA

O DNA foi extraído individualmente de cada *pellet* e do conteúdo de cada espermateca. A extração de DNA seguiu o protocolo de Martins et al. 2007. O material biológico foi extraído com TNEs (250 mM Tris, 2 M NaCl, 100 mM EDTA, 2,5 % SDS, pH 7,5). Nesta etapa o *pellet* de fungo foi macerado em banho de gelo seco, seguido da adição de 5 µL de proteinase K e incubação a 55 °C por 3 h. Em seguida foram adicionados 3 µL de RNase A (4 mg/mL) seguindo incubação a 37 °C por 30 min. A precipitação de proteínas foi feita com 200 µL de NaCl 5 M seguido de centrifugação por 6 min a 15000 xg. 600 µL de sobrenadante foram transferidos para um novo tubo. Posteriormente, adicionou-se ao sobrenadante 600 µL de isopropanol a 100 % seguido centrifugação por 5 min a 15000 xg. Após lavagem do precipitado com 600 µL etanol 70 % seguido de centrifugação por 6 min a 15000 xg o *pellet* foi deixado por 10 min na centrífuga a vácuo para secar. Em seguida o DNA foi hidratado com 30 µL de TE (10 mM Tris, pH 8,0 1 mM EDTA pH 8,0).

Amplificação do DNA

Fungo

As reações de PCR foram conduzidas com um volume total de 25 µL, contendo em cada reação o *Kit Pure Taq Ready-To-Go PCR Beads*, água Mili-Q autoclavada, ~10 ng DNA, 10 pmol de *primers forward* e *reverse*. Os *primers* utilizados para as amplificações são apresentados na tabela 2. O programado utilizado foi 3 min a 95 °C, seguidos de 40 ciclos de 94 °C a 25 segundos, 55-60 °C a 45 segundos e a 72 °C por 1 min, e uma extensão final de 15 min 72 °C. A temperatura de hibridização do *EF1-α* foi 55 °C e o *DMC1* 60 °C.

Conteúdo da espermateca

As reações de PCR foram conduzidas com um volume total de 30 µL, contendo em cada reação, água Mili-Q autoclavada, tampão 10 mM Tris-HCl, pH 8,3; 2.5 mM KCl (Fermentas cat # EPO402); MgCl₂ 1.5 mM (Fermentas cat # EPO402); 0.4mM dNTP mix (Fermentas cat

RO192); ~100 ng DNA, 10 pmol *primers forward* e *reverse*. Os *primers* utilizados para as ampliações são apresentados na tabela 2. O programa utilizado foi 5 min a 94 °C, seguidos de 40 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 49 °C e 2 min a 68 °C e extensão final de 15 min a 68 °C.

Os produtos das reações foram visualizados em gel de agarose 1 % em tampão TBE 1X e corados com Gel Red. Os produtos de PCR foram purificados em uma coluna de purificação utilizando o kit MN (MachereyNagel).

Tabela 2 - Iniciadores utilizados para a amplificação das regiões *EF1- α* , *DMC1* e para os lócus *Citocromo I (COI)*, *Espaçador Intergênico (IGS)*, *RNA Transportador de Leucina (Leu-tRNA)* e *Citocromo II (COII)*.

Nome do iniciador	Sequência do iniciador (5'-3')	Referência	Amostra
<i>EF1-α-F</i>	GTT GCT GTC AAC AAG ATG GAC ACT AC	Mikheyev et al., 2006	Fungo
<i>EF1-α-R</i>	GCC TTG ATG ATA CCA GTC TCG ACA CG	Mikheyev et al., 2006	Fungo
<i>DMC1-F</i>	AAG CTG CAC ACA AAA TCT TGG TTA G	Mikheyev et al., 2006	Fungo
<i>DMC1-R</i>	GTC AAT GTC AAG AGA TCG GAT ACA C	Mikheyev et al., 2006	Fungo
ANT-F	ATT CAT TCT TAT CTT GAA ATA TTA TTT C	Martins, et al., 2007	Conteúdo da espermateca
ANT-R	TTC ATA AGT TCA GTA TCA TTG GTG	Martins, et al., 2007	Conteúdo da espermateca

Clonagem e sequenciamento

Os *pellets* de fungos e o conteúdo da espermateca não foram sequenciados de forma direta porque os resultados iniciais do sequenciamento direto apresentaram ambiguidade. Portanto, os fragmentos purificados das amostras de fungo e do conteúdo da espermateca foram ligados ao vetor pGEM-T (Promega cat # A3600). Para cada reação de ligação foram utilizados 35 ng do produto de PCR purificado, três unidades de ligase T4 DNA, tampão 10X e 50 ng plasmídeo pGEM-T. A reação foi incubada overnight 4 °C. Os fragmentos purificados foram ligados ao vetor pGEM-T (Promega), transfectados em *Escherichia coli* DH10B por choque térmico e purificado por miniprep e sequenciado com o *primer forward* do vetor. As reações de sequenciamento foram conduzidas com um volume total de 10 μ L. Cada reação foi realizada com 700 ng de DNA, 6 pmol de *primers*, 1 μ L BigDye (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA, cat # 4336919), 2 μ L tampão (200 mM Tris.HCl, 5 mM MgCl₂) e água Mili-Q

autoclavada. O programa utilizado foi 96 °C a 2 min seguidos de 28 ciclos de 96 °C a 46 seg, 50 °C a 30 seg e 60 °C a 4 min. As amostras foram sequenciadas em um sequenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems).

Análise das sequencias

Após a etapa de pré-processamento feita com o sistema de geração de *pipelines* Egene (DURHAM et al., 2005), as sequências foram analisadas nos programas BIOEDIT (HALL, 1999) e alinhados com CLUSTALW (Thompson et al., 1994) A rede de haplótipos foi calculada através por “Median-Joining Network” através do programa NETWORK 4.5.0.0 (POLZIN et al., 2003) e DnaSP (LIBRADO; ROZAS, 2009).

Marcadores microssatélites

Para amplificação do DNA presente no conteúdo das espermatecas, as reações foram preparadas com volume final de 15 µL, contendo 25 ng de DNA genômico, água ultrapura, 1,5 mM de MgCl₂, 125 µM de dNTP, 1U de taq DNA polimerase (Fermentas), tampão da enzima 0,66 x, 2 pmol de *primer forward*, 8 pmol de *primer reverse*, 8 pmol de *primer* M13 contendo uma marca de fluorescência (FAM ou NED). Foram testados os *primers* Alae2, Alae 5, Alae 9, Alae 11, Alae 16 e Alae 24 desenvolvidos por Kakazu et al. (em preparação). O programa utilizado para amplificação do fragmento contendo a região SSR foi de 95 °C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 44-56 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos. Um segundo conjunto de ciclos foi feito para a incorporação da cauda M13 (12 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 53 °C por 45 segundos, 72 °C por 45 segundos e extensão final de 72 °C por 20 minutos). Cada locus foi amplificado com temperatura de hibridização diferente variando de 42 a 52 °C. A análise de fragmentos foi realizada em um sequenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems) no Laboratório de Evolução Molecular da UNESP - Rio Claro.

