
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS INTEGRAL

Tauana Campos

ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DOS SUBTIPOS DE
Linepithema micans (FORMICIDAE: DOLICHODERINAE)
NA REGIÃO SUL DO BRASIL ATRAVÉS DA
FERRAMENTA MOLECULAR BARCODE

Tauana Campos

ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DOS SUBTIPOS DE *Linepithema micans* (FORMICIDAE: DOLICHODERINAE) NA REGIÃO SUL DO BRASIL ATRAVÉS DA FERRAMENTA MOLECULAR BARCODE

Orientador: Prof. Dr. Odair Correa Bueno

Co-orientadora: Msc. Cíntia Martins Perinotto

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro, para obtenção dos graus de Bacharel e Licenciada em Ciências Biológicas.

Rio Claro

2012

595.796 Campos, Tauana
C198a Análise da distribuição dos subtipos de *Linepithema micans*
(Formicidae: Dolichoderinae) na região Sul do Brasil através da
ferramenta molecular Barcode / Tauana Campos. - Rio Claro : [s.n.], 2012
50 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots., mapas

Trabalho de conclusão de curso (licenciatura e bacharelado - Ciências
Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de
Rio Claro

Orientador: Odair Correa Bueno
Co-Orientador: Cíntia Martins Perinotto

1. Formiga. 2. Biologia molecular. 3. Mitótipos. 4. Formigas
invasoras. 5. Citocromo oxidase 1 e 2. I. Título.

Dedico esse trabalho aos meus pais, Edvar e Mismére.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelos inúmeros caminhos, muitas vezes incompreendidos por mim, que ele me colocou, mas que me ajudaram a ser a pessoa que eu sou hoje.

A meus pais, irmãs e avó pela paciência, carinho, amor e principalmente pela compreensão de me ver longe nesses últimos cinco anos e me apoiar sempre, independente do caminho que eu seguisse.

A meus professores que direta ou indiretamente apoiaram e elucidaram questões sobre meu estágio, vida profissional e por vezes até na vida pessoal.

Ao grupo PET Biologia do qual fiz parte por quase cinco anos e que foi tão difícil me desvincular, vocês foram parte fundamental do meu crescimento pessoal dentro da Universidade.

Aos meus amigos de sala e de trabalho que escutaram muitas reclamações e desabafos sobre as dificuldades encontradas no decorrer dessa iniciação científica.

Aos colegas de laboratório que muitas vezes iluminaram meu caminho e me ajudaram a compreender a análise de alguns resultados.

Aos colegas Aline Nondillo e Dr. Marcos Botton da Embrapa Uva e Vinho de Bento Gonçalves, RS que auxiliaram na coleta e identificação das formigas, lembrando que os dados obtidos com esse estudo serão utilizados tanto para a tese de doutorado da aluna Aline Nondillo quanto para a produção de artigos em nome de todos os participantes envolvidos.

Ao Orientador, Odair Correa Bueno, e Co-Orientadora, Cíntia Martins Perinotto, que possibilitaram o estágio e me auxiliaram todo o tempo em todas as dificuldades encontradas.

Ao meu namorado, parceiro, amigo de todas as horas que me auxiliou em todos os momentos de tristeza, ódio, choro, felicidade, euforia, e TPM reclamando o menos possível sempre.

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” pelo maravilhoso mundo de possibilidades que me ofereceu.

E por fim ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pelo apoio financeiro concedido para a realização desse estudo.

“Grandes batalhas só são dadas a grandes guerreiros.”

Mahatma Gandhi

“O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder entusiasmo.”

Winston Churchill

RESUMO

Formigas do gênero *Linepithema* se encontram distribuídas amplamente por todo o globo, algumas delas, como *Linepithema humile* são muito conhecidas por sua ação invasora, comprometendo fauna e flora dos ambientes que invadem. Devido a notoriedade dessa espécie, há uma tendência em identificar erroneamente como *L. humile* as espécies próximas. Assim ocorreu com outras espécies da região Sul do Brasil com características próximas a ela. *L. micans* é a principal espécie que se associa com a pérola-da-terra *Eurhizococcus brasiliensis* (Hemíptera: Margarodidae), importante praga na vinicultura gaúcha. Análises preliminares revelaram a existência de três subtipos de *L. micans*. No presente estudo foram analisadas diferentes populações de *L. micans* das vinícolas do Estado do Rio Grande do Sul com a utilização de dois genes mitocondriais, utilizados para DNA *Barcode* de animais, com o propósito de estabelecer a distribuição dos diferentes mitótipos de *L. micans*. O resultado obtido revelou a existência de 14 haplótipos, sendo 12 novos e a análise da rede de haplótipos sugere a existência de dois possíveis grupos ancestrais.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	08
2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 Material Biológico e Pontos de Coleta	17
3.2 Extração de DNA	22
3.3 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) e PCR <i>Nested</i>	23
3.4 Purificação	24
3.5 Reação de Sequenciamento	24
3.6 Análise das Sequências Geradas	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1 Extração de DNA	26
4.2 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) e PCR <i>Nested</i>	26
4.3 Purificação	27
4.4 Sequenciamento	28
4.5 Anotação de Sequências	28
4.6 Análise Filogenética	32
5. CONCLUSÕES	35
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
7. ANEXOS	44

1. INTRODUÇÃO

Os insetos superam o número de espécies todos os outros animais terrestres existentes e ocorrem praticamente em todos os ambientes do planeta (TRIPLEHORN & JOHNSON, 2005). As formigas são representadas por uma única família, Formicidae, pertencem à Subordem Apocrita, Ordem Hymenoptera, Classe Hexapoda e Filo Arthropoda (BRANDÃO, 1999). A família Formicidae, por sua vez, está inserida na Superfamília Vespoidea e, filogeneticamente, forma um grupo irmão com Scoliidae e Vespidae (BROTHERS, 1999).

As formigas são insetos verdadeiramente sociais (WILSON, 1971; HÖLLDOBLER & WILSON, 1990; WILSON & HÖLLDOBLER, 2005), pois apresentam cuidado com a prole, castas estéreis e reprodutivas, divisão de trabalho, e sobreposição de gerações. As castas são compostas por rainhas, soldados e operárias, onde, os indivíduos não férteis trabalham em prol dos férteis. As fêmeas após o voo nupcial perdem as asas e se esforçam no sentido de fundar um novo formigueiro, enquanto os machos morrem logo após a cópula (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990).

O hábito alimentar diversificado das formigas é uma das grandes razões do sucesso dessa família, isso lhes permitiu explorar a maioria dos habitats terrestres (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990). Existem formigas que se alimentam de fungos (FOREL, 1895; GONÇALVES, 1945), exsudatos de nectários florais e extraflorais (ALMEIDA & FIGUEIREDO, 2003; DELABIE *et al.*, 2003, DEL VAL & DIZO, 2004), “honeydew” que é uma fonte rica de nutrientes constituído de gotículas de um líquido rico em açúcares de pulgões, cochonilhas e cigarrinhas (DELABIE & FERNÁNDEZ, 2003), sementes (GORDON, 2002), além de outros grupos que são predadores ou onívoros (FOWLER *et al.*, 1991).

A família Formicidae constitui um grupo monofilético, cujas principais sinapomorfias possibilitam a distinção desses animais de qualquer outro himenóptero, sendo elas: a presença de pecíolo e pós-pecíolo, glândula metapleurale e antenas divididas em camadas (FERNÁNDEZ & PALACIO, 2003). Seu início na história geológica da Terra se deu no período Cretáceo, a aproximadamente 115 a 135 milhões de anos atrás (BRADY *et al.*, 2006). As formigas estão distribuídas por todo o globo, excetuando-se os polos (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990; BUENO & CAMPOS-

FARINHA, 1999), e representam entre 15 a 20% da biomassa animal nas florestas tropicais, além de exercerem papéis chave em vários ecossistemas (WILSON & HÖLDOBLER, 2005). Devido à sua enorme diversidade, são importantes animais nos aspectos ecológicos, porém algumas espécies também causam grandes prejuízos econômicos ao homem (CAMPOS, 2004).

Atualmente, estima-se a existência de mais de 24.000 espécies de formigas agrupadas em 23 subfamílias (BOLTON *et al.*, 2006). Segundo Saux *et al.*, (2004) com base em estudos moleculares, na família Formicidae existem cerca de 20 subfamílias, onde Dolichoderinae está inserida; nessa subfamília existem 23 gêneros (BOLTON, 2003). O gênero *Linepithema* Mayr 1866, pertence à subfamília Dolichoderinae, Tribo Dolichoderini, e conta com 19 espécies na América Neotropical, com base em dados morfológicos, biogeográficos (WILD, 2007) e moleculares (WILD, 2009).

Segundo Urbani *et al.*, (1992), na Região Neotropical há até o presente momento, oito subfamílias de formigas atuais: Ponerinae, Myrmicinae, Formicinae, Dolichoderinae, Ecitoninae, Pseudomyrmecinae, Leptanilloidinae e Cerapachyinae, além de uma apenas por fósseis, Myrmeciinae (BRANDÃO, 1991), das 16 subfamílias reconhecidas atualmente.

Dentro da subfamília Dolichoderinae, estão inseridos gêneros principalmente ricos em número de espécies e abundantes, como *Azteca*, *Dolichoderus*, *Linepithema*, *Dorymyrmex*, *Tapinoma* e *Forelius* (BRANDÃO, 1999).

As formigas do gênero *Linepithema* são comumente elementos negligenciados da mirmecofauna Neotropical; elas são formigas pequenas, monomórficas e nativas de florestas, pastagens e habitat de montanha do Caribe, América Central e América do Sul (WILD, 2007); A maioria das espécies do gênero *Linepithema* é polidômica (colônia difusa, distribuída em vários locais), muitas são poligínicas (WILD, 2007). De acordo com Kaspari (2003), espécies que possuem muitos ninhos e muitas rainhas, frequentemente dominam os diversos habitats, sobretudo pelo seu grande potencial de expansão e crescimento, caso de *L. humile* (DIEHL-FLEIG, 2006) e *L. micans* agora, isso acarreta muitas vezes grandes impactos nos ambientes em que essas espécies são introduzidas (WILD, 2007).

Em relação à construção de ninhos, as formigas do gênero *Linepithema* os fazem superficialmente em solos, serrapilheiras, madeira morta ou até mesmo sob pedras, pelo menos duas espécies *L. iniquum* e *L. leucomelas* são predominantemente arbóreas e duas outras espécies pouco estudadas, *L. flavescens* e *L. cryptobioticum* indicam uma vivência primariamente subterrânea (WILD, 2007).

Pode-se dizer que o comportamento de nidificação e alimentação das formigas do gênero *Linepithema* é esteriotipado, as colônias maduras são populosas, às vezes com milhares de indivíduos; o forrageio é condizente com o das dolicoderíneas, elas são catadoras generalistas e predadoras de nectários e **honeydew** de outros insetos, e quando detectam uma rica fonte alimentar, recrutam grande número de indivíduos, sendo ativas nos períodos diurno e noturno (WILD, 2007).

As características morfológicas marcantes de operárias de *Linepithema* que permitem identificá-las de maneira correta são: a margem anterior do clipeo que contém uma grande concavidade, porém pouco profunda; o mesosoma jamais apresenta espinhos ou tubérculos, além do espiráculo propodeal ser pequeno; e por fim o tegumento é flexível, com somente uma escultura visível (JAIME, 2010).

A formiga *Linepithema micans* era confundida com a formiga *Linepithema humile*, devido a enorme semelhança morfológica (Figura 1) e comportamental entre elas, mas com a chave proposta por Wild (2007) foi possível diferenciá-las de maneira correta.

A maioria das formigas que obtiveram um grande sucesso na colonização de diversas áreas é encontrada em regiões de grande impacto antrópico (CLARK *et al.* 1982; PASSERA 1994), um grande exemplo é a espécie *L. humile*, ela é uma formiga invasora que causa diversos danos à fauna e flora, nativa da Argentina, elas foram amplamente distribuídas através dos meios de transporte das atividades comerciais e assim se espalharam por todo o mundo, sendo considerada uma importante praga nos Estados Unidos, Hawái, África do Sul, Europa e parte da Austrália; elas são grande alvo de estudo como modelo de invasão biológica (HOLWAY *et al.*, 2002); já *L. micans* também tem comportamento invasor (MARTINS *et al.*, 2012) e sua distribuição ainda se encontra restrita ao Sul do Brasil, Argentina e Paraguai.

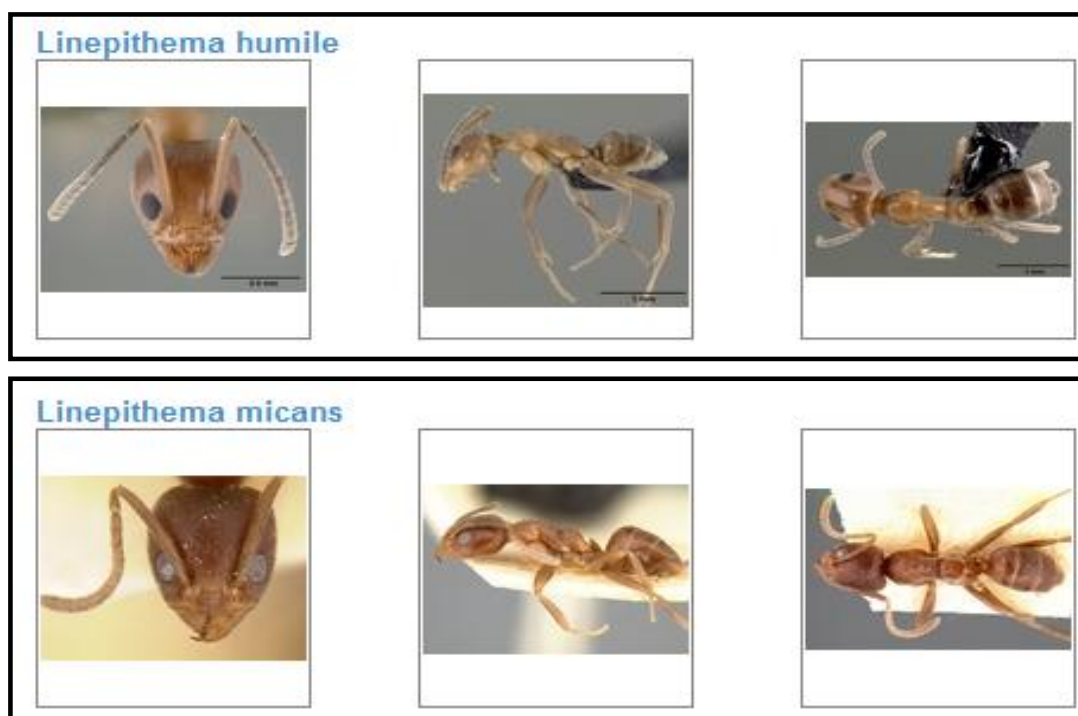


Figura 1: fotos de *Linepithema humile* (ANTWEB, 2007a) e *L. micans* (ANTWEB, 2007b), atentar para semelhança morfológica.

As formigas podem ter diversos tipos de interações com outros organismos, dentre elas a trofobiose, nome dado à relação mutualística entre formigas e hemípteros (FISCHER & SHINGLETON, 2001), nela ambas as partes são beneficiadas, as formigas recebem o **honeydew**, uma gotícula expelida por alguns hemípteros rica em açúcares, constituindo uma rica fonte alimentar (DELABIE, 2001); e os hemípteros, por sua vez, recebem proteção contra predadores e a dispersão de suas ninfas (HICKEL, 1994; SORIA & DAL CONTE, 2000; BOTTON *et al.*, 2000, 2003).