Resultados

a) Temporalidade do voo nupcial de indivíduos de linhagens distintas

No presente estudo, a revoada de *A. laevigata* foi acompanhada por três anos consecutivos, com anotações diárias do comportamento reprodutivo (Tabela 3). Durante o acompanhamento do comportamento em campo, foram observados três eventos: pré-revoada, revoada principal e revoada secundária.

A pré-revoada foi caracterizada pela presença de diversos olheiros completamente limpos, com orifícios alargados, intenso forrageamento, agitação e agressividade das operárias. Esse evento também foi marcado pela saída de aproximadamente 15 alados por ninho com predominância de machos. Os alados surgiam na superfície, caminharam, movimentaram as asas e alguns voaram e outros retornaram para o interior do ninho. A revoada principal foi caracterizada pela saída maciça de alados seguida do voo nupcial. Na revoada secundária, houve liberação dos alados em pequena quantidade, também com voo nupcial e logo após a revoada principal.

Apenas dois ninhos revoaram anos consecutivos. Em Bauru, no dia 16 de novembro de 2011, foi observada uma tentativa de revoada sem sucesso em 18 ninhos (Tabela 3). Iças e bitus saíram e caminharam na superfície do ninho por cerca de 5 horas ensaiando voo, mas, possivelmente porque havia rajadas de vento, retornaram para o interior do ninho. As formigas estavam extremamente agitadas e agressivas e exalavam um odor muito forte característico da colônia. No dia seguinte, a revoada foi iniciada com a saída maciça de bitus a partir das 14 h. Mais tarde, aproximadamente às 15 h, surgiram as iças que, em seguida, voaram acompanhando a direção do vento. O voo cessou aproximadamente às 17 h.

As observações em campo mostraram um sincronismo e assincronismo no voo nupcial entre várias colônias de espécies do gênero *Atta*. As espécies apresentaram horários diferenciados de voo nupcial. *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta capiguara* e *A. laevigata* revoaram pela tarde enquanto *Atta bispaherica* revoou pela manhã. Observou-se nas duas aéreas de estudo um assincronismo no voo nupcial dentro de cada linhagem de *A. laevigata*. Por exemplo, nem todos os ninhos da linhagem I observados revoaram no mesmo dia, o mesmo acontecendo com os ninhos da linhagem II. Esse assincronismo também foi observado em *A. sexdens rubropilosa*. Por outro lado, alguns ninhos da linhagem I e II em Botucatu revoaram no mesmo dia e no mesmo horário (Tabela 3).

Nas regiões de Botucatu e de Bauru, foram marcados 84 ninhos de *A. laevigata*, mas observados 30, oito deles na linhagem I e 22 na linhagem II. Os resultados da observação dos

ninhos estão descritos na tabela 3. Em Botucatu, foram observados três eventos de voo nupcial em sincronismo entre ninhos de linhagens distintas: duas revoadas e uma pré-revoada (amarelo). Foram também observados quatro eventos de assincronismo entre linhagens distintas (verde): uma revoada, duas pré-revoadas e uma revoada secundária. Portanto, o sincronismo no voo nupcial entre ninhos simpátricos de linhagens distintas ocorreu em 43% das observações (três em sete eventos observados). A distância mínima entre esses ninhos era 1,29 km e a máxima de 1,86 Km.

Em Botucatu, em ninhos da linhagem I, foi observado um maior número de eventos de voo nupcial, somando sete eventos em cinco ninhos, em 2009 e 2010. Cinco desses eventos envolveram mais de um ninho, ou seja, foram sincrônicos. Dois desses eventos envolveram apenas um ninho, ou seja, foram assincrônicos. Desta forma, o assincronismo no voo nupcial entre ninhos simpátricos na mesma linhagem I ocorreu em 29 % das observações (dois em sete eventos observados). A distância entre esses ninhos era 0,043 km e 0,273 km. Já na linhagem II, ocorreu apenas um evento sincrônico (33 % das observações) e dois eventos assincrônicos. A distância entre esses ninhos era 0,012 km e 1,92 km.

Em Bauru, em 22 ninhos da linhagem II, foram observados voos nupciais em três eventos em 2011. Um desses eventos foi assincrônico e os outros dois foram sincrônicos. Desta forma, o sincronismo no voo nupcial entre ninhos simpátricos na mesma linhagem II ocorreu em 67 % das observações (dois em três eventos observados). A distância entre esses ninhos era 0,010 km e 2,10 Km.

Tabela 3 - Observação do comportamento reprodutivo das formigas em **Botucatu** e **Bauru**. P = pré-revoada; R = revoada; S = revoada secundária; T = tentativa de revoada sem sucesso; espaços não preenchidos: ausência de P, R, S e T; zero: ninhos não observados. Datas marcadas em amarelo indicam a ocorrência de sincronismo de voo nupcial em ninhos simpátricos de duas linhagens distintas. Datas marcadas em verde indicam eventos de assincronismo voo nupcial em ninhos simpátricos de duas linhagens distintas. * indica data de coleta de fêmeas fecundadas utilizadas para genotipagem do conteúdo das espermatecas.

Ninho		Data da observação - Botucatu							Data da observação - Bauru			
		2009			2010				2011			
		11.09	21.10	10.11	28.10	31.10	01.11*	07.11	17.11	27.10	16.11	17.11*
L I N H A G E M I	N 01	P	R	S	P	P	P	R	0	0	0	0
	N 02		R	S					0	0	0	0
	N 06					P	R		0	0	0	0
	N 19		R						0	0	0	0
	N 74				P				0	0	0	0
L I N H A G E M II	N 14		R				R		0	0	0	0
	N 29				P				0	0	0	0
	N 30				P				0	0	0	0
	N 24	0	0	0	0	0	0	0			T	R
	N 26	0	0	0	0	0	0	0				
	N 27	0	0	0	0	0	0	0			T	R
	N 28	0	0	0	0	0	0	0		R	T	S
	N 46	0	0	0	0	0	0	0			T	R
	N 55	0	0	0	0	0	0	0	R			
	N 56	0	0	0	0	0	0	0		R	T	S
	N 66	0	0	0	0	0	0	0			T	R
	N 67	0	0	0	0	0	0	0				P
	N 79	0	0	0	0	0	0	0			T	R
	N 80	0	0	0	0	0	0	0		P	T	R
	N 81	0	0	0	0	0	0	0		P	T	R
	N 82	0	0	0	0	0	0	0			T	R
	N 83	0	0	0	0	0	0	0		R		
	N 84	0	0	0	0	0	0	0			T	R
	N 85	0	0	0	0	0	0	0		R	T	S
	N 86	0	0	0	0	0	0	0			T	R
	N 87	0	0	0	0	0	0	0			T	R
	N 90	0	0	0	0	0	0	0			T	R
	N 91	0	0	0	0	0	0	0		P	T	R
	N 92	0	0	0	0	0	0	0			T	R
	N93	0	0	0	0	0	0	0			T	R

Os resultados apresentados na tabela 3 permitiram concluir que a ocorrência de sincronismo de voo nupcial entre linhagens distintas (43 %) não pode ser considerada diferente daquelas ocorrendo dentro de cada uma das linhagens (71 ou 67 %). Portanto, não há assincronismo no voo nupcial entre as linhagens de *A. laevigata*.

b) Co-especiação entre os mutualistas formiga e fungo

Foram analisadas nove amostras de fungos, quatro da região de Botucatu e cinco da região de Bauru. Um total de 43 sequências da região *EF1- α* foi obtido a partir de *pellets* coletados de uma içá por ninho, sendo três ninhos da linhagem I e cinco ninhos da linhagem II. Uma exceção ocorreu no ninho 02 (linhagem I), do qual dois *pellets* foram coletados, um por içá (Tabela 1). Da região *DMC1*, 85 sequências foram obtidas a partir de *pellets* coletados de uma içá por ninho, sendo três ninhos da linhagem I e seis ninhos da linhagem II (Tabela 1). O comprimento final das sequências obtidas, após o alinhamento e cortes das extremidades, foi de 415 pares de bases para o gene *EF1- α* e 400 pares de bases para gene *DMC1*.

A figura 1 mostra que quatro haplótipos (8, 12, 19, 21) da região *EF1- α* foram encontrados somente em fungos cultivados pela linhagem I das formigas e 23 haplótipos (1-7, 9-11, 13-17, 20, 22-28) foram encontrados somente em fungos cultivados pela linhagem II das formigas. O haplótipo 18 foi encontrado em fungos cultivados pelas duas linhagens de formigas. Três grupos de fungos foram encontrados (1A, 1B e 1C), cada um deles contendo, respectivamente, os haplótipos ancestrais H_4, H_13 e H_18, que são mais frequentes e centros de divergência dos demais haplótipos mais recentes. Formigas da linhagem II cultivam fungos dos três grupos, enquanto formigas da linhagem I cultivam fungos dos grupos 1A e 1C.

A figura 2 mostra que os haplótipos 32 a 35 da região *DMC1* foram exclusivamente encontrados em fungos cultivados pela linhagem I das formigas. E que 26 haplótipos (3,4, 7-10, 12-31) foram encontrados em fungos cultivados apenas pela linhagem II das formigas. Os haplótipos 1, 2, 5, 6 e 11 foram encontrados em fungos cultivados pelas duas linhagens de formigas. Neste caso, foram também caracterizados três grupos de fungos (2A, 2B e 2C), cada um deles cultivado por ambas as linhagens de formigas. Cada grupo apresentou um haplótipo ancestral: H_11, H_7 e H_1.

Em resumo, os resultados da rede de haplótipos para a região *EF1- α* demonstram que as formigas, sejam da linhagem I ou da linhagem II, podem cultivar fungos no mesmo grupo gênico, inclusive fungos compartilhando o mesmo haplótipo. O mesmo pode ser concluído a partir da análise da região *DMC1*. Portanto, não foram observadas diferenças significativas entre as linhagens de formiga com relação ao tipo de fungo mutualista cultivado.

Figura 1 - Rede de haplótipos para a região *EF1- α* , representados por círculos de tamanhos e áreas coloridas proporcionais às frequências haplotípicas encontradas nas linhagens I e II de *A. laevigata*. Os pontos vermelhos representam haplótipos preditos não amostrados. Os números em vermelho representam os passos mutacionais. Nota-se que o haplótipo H_18 foi encontrado em fungos cultivados pelas duas linhagens de formigas.

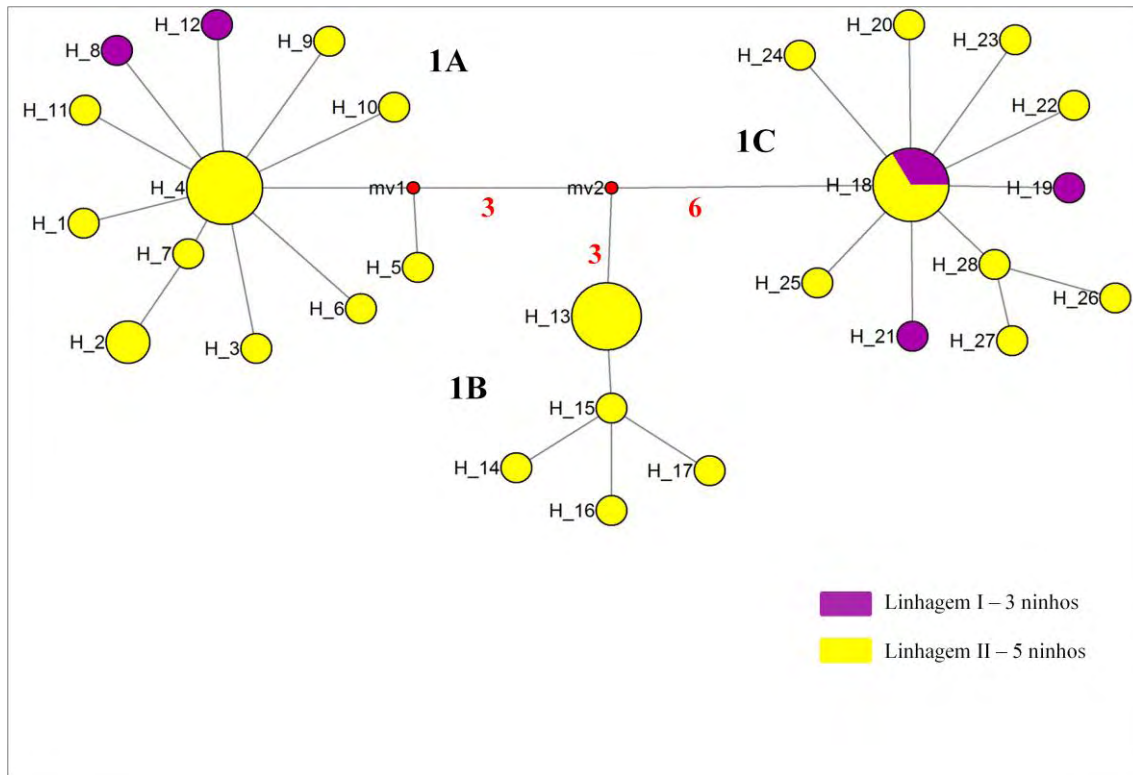
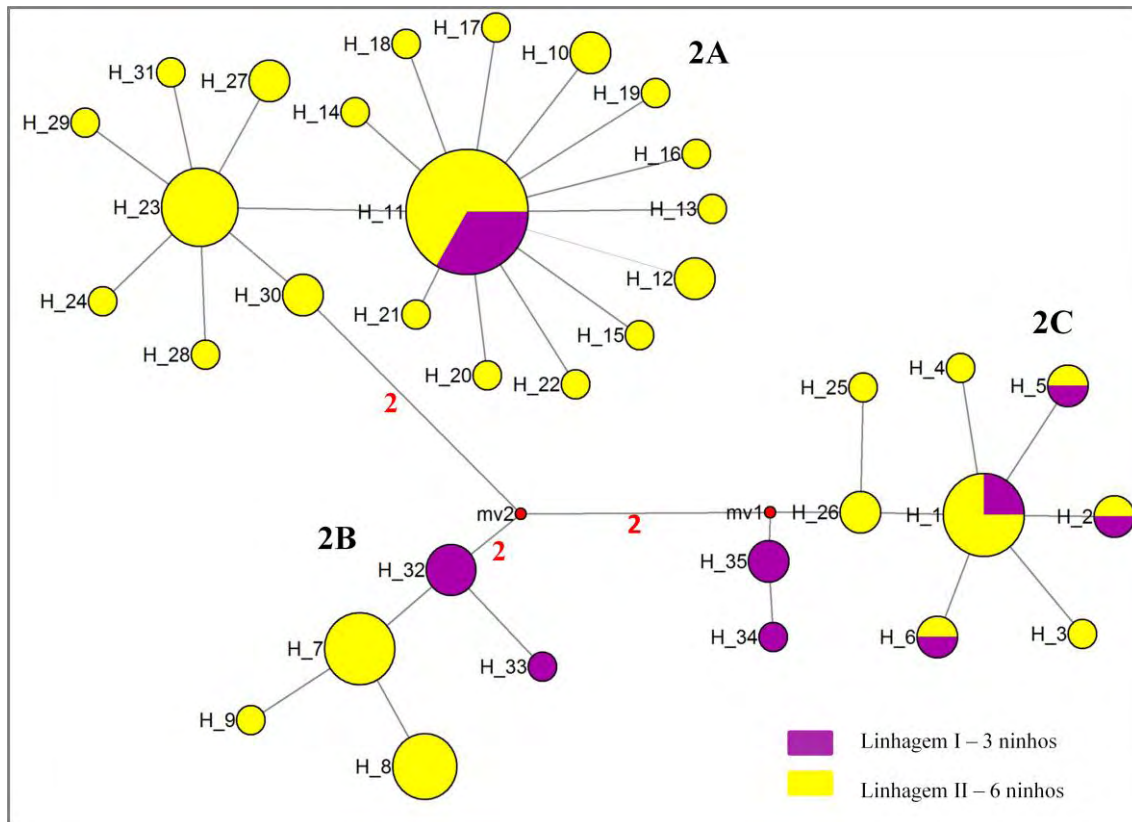