A maior parte das espécies de formigas associadas a hemípteros pertencem às subfamílias Dolichoderinae, Formicinae e Myrmicinae, algumas poucas pertencem a Ponerinae (WAY, 1963 apud SACCHETT *et al.*, 2009; SCHULTZ & McGLYN, 2000; DELABIE, 2001; DELABIE & FERNÁNDES, 2003). A principal característica que auxilia a trofobiose é o tamanho do hemíptero, visto que ele tem que ser carregado para novos lugares tanto devido escassez alimentar, quanto para sua própria proteção contra predadores naturais (DELABIE, 2001; DELABIE & FERNÁNDES, 2003).

A pérola-da-terra, *Eurhizococcus brasiliensis*, responsável por cerca de 60% da perda da produção vinícola do Brasil (MELLO, 2001), é um hemíptero com vida

subterrânea, em formato de cisto, com reprodução partenogenética facultativa (GALLOTTI, 1976 apud SACCHETT *et al.*, 2009), que se alimenta nas raízes das plantas, sendo considerado uma das maiores pragas das viniculturas; esses animais sugam a seiva da videira o que desencadeia uma diminuição gradual da vitalidade da planta, o que conseqüentemente gera a diminuição da produção de uvas e eventualmente pode levar a planta a morte (SORIA & BRAGHINI, 1999; BOTTON *et al.*, 2003).

Segundo um estudo conduzido por Sacchett *et al.*, (2009), foi verificado que apesar de *L. micans* não ter carregado o maior número de cistos de pérolas-da-terra, ela mostrou dominância perante as outras formigas e expulsou as operárias das outras espécies de formigas de seu local de forrageio; dessa maneira, devido a sua natureza mais agressiva, *L. micans* pode ser considerada uma importante espécie na disseminação da pérola-da-terra.

A ferramenta molecular *Barcode* ou Código de Barras é um sistema de identificação que permite a discriminação de todas as espécies vivas do planeta através da utilização de um pequeno segmento padronizado de DNA (TAUTZ *et al.*, 2003), essa abordagem representa uma estratégia extremamente promissora para o diagnóstico da biodiversidade no planeta. Hebert *et al.*, (2003a) propuseram que o *Barcode* fosse baseado na diversidade da sequência de aminoácidos do Citocromo Oxidase 1 (COX1), pois essas diferenças nesse gene mitocondrial seriam suficientes para acomodar, de forma confiável, as espécies em categorias taxonômicas de filo à ordem, com exceção de Cnidaria (HEBERT *et al.*, 2003b).

A mitocôndria é uma organela citoplasmática de membrana dupla presente na maior parte das células eucarióticas, seu número pode variar de algumas centenas a centenas de milhares por célula, sua principal função está relacionada com a conservação de energia celular e síntese de ATP, através do transporte de elétrons na fosforilação oxidativa (LEHNINGER *et al.*, 1995).

Estruturalmente, o DNA mitocondrial é uma molécula de pequeno porte, com 16 a 20 Kb, fita dupla, circular e possui 13 genes codificadores de subunidades de enzimas envolvidos na síntese de ATP (MORITZ *et al.*, 1987), 2 genes de RNA ribossomal e 22 genes de RNA transportador, totalizando 37 genes, alguns pequenos espaçadores intergênicos (AVISE, 2001), essa molécula tem sido grandemente utilizada em estudos de análise evolutiva, populacional e demográficos em formigas (ABBOTT *et al.*, 2007;

DRESCHER *et al.*, 2007; QUEK *et al.*, 2007; SHOEMAKER *et al.*, 2006) pelo fato de que esse tipo de DNA não possui mecanismos de reparo de mutações como ocorre no DNA nuclear, sendo assim as mutações podem ser acumuladas (WATSON *et al.*, 1993; AVISE, 1994).

As mitocôndrias em células de eucariotos carregam material genético extranuclear que são transmitidos quase que exclusivamente por meio da linhagem feminina, o material genético mitocondrial tem alta taxa evolutiva, apresentando uma taxa de substituição de nucleotídeos de 5 a 10 vezes maior que a encontrada no DNA nuclear (BROWN *et al.*, 1979); isso impediria os polimorfismos intraespecíficos e a recombinação; dessa maneira, essa molécula pode ser utilizada como um bom marcador molecular (BEHURA, 2006), sendo eficiente em estudos de sistemática filogenética (AVISE *et al.*, 1987, GRAZZIOTIN *et al.*, 2006; BACCI JR *et al.*, 2009). Entretanto problemas com ligação paternal, taxa variável de evolução das sequências, heteroplasmia e casos de não neutralidade podem ser vistos como fatores que limitam a aplicação do DNA mitocondrial para a finalidade de estudos de ordem evolutiva (AVISE, 2001; BALLARD & WHITLOCK, 2004).

As prováveis hipóteses que explicam a alta taxa evolutiva do DNA mitocondrial seriam: relaxamento funcional, visto que ele não codifica proteínas diretamente envolvidas em sua transcrição e replicação, além de tolerar certa falta de precisão na tradução; alta taxa de mutação, pois os mecanismos de reparo são ineficientes, além de constante exposição a radicais livres dentro da organela; e por não se encontrar associado a histonas, como o DNA nuclear (AVISE, 2001).

Em relação aos himenópteros socais, como as abelhas, vespas e formigas, a rainha mãe passa para todos os seus descendentes o seus tipos de genes mitocondriais, a isso damos o nome de mitótipos (JOHNSON *et al.*, 2011), ou haplótipos, ou subtipos, ou até mesmo morfoespécies.

Uma boa parte dessa informação genética mitocondrial codifica enzimas que afetam diretamente as redes metabólicas, e consequentemente, o desempenho energético de seus portadores (JOHNSON *et al.*, 2011), se mostrando evidente em atividades como: estratégias de forrageio (PRYS-JONES, 1986), habilidade de suportar os custos de certas defesas imunológicas (MORET & SCHMID-HEMPEL, 2000; MORET,

2003), e manutenção do esperma vivo ao longo de anos dentro do corpo da fêmea, comum em formigas rainhas (BAER *et al.*, 2006).

Populações naturais contêm certa gama de mitótipos, e isso tem sido utilizado para diferenciar populações distintas e na construção e/ou elucidação de árvores filogenéticas (AVISE, 1994).

Genes mitocondriais importantes, como o gene codificador da proteína da citocromo oxidase I (mais conservado em termos de evolução de aminoácidos) e II se mostram sendo muito úteis em estudos evolutivos de vários insetos a nível específico (SIMON *et al.*, 1994), além disso, tem-se estudado profundamente a proposta de utilização da combinação de ambos como DNA *Barcoding* na identificação e diferenciação de espécies animais (HEBERT *et al.*, 2003; RATNASINGHAM & HEBERT, 2007; SMITH *et al.*, 2005; MARTINS *et al.*, 2012).

Entretanto, vários estudos de análise e relações filogenéticas mostram que às vezes, juntamente com a amplificação de genes mitocondriais, também são amplificados os pseudogenes, ou *numts*, esse “falsos genes” por sua vez são cópias muito semelhantes de genes que não produzem proteínas completamente funcionais, sua sequência é distorcida por mutações que aconteceram ao longo do processo evolutivo e que causaram mudanças na fase de leitura e *stop codons* prematuros, o que impede a sua correta expressão gênica (BENSASSON *et al.*, 2001; HARRISON *et al.*, 2003; D’ERRICO *et al.*, 2004; MARTINS JR *et al.*, 2007).

Segundo D’Errico *et al.*, (2004), provavelmente a transferência de genes mitocondriais para o núcleo esteja ocorrendo desde a integração dos simbioses que originaram as mitocôndrias e, possivelmente, falhas na fidelidade das cópias transferidas possivelmente teriam originado esses pseudogenes no núcleo.

A detecção de pseudogenes bem como sua caracterização e documentação, são de fundamental importância, uma vez que os pseudogenes e o DNA mitocondrial estão localizados em diferentes locais da célula e apresentam diferentes graus de funcionalidade, sendo, portanto, submetidos a pressões evolutivas distintas (MARTINS JR, 2011), dessa maneira, quando sequências de pseudogenes e de DNA mitocondrial são utilizadas conjuntamente em análises filogenéticas, falsas relações podem ser

propostas e espécies crípticas superestimadas como em estudos utilizando *Barcode* (SORENSEN & QUINN, 1988; MARTINS JR *et al.*, 2007; SONG *et al.*, 2008).

Em animais, o genoma mitocondrial geralmente comporta dois tRNA^{Leu}, um com anticódon UAG e o outro com UAA (HIGGS *et al.*, 2003), sendo esse último por sua vez, localizado entre os genes COX 1 e 2 em Insecta (SIMON *et al.*, 1994).

Estudos recentes (MARTINS, 2007; Martins *et al.*, 2007, 2012) trazem os genes codificadores da proteína citocromo oxidase I e II e do tRNA^{Leu} como bons marcadores moleculares na distinção entre os diferentes mitótipos de *L. micans*. Até o presente momento, Martins *et al.*, (2012) identificaram através desses marcadores moleculares a existência de pelo menos três mitótipos ou haplótipos da formiga *L. micans* no Estado de Mato Grosso do Sul.

Em formigas da tribo Dolichoderinae, as características dos genes de tRNA^{Leu} associadas aos **stop codons** do citocromo oxidase 1 corroboraram a filogenia molecular proposta para dessa tribo (CHIOTIS *et al.*, 2000). Entretanto, apesar da quantidade de informação genética presente em um único gene de tRNA, isso não chega a ser suficiente para resolver, com confiabilidade, as filogenias ao nível de espécie (HIGGS *et al.*, 2003); segundo Chiotis *et al.*, (2000), há uma certa tendência de que gêneros muito próximos entre si possuam a estrutura do tRNA muito semelhantes, o que também foi observado por Martins *et al.*, (2012) numa análise mais específica de *L. micans*.

2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

Pesquisas filogenéticas sobre a espécie *Linepithema micans* têm sido muito limitadas, portanto o objetivo do trabalho foi identificar a distribuição dos diferentes tipos de morfoespécies de *L. micans* na região Sul do Brasil, localidade com grande invasão por parte dessa espécie, com o auxílio da ferramenta molecular *Barcode* utilizando genes mitocondriais universais muito conservados em diversas espécies animais.

No presente estudo foram analisadas 35 diferentes populações de *L. micans* das vinícolas do Estado do Rio Grande do Sul com a utilização de dois genes mitocondriais, utilizados para DNA *Barcode* de animais, com o propósito de estabelecer a distribuição dos diferentes mitótipos de *L. micans*, bem como sua caracterização molecular.

A justificativa para a realização deste estudo se deve ao fato de *L. micans* ter sido considerada uma espécie distinta de *L. humile* há pouco tempo, existindo poucos trabalhos sobre a espécie, além de que *L. micans* recentemente se mostrou de grande importância como praga nas vinhas da região Sul do Brasil, onde ela se associa com pérola da terra brasileira, *Eurhizococcus brasiliensis* Hempel (SACCHET *et al.*, 2009), considerada a praga mais grave das vinhas nesta região (BOTTON *et al.*, 2004), causando grande impacto econômico na indústria vinícola da região sul do Brasil.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material Biológico e Pontos de Coleta

A coleta das formigas foi feita pela doutoranda Aline Nondillo e ocorreu no intervalo dos meses de setembro a dezembro de 2010 em 55 parreirais diferentes localizados em 11 municípios produtores de uvas onde ocorre infestação pela pérola-da-terra num raio de 70 Km² da cidade de Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul, sendo eles: Antônio Prado, Veranópolis, Monte Belo do Sul, Flores da Cunha, Farroupilha, Caxias do Sul, Pinto Bandeira, Sarandi, Garibaldi, Dois Lageados e Nova Pádua (Figura 2).

As formigas do subsolo foram coletadas com porta iscas de profundidade, ou “pitfall” subterrânea, as quais consistiram em um conjunto de dois tubos de filme de fotografia (3,3 cm de diâmetro x 5,0 cm de altura), ligados com um cordão de aproximadamente 45 cm, com tampa e perfurados lateralmente, segundo o modelo de Morini et al., (2004) (Figura 3), com iscas atrativas de sardinha e mel; estes ficavam a 30 cm de profundidade, próximos às raízes das plantas por um período de 24 horas. A identificação das formigas foi feita através de comparações com exemplares presentes na coleção do Laboratório de Mirmecologia do Alto Tietê, Universidade de Mogi das Cruzes, SP.

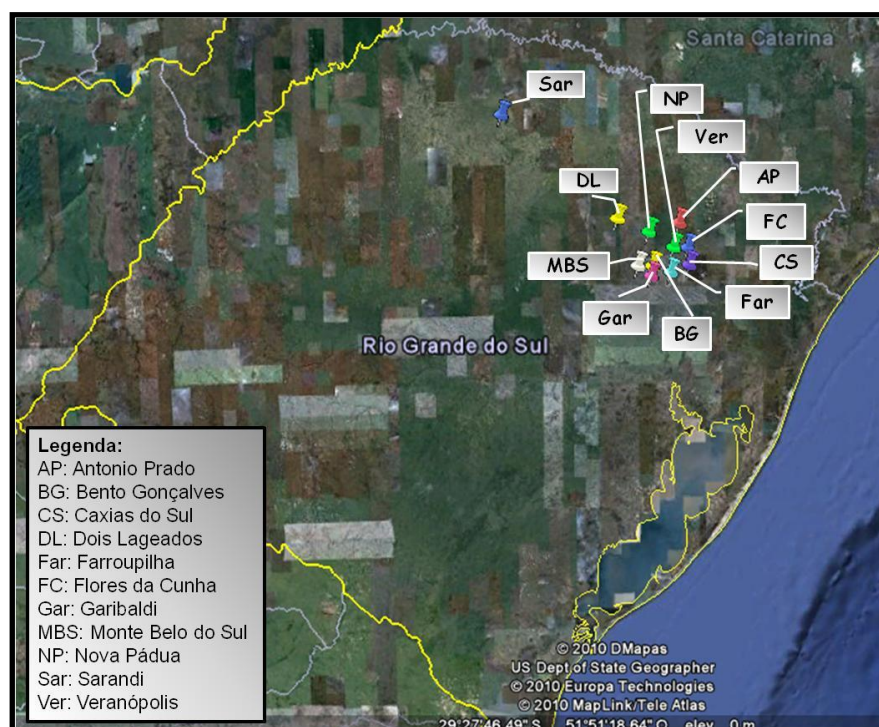


Figura 2: Mapa do Estado do Rio Grande do Sul com destaque para os onze municípios onde foram realizadas as coletas de formigas em parreirais. (Google Earth, 2010).



Figura 3: Armadilha do tipo “pitfall” utilizada para a coleta de formigas em vinhedos.

Dos 55 parreirais amostrados, a formiga *L. micans* foi encontrada em 35 deles, cujas localidades se encontram descritas Tabela 1.

Tabela 1: Descrição dos locais de coleta da espécie *Linepithema micans* realizada entre os meses de setembro e dezembro de 2010, utilizando como iscas atrativas Mel e Sardinha.