Figura 2 - Rede de haplótipos para a região *DMC1*, representados por círculos de tamanhos e áreas coloridas proporcionais às frequências haplotípicas encontradas nas linhagens I e II de *A. laevigata*. Os pontos vermelhos representam haplótipos preditos não amostrados. Os números em vermelho representam os passos mutacionais. Nota-se que os haplótipos 1, 2, 5, 6 e 11 foram encontrados em fungos cultivados pelas duas linhagens de formigas.



Os dados apresentados nas figuras 1 e 2 permitiram uma averiguação adicional, que foi o estudo da diversidade de cepas do fungo *L. gongylophorus* associadas a cada ninho da formiga *A. laevigata*.

Para facilitar a visualização da diversidade de haplótipos encontrada em cada ninho, marcamos com diferentes cores os haplótipos das figuras 1 e 2, utilizando uma cor para cada um dos nove ninhos analisados.

A figura 3 mostra que em iças dos ninhos 14 e 66 foi encontrada grande diversidade fúngica, com seis e 11 haplótipos de *EF1-α*, respectivamente. Os haplótipos dos *pellets* da iça do ninho 14 estiveram distribuídos nos grupos 1B e 1C e os haplótipos do *pellet* da iça do ninho 66 nos grupos 1A e 1C. Os ninhos 24 e 85 também apresentaram iças carregando haplótipos em diferentes grupos. O ninho 2 do qual dois *pellets* foram usados apresentou apenas três haplótipos distintos para esse marcador.

A figura 4 mostra que a iá do ninho 14 apresentou 13 haplótipos de *DMC1* distribuídos nos grupos 2A e 2B e iá do ninho 56 apresentou oito haplótipos nos grupos 2A e 2C. Iás dos ninhos 1 e 2 também apresentaram haplótipos em diferentes grupos. A análise de dois *pellets* de iás do ninho 2 mostrou sete haplótipos distribuídos nos grupos 2A e 2C.

Portanto, em sete dos nove ninhos analisados com os marcadores *EF1-é* ou *DMC1* foram encontradas iás com *pellets* de *L. gongylophorus* em mais de um grupo. Iás de ambas as linhagens I e II carregaram em seus *pellets* mais de um grupo de fungo mutualista.

Figura 3 - Análise de haplótipos para região *EF1- α* formando três grupos. O diâmetro do círculo do haplótipo é proporcional à sua frequência. Os pontos vermelhos representam haplótipos preditos não amostrados. Número amostral: Linhagem I – 3 ninhos; linhagem II – 5 ninhos.