Código	Cidade	Propriedade	Coordenadas
1LM11	Dois Lagedos	Luiz Bedin	S 29° 01' 354" WO 51° 50' 522" Elevação 453,7 m
1LM15	Dois Lagedos	Nelson Scunel	S 28° 58' 398" WO 51° 48' 358" Elevação 467,2 m
1LM16	Dois Lagedos	Amélio Dálmas	S 28° 56' 838" WO 51° 50' 630" Elevação 591,9 m

Continuação da Tabela 1

Código	Cidade	Propriedade	Coordenadas
1LM21	Pinto Bandeira	Odacir de Toni	S 29° 03' 241" WO 51° 28' 387" Elevação 571,2 m
1LM23	Pinto Bandeira	João Beluzzo de Toni	S 29° 04' 893" WO 51° 27' 831" Elevação 629,6 m
1LM24	Pinto Bandeira	Nelson Comiatto	S 29° 07' 883" WO 51° 27' 265" Elevação 629,6 m
1LM25	Pinto Bandeira	Airton Luiz Giovanini	S 29° 08' 818" WO 51° 26' 276" Elevação 693,8 m
1LM31	Sarandi	Milton Potrich	S 27° 51' 289" WO 53° 01' 390" Elevação 442,7 m
1LM32	Sarandi	Edson Cótica	S 27° 53' 706" WO 52° 58' 838" Elevação 503,7 m
1LM33	Sarandi	Jairo Cornó	S 27° 51' 943" WO 53° 01' 199" Elevação 476,4 m
2LM11	Caxias do Sul	Luiz Klering	S 29° 14' 477" WO 51° 14' 363" Elevação 700,3 m
2LM12	Caxias do Sul	Ivo Arlindo Marchesini	S 29° 14' 923" WO 51° 14' 376" Elevação 729,1 m

Continuação da Tabela 1

Código	Cidade	Propriedade	Coordenadas
2LM13	Caxias do Sul	Darci Aloísio Klering	S 29° 17' 308" WO 51° 14' 255" Elevação 526,8 m
2LM14	Caxias do Sul	Vilson Valentin Dallegrave	S 29° 17' 838" WO 51° 13' 827" Elevação 535,2 m
2LM15	Caxias do Sul	Pedro Tonietto	S 29° 13' 123" WO 51° 15' 237" Elevação 640,9 m
2LM23	Farroupilha	Luiz Sérgio Robetti	S 29° 12' 597" WO 51° 26' 884" Elevação 649,0 m
2LM24	Farroupilha	Renor Moroni	S 29° 07' 682" WO 51° 24' 394" Elevação 605,9 m
3LM11	Flores do Cunha	Orildo Pelizer	S 28° 57' 910" WO 51° 13' 516" Elevação 705,6 m
3LM12	Flores do Cunha	Graciosa Venturini	S 29° 01' 683" WO 51° 12' 983" Elevação 724,4 m
3LM13	Flores do Cunha	Rineu Smiderle	S 29° 04' 505" WO 51° 14' 246" Elevação 762,8 m
3LM14	Flores do Cunha	Vanderlei Casagrande	S 29° 04' 766" WO 51° 15' 051" Elevação 757,3 m

Continuação da Tabela 1

Código	Cidade	Propriedade	Coordenadas
3LM15	Flores do Cunha	Ivo Mascarello	S 28° 59' 552" WO 51° 13' 308" Elevação 659,3 m
3LM21	Monte Belo do Sul	Gabriel Bragagnollo	S 29° 09' 743" WO 51° 38' 862" Elevação 618,8 m
4LM21	Veranópolis	Roque Mazzarollo	S 28° 57' 122" WO 51° 31' 559" Elevação 627,2 m
4LM22	Veranópolis	Inor Tedesco	S 28° 57' 343" WO 51° 31' 374" Elevação 610,7 m
4LM23	Veranópolis	Olímpio Ceppo	S 28° 57' 224" WO 51° 31' 292" Elevação 584,7 m
4LM24	Veranópolis	Jandir Pertile	S 28° 58' 192" WO 51° 29' 425" Elevação 617,7 m
4LM25	Veranópolis	Moacir Mazzarollo	S 28° 58' 616" WO 51° 30' 044" Elevação 621,5 m
5LM11	Antônio Prado	Roeni Menon Lovatel	S 28° 50' 729" WO 51° 17' 713" Elevação 741,3 m
5LM12	Antônio Prado	Albino Faraon	S 28° 50' 277" WO 51° 22' 928" Elevação 737,1 m

Continuação da Tabela 1

Código	Cidade	Propriedade	Coordenadas
5LM13	Antônio Prado	Aldemir Falavigna	S 28° 52' 673" WO 51° 13' 971" Elevação 745,4 m
5LM23	Garibaldi	Jaime Agostini	S 29° 14' 811" WO 51° 38' 334" Elevação 533,1 m
5LM31	Nova Pádua	Lourenço Alessi	S 29° 01' 863" WO 51° 19' 881" Elevação 589,3 m
5LM34	Nova Pádua	Antônio Camana	S 29° 02' 885" WO 56° 21' 191" Elevação 505,7 m
5LM35	Nova Pádua	Ari Tatto	S 29° 01' 723" WO 51° 16' 160" Elevação 687,4 m

3.2 Extração de DNA (Adaptado de SAMBROOK *et al.*, 1989)

Será considerada como uma única população de *Linepithema micans* todas as formigas coletadas dentro de cada propriedade, tanto pelo caráter territorialista delas, o que provavelmente não permitiria a aproximação de outros subtipos da mesma espécie para o forrageio, quanto pela característica de ser polidômica, ou seja, ninho do tipo difuso, que se estende por vários metros, por vezes até quilômetros. Sendo assim foram analisados um total de 35 populações de *Linepithema micans*.

Foram feitas extrações de dez indivíduos inteiros de cada população selecionados aleatoriamente, sendo que eles foram mantidos em álcool 80% e refrigerados a uma temperatura de -20°C do período da coleta até a extração. A extração de DNA foi por método não fenólico, as formigas foram homogeneizadas em uma solução tampão de lise celular do tipo TNES (250mM Tris, 2M de NaCl, 100mM EDTA, 2,5%SDS), o homogeneizado foi incubado à 55°C por 3 horas; a degradação de RNAs de fita simples

aconteceu com a incubação do material por 30 minutos em RNA-se 4mg/mL; os resíduos de proteína foram subsequentemente precipitados com NaCl 5M; a precipitação de DNA foi feita com álcool isopropílico 100%, seguida de lavagem em álcool etílico 70%. A ressuspensão do DNA foi feita em tampão TE (10mM Tris-HCl, 0,5M EDTA, pH=8) *overnight* em geladeira.

3.3 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) e PCR *Nested*

Para a amplificação de DNA foi utilizado o kit *Go Taq® Hot Start Polymerase* (Promega) e elas foram efetuadas em termociclador Veriti (Applied Biosystem).

O protocolo para cada reação de amplificação foi ajustado para 5,0µL *Go Taq Flexi Buffer*; 1,0µL dNTPs (2mM); 2,5µL MgCl₂ (25mM); 1,5µL de *Primer Forward* (ANT-F), 1,5µL de *Primer Reverse* (ANT-R), ambos a 6pmol; 0,15µL *Go Taq Hot Start*; 3,0µL de DNA resuspendido; e água Milli Q autoclavada q.s.p. 25µL.

O programa do termociclador foi ajustado para 95°C por 7 minutos (denaturação inicial); 35 ciclos de 94°C por 1minuto e 30 segundos, 43°C por 2 minutos, 70°C por 3 minutos; e por 65°C por 7 minutos (extensão final), seguido de uma manutenção da PCR em 10°C por tempo indeterminado.

Os *Primers* utilizados produzem um fragmento de cerca de 650pb e compreendem parte da região citocromo oxidase I, região completa do RNA transportador de leucina e parte da região citocromo oxidase II, essas regiões são fragmentos de DNA mitocondrial; as respectivas sequências dos *primers* foram retirados de Martins Jr et al. (2007) e se encontram na Tabela 2.

Tabela 2: Sequências dos Primers utilizados e seu comprimento em pares de base.

Primers	Sequências	Pares de Bases (pb)
ANT-F	5' ATTCATTCTTATCTTGAAATATTATTC	28 pb
ANT-R	5' TTCATAAGTTCAGTATCATTGGTG	24 pb

O resultado das amplificações foi analisado em gel de agarose 1%.

Para algumas populações (1ML11, 1LM15, 2LM11, 4LM24, 5LM34), a quantidade de DNA purificado, mesmo com 50µL de PCR, não foi suficiente para o sequenciamento (pois possuíam um rendimento abaixo de 5,0ng/µL), então se fez necessário fazer uma PCR *Nested*, PCR da PCR ou PCR aninhado; o protocolo da reação de amplificação e do termociclador são os mesmos utilizados anteriormente, salvo que há a necessidade de se fazer um ajuste na quantidade de DNA. A quantidade de DNA utilizada para esse tipo de PCR foi 1,0µL de uma diluição do DNA purificado (9 partes de água Milli Q autoclavada para 1 parte de DNA purificado).