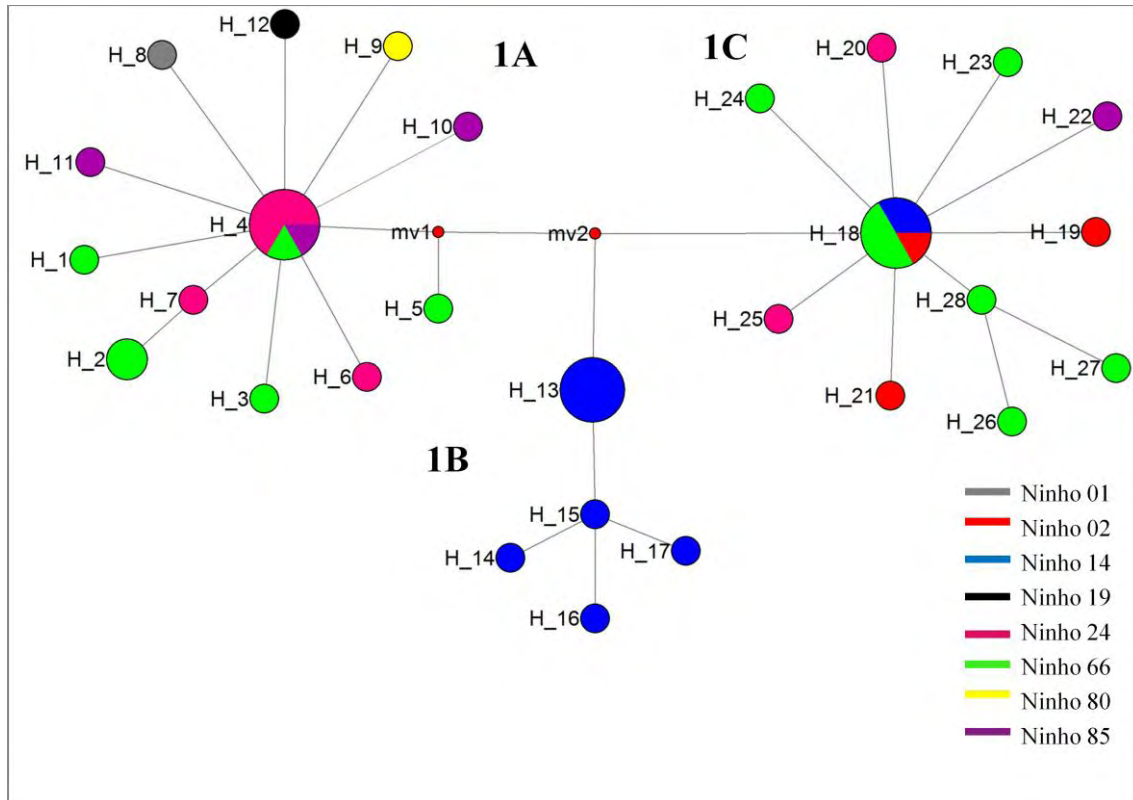
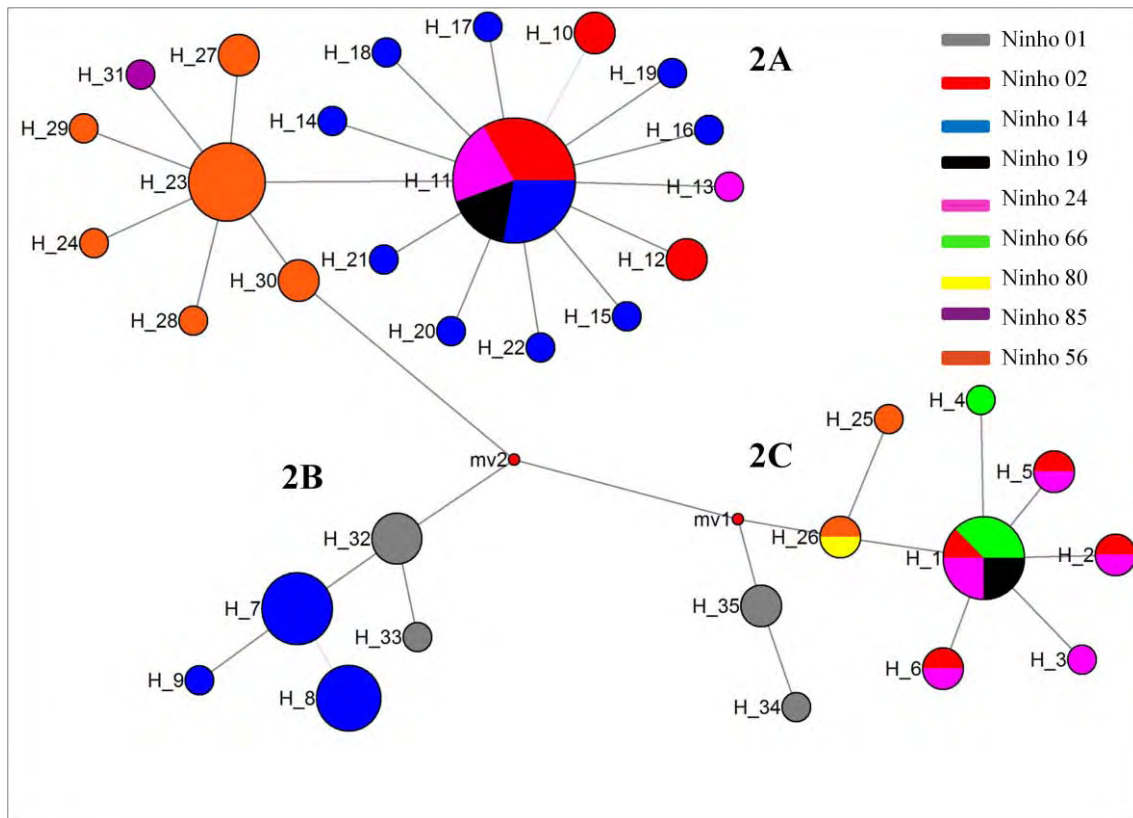


Figura 4 - Análise de haplótipos para região *DMC1* formando três grupos. O diâmetro do círculo do haplótipo é proporcional a sua frequência. Os pontos vermelhos representam haplótipos preditos não amostrados. Número amostral: Linhagem I – 3 ninhos; linhagem II – 6 ninhos



c) Frequência de acasalamento

Marcador mitocondrial

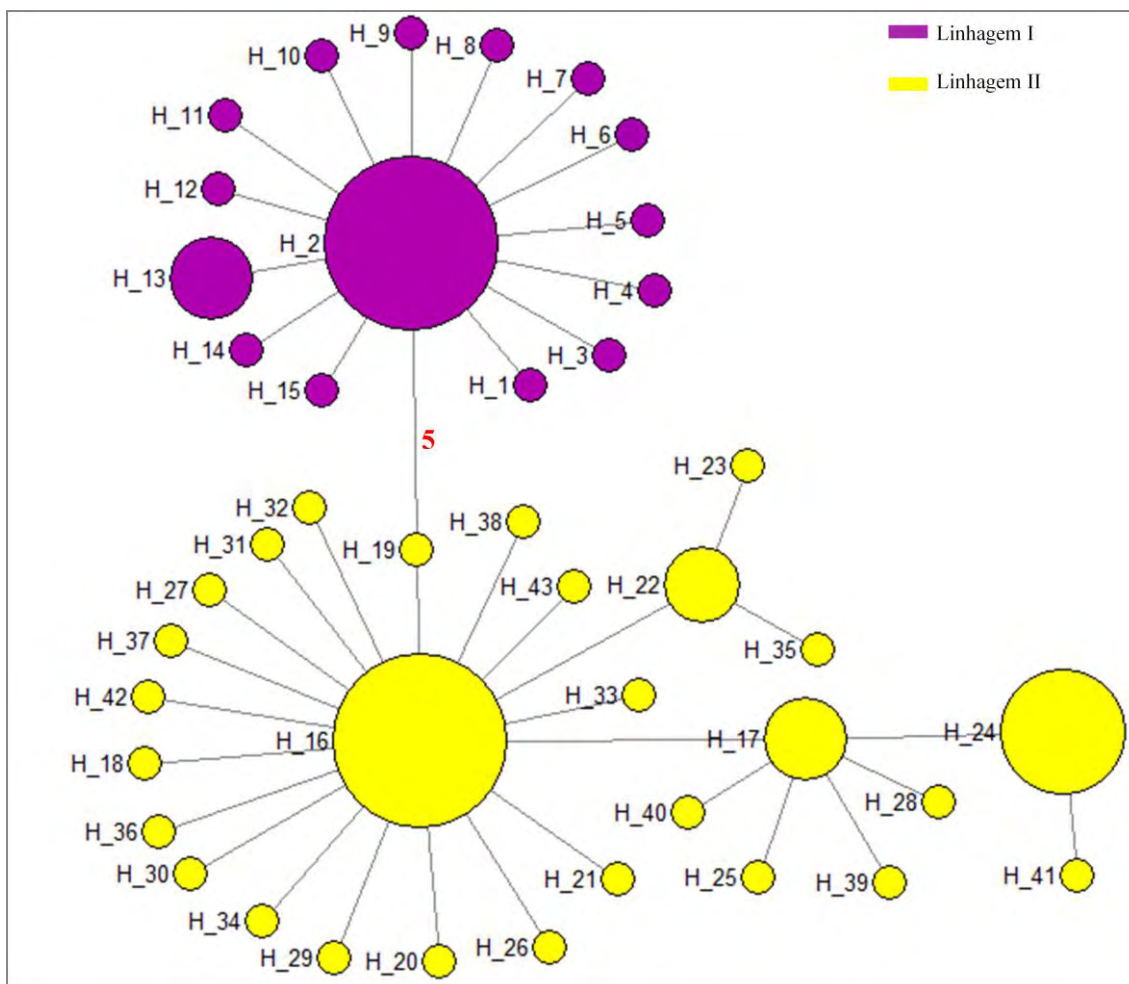
A cabeça de cada fêmea fecundada foi sequenciada e comparada com as sequências de indivíduos de ambas as linhagens. O conteúdo das espermatecas das fêmeas fecundadas foi genotipado, resultando 154 sequências com 456 pares de base da região que compreende os genes mitocondriais *COI*, *espaçador intergênico (IGS)*, *Leu-tRNA* e *COII*. O *espaçador intergênico (IGS)* distinguiu as duas linhagens de *A. laevigata*, mas a região foi excluída porque estava atrapalhando a análise.