3.4 Purificação

Para o processo de purificação do DNA foi utilizado o kit *GFX PCR DNA* (GE Healthcare) de acordo com especificações do fabricante. O processo quantificado em Nanodrop (Thermo Scientific - NanoDrop™ 2000) e o DNA purificado foi armazenado à -20°C.

3.5 Reação de Sequenciamento

Foi utilizado o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Ambas as cadeias de DNA foram sequenciadas separadamente de acordo com especificações do fabricante.

O programa do termociclador foi ajustado para 95° por 1 minuto (denaturação inicial); 32 ciclos de 95°C por 15 segundos, 49°C por 35 segundo, 60°C por 4 minutos; e por fim 10°C por tempo indeterminado de extensão final.

A purificação dos produtos da reação de sequenciamento foi adaptada da Applied Biosystems, o DNA foi precipitado com etanol 100% e 70%. As amostras foram ressuspensas em 10 µL de formamida HiDi, salvo para um caso especial onde foi ressuspensado em 5µL de formamida devido à baixa quantidade de DNA (amostra 4LM22 – 6,7ng/µL) e sequenciadas em placas de 96 poços.

3.6 Análise das Sequências Geradas

As sequências geradas pelo sequenciador automático de capilar 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) foram editadas manualmente no programa BioEdit (HALL, 1999) e alinhadas com o auxílio do programa ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994). Com o auxílio da ferramenta BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990) do banco de dados NCBI foi identificado a quais haplótipos, ou mitótipos de *L. micans* pertencem as 35 populações analisadas nesse trabalho, em seguida foi feita a anotação de sequências com a utilização dos *softwares* ORFinder (ROMBEL *et al.*, 2002), Conserved Domains Database (MARCHELER-BAUER *et al.*, 2011), e TRNAScan-SE (LOWE & EDDY, 1997). Por fim a análise filogenética foi realizada com o auxílio dos programas Network 4.5 (fluxus-engineering.com) utilizando o parâmetro Median Joining (BANDELT *et al.*, 1999), Species Mapper (SPECIESMAPPER, 2012), e DAMBE (XIA & XIE, 2001).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Extração de DNA

As extrações foram verificadas em gel de agarose 1%, um exemplo delas elas se encontra ilustrado na Figura 4:



Figura 4: Exemplo de rendimento do gel da extração com 10 indivíduos. M: Marcador molecular de 1Kb.

A maioria das extrações não foi de boa qualidade, isso devido ao arrasto, não uniformidade da banda, em alguns casos grande depósito de proteína no poço, e também por remanescente RNA; esses detalhes podem ter acontecido pela degradação do DNA ao longo do tempo, não eficiência na retirada de proteínas e RNA de fita simples, principalmente, durante o processo de extração e também devido a pequena quantidade de DNA extraído, fato referente a pequena dimensão da formiga e a dificuldade de se extrair quantidade razoáveis de material genético de pequenos indivíduos.

4.2 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) e PCR *Nested*

Assim como as extrações as amplificações foram verificadas em gel de agarose 1% com marcador molecular de 1000pb, tanto as PCRs padrão quanto as PCRs *Nested*, um exemplo delas está ilustrado na Figura 5.

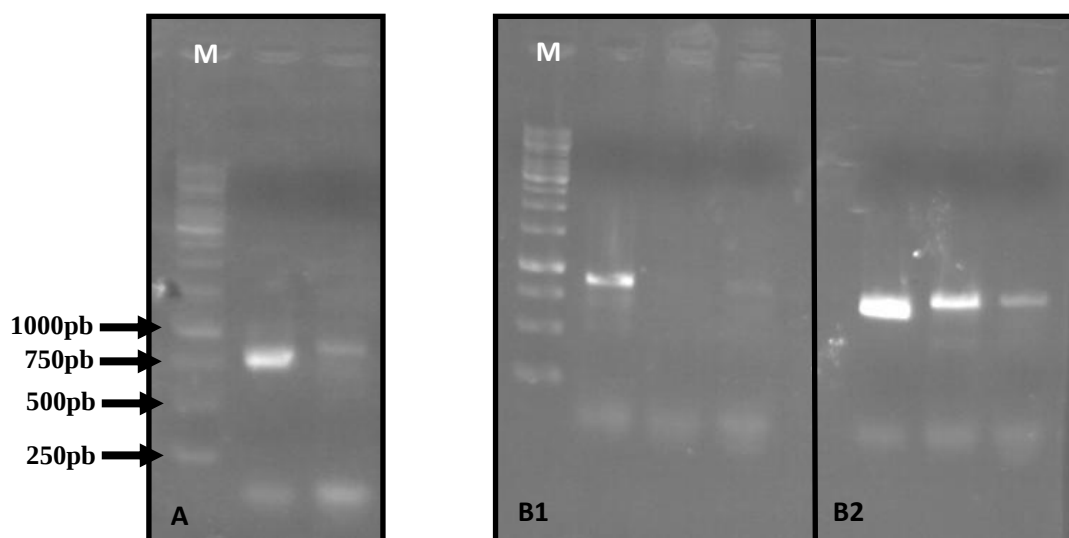


Figura 5: A – Exemplo de rendimento do gel da PCR padrão; B – Exemplo de rendimento da PCR *Nested*, B1: PCR padrão, B2: PCR *Nested* da purificação; M: Marcador molecular de 1Kb.

A maior parte das bandas da PCR padrão apresentaram resultado satisfatório, com bandas razoavelmente definidas, com aparente boa quantidade de material genético, pouco resquício de proteína nos poços e pouco resquício de dímeros de *primers* e dNTP's ao final da corrida; em comparação com o marcador molecular de 1 Kb, as bandas indicaram um fragmento do tamanho esperado, visto que o fragmento de interesse a ser amplificado tinha entre 600 e 650 pb; porém, é natural que elas sejam dispostas no gel de agarose com uma indicação de maior quantidade de pares de base, pois o *GelRed* (corante utilizado), é um intercalante que confere ao material genético a ser analisado maior peso, o que dificulta a corrida, logo o uso do corante também deve ser levando em consideração na análise de pares de bases.

Quando a purificação da PCR padrão não gerava uma quantidade de DNA suficiente para o sequenciamento, era feita a PCR *Nested*, as características das bandas eram semelhantes a das PCRs padrão.

4.3 Purificação

Foi necessário um volume final da PCR de 50µL, para que as purificações pudessem ser feitas com quantidade aceitáveis de DNA para o sequenciamento, isso ocorreu provavelmente devido à qualidade e à quantidade do DNA da extração, bem como prováveis restos de proteína e de RNAs de fita simples (principalmente).

As purificações foram verificadas em Nanodrop (Thermo Scientific - NanoDrop™ 2000), os valores estão dispostos na Tabela 3:

Tabela 3: valores das quantificações em Nanodrop. *: amostra ressuspensa para o sequenciamento em 5µL de formamida.

Código	Quantificação (ng/µL)		
1LM11	8,6ng/µL	3LM11	11,8ng/µL
1LM15	9,8ng/µL	3LM12	19,1ng/µL
1LM16	9,1ng/µL	3LM13	9,0ng/µL
1LM21	9,4ng/µL	3LM14	17,0ng/µL
1LM23	8,0ng/µL	3LM15	12,8ng/µL
1LM24	10,1ng/µL	3LM21	19,3ng/µL
1LM25	10,6ng/µL	4LM21	9,6ng/µL
1LM31	13,1ng/µL	4LM22*	6,7ng/µL
1LM32	7,8ng/µL	4LM23	20,0ng/µL
1LM33	7,8ng/µL	4LM24	25,4ng/µL
2LM11	8,3ng/µL	4LM25	12,9ng/µL
2LM12	10,9ng/µL	5LM11	13,3ng/µL
2LM13	7,2ng/µL	5LM12	10,8ng/µL
2LM14	11,7ng/µL	5LM13	17,1ng/µL
2LM15	12,5ng/µL	5LM23	13,0ng/µL
2LM23	16,7ng/µL	5LM31	15,9ng/µL
2LM24	7,9ng/µL	5LM34	8,5ng/µL
		5LM35	9,0ng/µL

4.4 Sequenciamento

Das 35 populações apenas em uma (1LM23) não se obteve um sequenciamento satisfatório, e o material remanescente não foi suficiente para novas tentativas de sequenciamento.