Das 39 amostras processadas para o marcador mitocondrial, obtivemos resultados apenas de 18 indivíduos, sendo sete da linhagem I de Botucatu e 11 da linhagem II de Bauru. Foram geradas 154 sequências contendo 43 haplótipos distintos. A linhagem I foi representada pelos

haplótipos 1 a 15 e a linhagem II foi representada pelos haplótipos 16 a 43. Os haplótipos H_2, H_16 e H_24 se destacam pela alta frequência e provavelmente são ancestrais, sendo os demais haplótipos mais recentes.

Não foram encontradas sequências mitocondriais de espermatozoides da linhagem II em espermatecas de fêmeas da linhagem I e vice versa. Portanto, os dados mitocondriais mostram que não há evidências de acasalamento entre indivíduos de linhagens distintas. Uma média de cinco haplótipos mitocondriais foi encontrada por fêmea fecundada.

Figura 5 - Análise de haplótipos para região que compreende os genes mitocondriais *COI*, *Leu-tRNA* e *COII* de espermatozoides. O diâmetro do círculo é proporcional à frequência do haplótipo. O número em vermelho representa os passos mutacionais. Número amostral: Linhagem I – 7 fêmeas (85E; 89E 90E; 91E; 95E; 105E; 123E); linhagem II – 11 fêmeas (38E; 40E; 42E; 60E; 65E; 70E; 72E; 73E; 77E; 78E; 80E).



Microsatélites

O conteúdo das espermatecas de 19 içás da linhagem I de Botucatu e 20 da linhagem II de Bauru foi genotipado para seis loci de microsatélites. Apenas o locus *Alae16* foi monomórfico, enquanto os cinco loci restantes apresentaram 26 alelos na linhagem I e 53 na linhagem II.

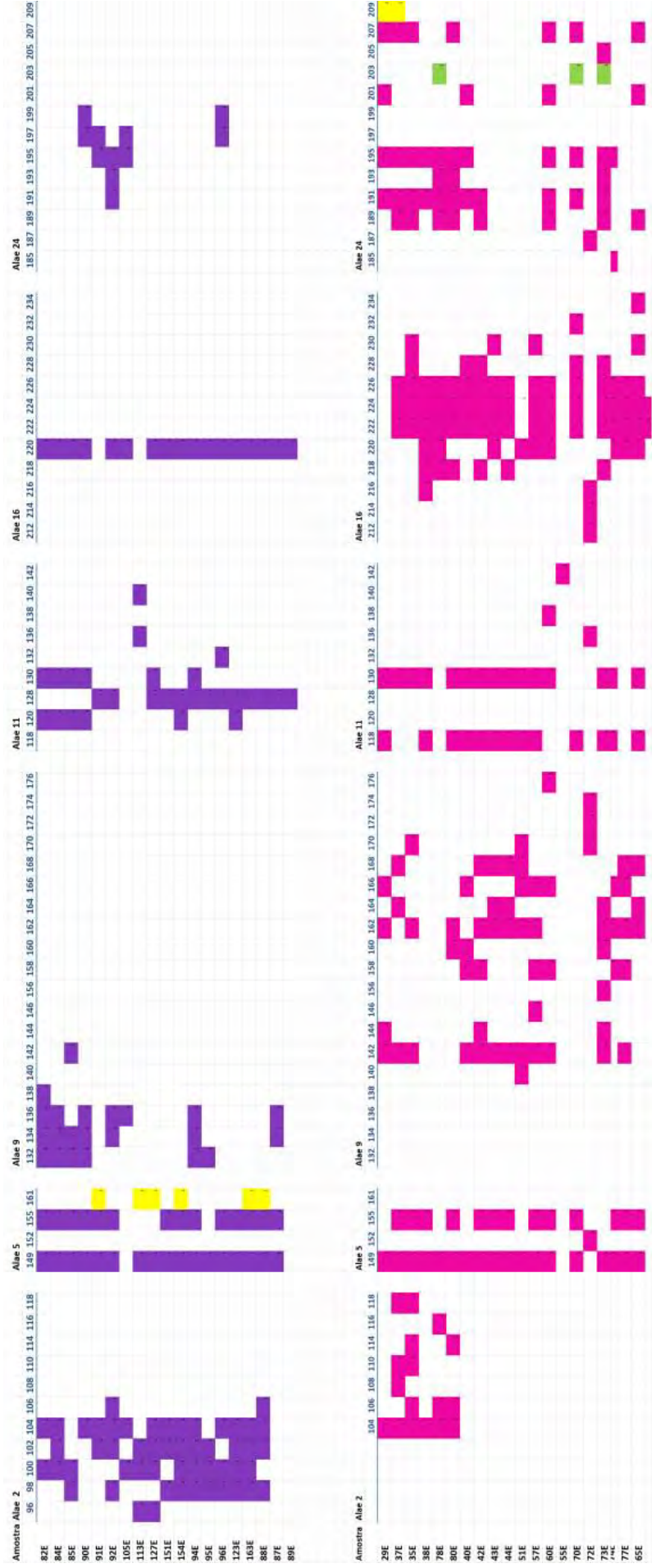
Kakazu et al. (em preparação) definiram alguns alelos exclusivos para cada linhagem de *A. laevigata*, obtidos a partir de operárias de ambas as linhagens coletadas nas regiões de Botucatu e Bauru. A figura 6 mostra quatro a seis machos fecundando fêmeas de *A. laevigata*.

Nesse estudo, o locus *Alae5-161* foi encontrado exclusivamente em operárias da linhagem I e a figura 6 mostra que o locus *Alae5-161* foi encontrado apenas em espermatecas

de seis fêmeas da linhagem I. O locus Alae24-209 foi encontrado por Kakazu exclusivamente em operárias da linhagem II e a figura 6 mostra que o locus Alae24-209 foi encontrado apenas em espermatecas de duas fêmeas da linhagem II. Estes dados reforçam aqueles obtidos com os dados mitocondriais indicando de que machos de uma linhagem inseminam fêmeas da mesma linhagem.

No entanto, o locus Alae24-203, que foi encontrado somente em operárias da linhagem I (Kakazu, et al., em preparação), foi encontrado em espermatecas de três fêmeas (70E, 73E, 78E) da linhagem II, sugerindo a inseminação de fêmeas da linhagem II por machos da linhagem I.

Figura 6 - Microsatélites em espermatozoides da espermateca de 19 iças da linhagem I (26 alelos, roxo) de Botucatu e 20 iças da linhagem II (53 alelos, rosa) de Bauru. Seis loci foram analisados: Alae2, 5, 9, 11, 16 e 24. Cada coluna representa um determinado alelo e cada linha o genótipo encontrado na espermateca. Em amarelo, os alelos exclusivos de cada linhagem; em verde, o alelo exclusivo da linhagem I encontrado na linhagem II.



Discussão

Explicar como a especiação ocorre é algo extremamente difícil. A especiação pode ocorrer em diferentes organismos de formas diferentes. Em *A. laevigata*, averiguamos alguns fatores que poderiam estar relacionados ao processo de especiação.

Temporalidade do voo nupcial

O primeiro fator avaliado foi à temporalidade do voo nupcial de indivíduos de linhagens distintas. As observações realizadas durante o evento da pré-revoada corroboram as observações de Autuori (1941).

As observações do comportamento reprodutivo verificado neste estudo mostram que nem todos os ninhos adultos de *A. laevigata* revoam em anos consecutivos. Os ninhos que não revoaram mantiveram sua atividade diária normal sem aumento dos orifícios. Também foi observado assincronismo do voo nupcial dentro de cada linhagem. Estes dois casos podem estar relacionados às condições fisiológicas específicas de cada ninho ou a incompleta maturação sexual dos alados. Contudo, faltam estudos que possam explicar tal comportamento.

A revoada ocorre sob condições climáticas específicas que funcionam como o termômetro biológico para liberação das castas reprodutivas (MARINHO et al, 2011). A tentativa de voo sem sucesso observada em Bauru possivelmente foi devido a fortes ventos, o que impediu o voo nupcial. Isso poder ter ocorrido, pois rajadas de vento dificultam a orientação dos parceiros no momento do acasalamento (PEREIRA-DA-SILVA, 1975; WILSON, 1990). A interrupção do voo nupcial de *A. laevigata* causada por mudanças climáticas repentinas também foi observada por Pereira-Da-Silva (1975).

Nossos resultados mostram que não há quebra de sincronismo do voo nupcial de indivíduos em duas linhagens distintas de *A. laevigata*. Portanto, a especiação em *A. laevigata* não está relacionada com diferenças na temporalidade do voo nupcial.

Co-especiação entre formigas e fungo mutualista

O segundo fator analisado foi a co-especiação, que seria caracterizada se linhagens distintas das formigas cultivassem grupos distintos do fungo basidiomiceto mutualista obrigatório. Os resultados mostraram que as duas linhagens de formigas podem cultivar

fungos muito semelhantes geneticamente. As análises pelo método *median-joining* (Figuras 1 e 2) mostram que há três grupos de fungos e que não houve evidências de que formigas das linhagens I ou II cultivam um determinado grupo de fungo preferencialmente.

Estes dados também indicam que as formigas *A. laevigata* apresentam grande plasticidade para cultivar diferentes grupos de fungo *L. gongylophorus*, uma vez que um único ninho de formigas apresentou fungos contendo 13 haplótipos distintos de *DMC1*. Isso demonstra uma alta variação genética encontrada em *pellets* de fungo de *A. laevigata*. Essa variabilidade pode beneficiar o fungo mutualista, aumentando a resistência às doenças e parasitas (LACERDA, 2009). Fatores responsáveis por essa variação genética podem ser mutação, seleção ou dispersão (DOHERTY et al., 2003).

Diferentemente dos resultados aqui amostrados, estudos recentes de Mueller et al. (2010) demonstraram não haver variação genética em *pellets* de fungo em *Atta texana* e *Atta cephalotes* vivendo em Austin, no Texas. Mesmo usando um marcador que evolui muito rapidamente, os microssatélites, estes autores encontraram grande homogeneidade genética nos *pellets*.

Estes resultados indicam que dentro do gênero *Atta* é possível encontrar iças carregando *pellets* de fungo sem variação genética, no Norte, e *pellets* com alta variabilidade genética no Sul da América. É possível que essas diferenças sejam função da baixa diversidade de *L. gongylophorus* no Norte comparada com a diversidade ao Sul.

Frequência no acasalamento

O terceiro fator analisado foi se haveria preferência de acasalamento entre indivíduos pertencentes à mesma linhagem de *A. laevigata* em relação ao acasalamento entre indivíduos de linhagens distintas.

O múltiplo acasalamento das rainhas do gênero *Atta* é um dos fatores responsáveis pela longevidade das colônias (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Diferentes trabalhos mostram que uma fêmea pode ser fecundada por dois a oito machos (KERR, 1961; FJERDINGSTAD; BOOMSMA, 1997; BAER et al., 2006; EVISON; HUGHES, 2011). Em *A. sexdens* os machos maiores acumulam mais espermatozóides do que os menores (KERR 1961). Se o mesmo tivesse ocorrido em *A. laevigata*, os machos da linhagem I apresentariam um número maior de espermatozóides porque são maiores do que os machos da linhagem II (BEZERRA et al., submetido). Isto poderia ser uma vantagem na escolha do parceiro porque a fêmea armazenaria mais espermatozóides.

Os resultados da figura 5 são consistentes com a escolha dos parceiros dentro de uma mesma linhagem de *A. laevigata*, uma vez que a análise de 154 sequências mitocondriais contendo 43 haplótipos distintos não detectou evidências de acasalamento entre indivíduos de linhagens distintas. Estes dados também concordam com os aqueles obtidos com os alelos exclusivos Alae5-161 e Alae24-209 (Figura 6), que são condizentes com o isolamento reprodutivo de cada uma das linhagens de *A. laevigata*.

Análises de quatro loci mitocondriais e seis loci microssatélites mostraram que cada fêmea em uma das linhagens é fecundada por um a seis machos da mesma linhagem. Considerando que dois machos carregando o mesmo genótipo podem fecundar a mesma fêmea, os números estimados de machos encontrados no presente estudo resultaram no número mínimo de fecundações por fêmea.

No entanto, a figura 6 mostra que o locus Alae24-203, definido como exclusivo para a linhagem I, foi encontrado em três fêmeas (70E, 73E e 78E) da linhagem II. Os marcadores mitocondriais não confirmam esses dados, pois não foi encontrado qualquer vestígio de inseminação dessas fêmeas da linhagem II por machos da linhagem I com base na análise de 15 haplótipos em 57 sequências mitocondriais nas três espermatecas analisadas. Talvez os alelos tomados como exclusivos não sejam realmente exclusivos de cada linhagem, mas sim alelos raros. A tomada de alelos raros como exclusivos pode ter sido em razão do viés causado pelo baixo número amostral, que foi de 30 indivíduos em Kakazu et al. (em preparação).

Desta forma, o conjunto de nossos resultados sugere haver frequência de acasalamento entre indivíduos pertencentes à mesma linhagem.

Fatores envolvidos com a especiação em *Atta laevigata*

Os resultados aqui apresentados foram satisfatórios para mostrar que a causa do rompimento do pool gênico mitocondrial em *A. laevigata* não está relacionada com os eventos de sincronismo no voo nupcial ou com a especialização no cultivo de grupos distintos do fungo mutualista.

No entanto, há forte evidência de que o rompimento do pool gênico esteja relacionado às frequências sexuais, uma vez que indivíduos das linhagens distintas não acasalam entre si. Talvez, a frequência possa ser explicada através do mecanismo chave-fechadura, uma vez que há diferenças morfológicas na genitália dos machos de linhagens distintas de *A. laevigata* (BEZERRA et al., submetido). Desta forma, é possível que somente os machos de uma

determinada linhagem sejam capazes de fornecer a chave correta para encaixar na fechadura da fêmea desta mesma linhagem.