Logo, ao final foram obtidas 34 sequências dispostas no Anexo 1.

4.5 Anotação de Sequências

Anotação de sequências é a descrição ou caracterização biológica de uma sequência ou um conjunto de sequências, ou seja, é um processo múltiplo, pelo qual uma ou mais sequências brutas de DNA ou de aminoácidos são analisadas com a

finalidade de atribuir características biológicas para o entendimento do contexto biológico em que estas se inserem (STEIN, 2001).

Entretanto, no caso desse trabalho, as sequências codificadoras de proteínas já são bem estudadas e caracterizadas, não havendo a necessidade de se repetir esse processo; a anotação de sequências foi feita com o intuito de verificar se as sequências amplificadas não correspondiam a pseudogenes ou *numts*, sequências nucleares de origem mitocondrial que causam interpretações equivocadas na construção de relações filogenéticas.

Após a edição manual das sequências pelo *software* BioEdit (HALL, 1999) e o alinhamento múltiplo pelo ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994), foram obtidas as sequências consenso das 34 populações com 489pb, todas foram analisadas pelo *software* BLASTN (ALTSCHUL *et al.*, 1997), que faz a comparação entre sequências nucleotídicas e verifica qual o grau de similaridade entre as sequências que se pretende analisar e as depositadas no Banco de Dados.

Das 34 sequências analisadas, todas possuíam *hits* mais próximos aos três diferentes haplótipos de *L. micans* encontrados por Martins *et al.*, (2012), seguido por sequências de *L. humile* e *L. oblongum* respectivamente, com exceção da população 2LM23 (Farroupilha) e o haplótipo de Pelotas (HM026684.1) que ficou muito distante nas comparações feitas com a sequência nucleotídica em questão. Entretanto, nem todas as 34 sequências foram idênticas às sequências de *L. micans* depositadas.

Conclui-se que possivelmente haveria a presença de 14 haplótipos nas 34 populações estudadas (Tabela 4), sendo dois idênticos a haplótipos previamente analisados por Martins *et al.*, (2012). Portanto, o presente trabalho identificou 12 novos mitótipos de *L. micans*.

Tabela 4: Mitótipos encontrados de acordo com análises de sequências nucleotídicas e as de Martins *et al.*, (2012). MBG: mitótipo idêntico ao de Bento Gonçalves (HM026683.1); MPB: mitótipo idêntico ao de Pinto Bandeira (HM026685.1); MP: mitótipo de Pelotas (HM026684.1). Total de 15 mitótipos da espécie *L. micans*.

Populações	Mitótipos
1LM11, 1LM15, 1LM16, 2LM14, 3LM13, 3LM21, 5LM11, 5LM23	MBG
1LM33	MPB
Pelotas (MARTINS <i>et al.</i> , 2012)	MP
1LM21, 2LM24, 4LM23, 4LM24	M1
1LM24, 2LM12, 5LM13	M2
1LM31, 1LM32, 2LM15	M3
2LM11, 2LM13, 3LM15	M4
2LM23	M5
3LM11, 3LM14	M6
3LM12	M7
4LM21	M8
1LM25, 4LM22, 5LM12, 5LM31	M9
4LM25	M10
5LM34	M11
5LM35	M12

Os *softwares* ORFinder (ROMBEL *et al.*, 2002) e Conserved Domains Database (MARCHELER-BAUER *et al.*, 2011), foram utilizados para a averiguar a veracidade das sequências amplificadas, se elas condiziam com a amplificação das sequências codificadoras de proteínas mitocondriais Citocromo Oxidase 1 e 2 (COX 1 e 2) ou se eram pseudogenes, ou *numts*, sequências de DNA nuclear que aparentemente não são funcionais. Dois *frames* que codificavam proteínas retornaram como resultado para o *software* ORFinder (ROMBEL *et al.*, 2002), sendo eles +3 e +2, nenhum deles continham *stop codons* prematuros, característica importante de pseudogenes, além do fato de que o *software* Conserved Domains Database (MARCHELER-BAUER *et al.*, 2011) que faz a busca por domínios proteicos conhecidos dentro desses *frames*, trouxe como resultados as proteínas COX 1 e 2 respectivamente; dessa maneira confirmou-se que as sequências amplificadas realmente eram sequências mitocondriais.

Por fim foi utilizado o *software* TRNAScan-SE (LOWE & EDDY, 1997), que procura na sequência nucleotídica se há possíveis sequências que codifiquem um ou

mais RNAs transportadores e reconstruí sua estrutura secundária. No caso desses 15 mitótipos de *L. micans*, todos tem o mesmo tRNA com 67pb, anticódon TAA que codifica um aminoácido do tipo Leucina, mesma sequência nucleotídica (TTTAATATGGCAGATAAGTGCAATGAATTTAACTTCATATAtAAAAATATTACTTTTTTATTAAAA) e, conseqüentemente, a mesma estrutura secundária (Figura 6A).

Além da comparação de sequência nucleotídica no BLASTN (ALTSCHUL *et al.*, 1997), esse *software* também corrobora o resultado encontrado de que todas as 34 sequências pertencem a espécie *L. micans* e não à *L. humile*, espécie irmã comumente confundida devido a extrema semelhança morfológica, pois Martins *et al.*, (2012) verificaram que a estrutura do tRNA^{Leu} de *L. humile* se diferencia da espécie estudada nesse trabalho por uma substituição do nucleotídeo adenina em *L. micans* por uma uracila em *L. humile* (AF147050) na alça TΨC (Figura 6B).

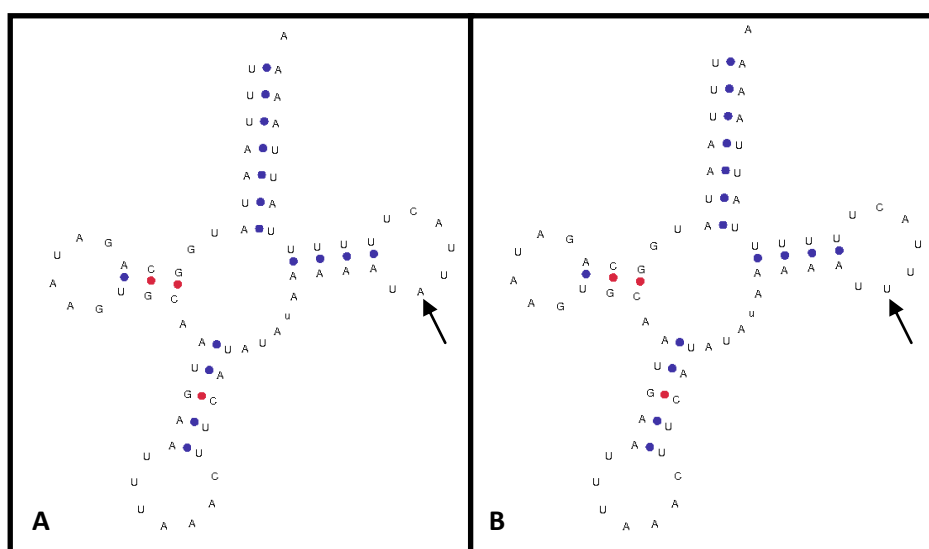


Figura 6: A - Estrutura do tRNA^{Leu} de *Linepithema micans* dos 15 mitótipos; B – Estrutura do tRNA^{Leu} de *Linepithema humile*. Seta indica a substituição dos aminoácidos nas duas espécies. Figura retirada de Martins *et al.*, 2012.

Sendo assim, ao menos até o presente momento, é válido dizer que o tRNA é um bom marcador molecular para diferenciar *L. micans* de *L. humile*, entretanto, não podemos extrapolar essa afirmação dizendo que essa é um boa ferramenta para separar espécies do gênero *Linepithema*, pois *L. oblongum* (FJ496352.1) possui o mesmo tRNA^{Leu} que *L. micans*.