Assim, um cenário possível é que as diferenças morfológicas encontradas nas genitálias dos machos contribuíssem para as frequências de acasalamento, levando a um isolamento reprodutivo pré-zigótico e contribuindo para o processo de especiação em *A. laevigata*.

Conclusão

A congruência entre os marcadores morfológicos e mitocondriais sugere que as duas linhagens simpátricas de *A. laevigata* estão reprodutivamente isoladas. Indivíduos simpátricos de linhagens distintas podem realizar o voo nupcial simultaneamente, mas não se acasalam entre si, provavelmente devido a diferenças na genitália masculina. Ninhos de ambas as linhagens de *A. laevigata* contêm o mesmo fungo mutualista *L. gongylophorus* em três grupos gênicos distintos. Portanto, o mutualismo entre as formigas e o fungo não acompanha o processo de especiação em *A. laevigata*.

REFERÊNCIAS

- AUTUORI, M. Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp.) (Hymenoptera-Formicidae). I. Evolução do sauveiro (*Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908). **Arq. Inst. Biol.**, v.12, p. 197-228, 1941.
- BAER, B. Male reproductive investment and queen mating-frequency in fungus-growing ants. **Behavioral Ecology**, v. 15, n. 3, p. 426-432, 2004.
- BERLOCHER, Stewart H; FEDER, Jeffrey L. Sympatric speciation in phytophagous insects: moving beyond controversy? **Annual Review of Entomology**, v. 47, p. 773-815, 2002.
- COYNE, J. A.; PRICE, T. D. LITTLE EVIDENCE FOR SYMPATRIC SPECIATION. **Evolution**, v. 54, n. 6, p. 2166-2171, 2000.
- CROW, K. D; MUNEHARA, H.; BERNARDI, G. Sympatric speciation in a genus of marine reef fishes. **Molecular ecology**, v. 19, n. 10, p. 2089-105, 2010.
- DOHERTY, K. R; ZWEIFEL, E. W; ELDE, N. C.; MCKONE, M. J. ZWEIFEL, S. G. Random amplified polymorphic DNA markers reveal genetic variation in the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. **Mycologia**, v. 95, n. 1, p. 19-23, 2003.
- DURHAM, A. M.; KASHIWABARA, A. Y.; MATSUNAGA, F. T.; AHAGON, P. H.; RAINONE, F.; VARUZZA, L.; GRUBER, A. EGene: a configurable pipeline generation system for automated sequence analysis. **Bioinformatics**, Oxford, v. 21, n. 12, p. 2812-2813, jun. 2005.
- ELMER, K. R; MEYER, A. Sympatric speciation without borders? **Molecular ecology**, v. 19, n. 10, p. 1991-3, 2010.
- EVISON, S. E. F.; HUGHES, W. O H. Genetic caste polymorphism and the evolution of polyandry in *Atta* leaf-cutting ants. **Die Naturwissenschaften**, v. 98, n. 8, p. 643-9, 2011.
- FJERDINGSTAD EJ, BOOMSMA J.J. Variation in size and sperm content of sexuals in the leafcutter ant *Atta colombica*. **Insectes Soc.**, v. 44, p. 209-218, 1997.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symp. Ser.**, Oxford, v. 41, p. 95-98, 1999.
- HARRISON, R. G. The language of speciation. **Evolution; international journal of organic evolution**, v. 66, n. 12, p. 3643-57, 2012.
- HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The Ants**. Massachusetts: Belknap Press of Harvard University, 1990. 732p.
- JANZEN, D. H. Coevolution. **Evolution**, v. 34, n.3, p. 611-612, 1980.
- KERR, W. E. Acasalamento de rainhas com vários machos em duas espécies da Tribo Atinni (Hymenoptera: Formicoidea). **Rev. Brasil. Biol.**, v. 21, n.1, p. 45-48, 1961.

LACERDA, F. G. Mecanismos de defesa em insetos sociais contra Patógenos. **Revista Educação, Meio Ambiente e Saúde**, v.4, n.1, p. 31-50, 2009.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, n. 25, p.1451-145, 2009.

MARINHO, C. G.S.; OLIVEIRA, M. A.; ARAUJO, M. S.; RIBEIRO, M. M. R. R.; DELLA LUCIA, M. T. C. Voo nupcial ou revoada de formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M.; **Formigas-Cortadeiras da Bioecologia ao Manejo**. Viçosa: Ed. UFV, 2011. p. 165-172.

MARTINS, J. R. M. **Evolução de genes e pseudogenes mitocondriais em *Atta cephalotes* (Linnaeus, 1758)**. Rio Claro, 2006. 43 f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

MIKHEYEV, A. S.; MUELLER, U. G.; ABBOT, P. Cryptic sex and many-to-one coevolution in the fungus-growing ant symbiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 103, n. 28, p. 10702-10706, 2006.

MUELLER, U. G.; SCOTT, J. J.; ISHAK, H. D.; COOPER, M.; RODRIGUES, A. Monoculture of leafcutter ant gardens. **PloS one**, v. 5, n. 9, p. 3-9, 2010.

SCHULTZ T. R, BRADY S. G. Major evolutionary transitions in ant agriculture. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.105, p. 5435-40. 2008.

SCHULTZ, T.R.; SOLOMON, S.A.; MUELLER, U.G.; VILLESEN, P.; BOOMSMA, J.J.; ADAMS, R.M.M.; NORDEN, B. Cryptic speciation in the fungus-growing ants *Cyphomyrmex longiscapus* Weber and *Cyphomyrmex muelleri* Schultz and Solomon, new species (Formicidae, Attini). **Insectes Soc.**, v.49, n. 4, p. 331–343, 2002.

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

THOMPSON J. D, HIGGINS, D. G, GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucl Acids Res.**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

PEREIRA-DA-SILVA, V. Contribuição ao estudo das populações de *Atta sexdens* rubropilosa Forel, e *Atta laevigata* (Fr. Smith) no estado de São Paulo (Hym.: Formicidae). **Studia Entomologica**, v. 18, p. 201-250, 1975.

POLZIN, T.; DANESHMAND, S. V. Network 4.6.1.0. Fluxus Techonology Ltd. Steiner (MP). **Copyright**, p. 2004-2012, 2003.

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

Conclusão final

Conclusão final

Foram caracterizadas duas linhagens mitocondriais simpátricas e morfologicamente distintas de *A. laevigata*, e provavelmente, estão reprodutivamente isoladas, caracterizando um processo de especiação em andamento. As dimensões corporais e da genitália se mostraram bons caracteres para separação das duas linhagens.

A causa da especiação em *A. laevigata* não está relacionada com o sincronismo no voo nupcial ou com a especialização no cultivo de grupos distintos do fungo mutualista. Contudo, o processo de especiação pode estar relacionado a preferências sexuais, uma vez que indivíduos das linhagens distintas não acasalam entre si. Portanto, há uma barreira pré-zigótica levando ao isolamento reprodutivo entre indivíduos simpátricos de linhagens distintas. Esta barreira foi provavelmente causada pelas dimensões corporais e da genitália, que dificulta ou impede, a cópula entre indivíduos de linhagens distintas. Apesar de *A. silvai* ter sido sinonimizada por causa da intensa variação morfológica e biogeográfica, as análises genéticas e morfológicas mostraram que *Atta silvai* pode ser de fato uma espécie nova.