4.6 Análise Filogenética

A análise filogenética foi feita com a utilização de diversos programas, o primeiro deles foi o Network 4.5 (fluxus-engineering.com) utilizando o parâmetro Median Joining (BANDELT *et al.*, 1999), esse *software* gera o número e a frequência de haplótipos, ou mitótipos no caso desse estudo. Ele confirmou os 14 prováveis mitótipos das 34 populações estudadas de *L. micans* e dispôs a rede de haplótipos como mostra a Figura 7.

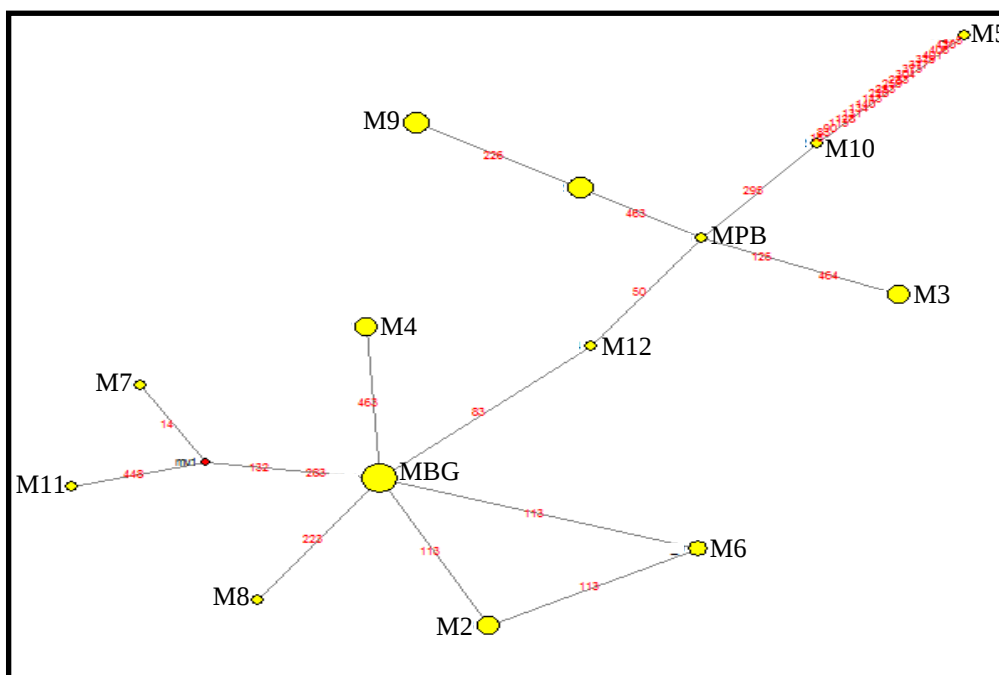


Figura 7: Rede de haplótipos do programa Network 4.5 (fluxus-engineering.com) utilizando o parâmetro Median Joining (BANDELT *et al.*, 1999).

As 34 sequências foram aglomeradas em 14 prováveis haplótipos/mitótipos, de acordo com a Tabela 4; com a rede de haplótipos gerada, infere-se a existência de dois possíveis grupos principais MBG e MPB, pois eles são os mais parcimoniosos em relação aos outros haplótipos, e deles os demais mitótipos teriam derivado. Entretanto não se pode afirmar com base apenas nesse estudo que esses dois mitótipos sejam realmente os ancestrais, pois para que isso fosse verdade eles teriam que possuir uma alta frequência em relação aos demais mitótipos, além de estarem na posição central, indicando possível irradiação; para que essa hipótese fosse confirmada seria necessário

estudar um número amostral maior de populações com várias repetições além da obtenção de uma maior frequência desses mitótipos em questão frente aos demais.

Sendo assim, do grupo MBG teriam derivado diretamente os mitótipos M4, M6, M2, M8, e de um mitótipo ancestral (ponto em vermelho) dois outros mitótipos, M7 e M11; é importante ressaltar que o programa aloca haplótipos ancestrais quando necessário de maneira que a rede de haplótipos fique o mais parcimoniosa possível, ou seja, a menor quantidade de passos para a evolução. No grupo MPB os mitótipos que possivelmente derivaram diretamente são M3, M9 e M10, M5 de onde teria derivado de M10 apesar do grande número de mutações (22 nucleotídeos de diferença em relação a MPB). M12 pode ter derivado tanto de MBG quanto de MPB, visto que está praticamente a mesma distância de ambos os grupos principais, e com as informações que esse programa fornece não é possível enquadrá-lo de maneira confiável em um dos grupos principais.

Com relação às cidades/localidades e seus respectivos mitótipos, não foi possível estabelecer correlação, pois, como visto pelo *software* Species Mapper (SPECIESMAPPER, 2012), programa onde se plota coordenadas geográficas dos pontos de coleta, não há um padrão na distribuição dos diferentes mitótipos, eles não estão restritos a uma determinada região ou cidade, muitos deles estão em diferentes cidades bem próximos a outros mitótipos, sem um padrão aparente de irradiação. Esse resultado pode ser um indício de que as mutações dos mitótipos atuais aconteceram várias vezes na evolução dessa formiga ou que simplesmente os ninhos são bastante extensos, entretanto essa informação não corrobora o caráter territorialista da espécie, visto que em localidades muito próximas há mais de um tipo de mitótipo ocorrendo e provavelmente deve haver a co-existência entre eles. É importante ressaltar que não se defende aqui que os diferentes mitótipos forrageiem juntos ou que haja reprodução entre eles, pois os resultados obtidos nesse estudo não oferecem suporte para tamanha afirmação.

Em seguida, todas as 34 sequências obtidas foram analisadas pelo *software* DAMBE (XIA & XIE, 2001), que faz a análise do sinal filogenético, relacionando as transições e transversões dos nucleotídeos. Os gráficos gerados estão ilustrados na Figura 8.

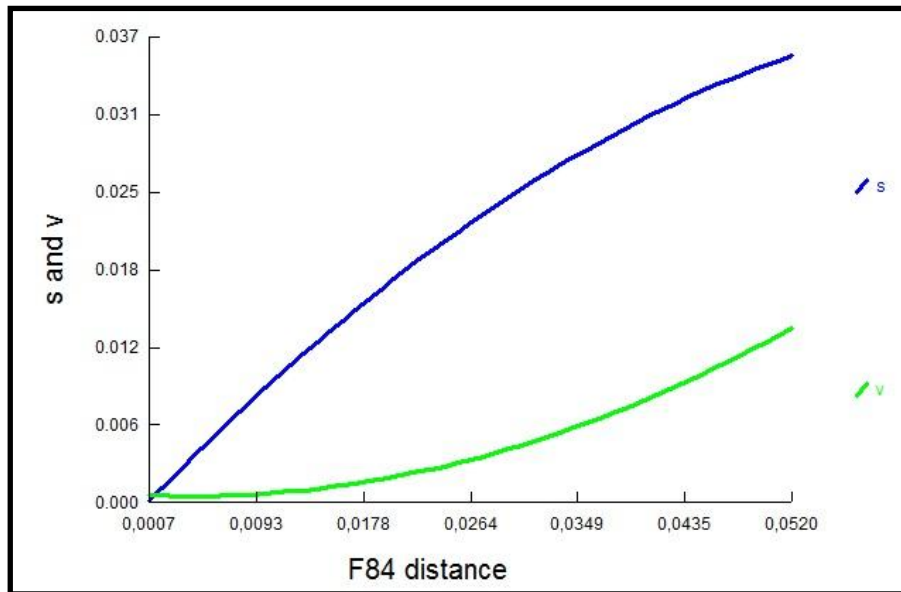


Figura 8: Gráfico de transições (s – linha azul) *versus* transversões (v – linha verde).

A partir da análise dos gráficos gerados verifica-se que há muito mais transições do que transversões, o que já é esperado, pois transições raramente geram mutações não silenciosas ou deletérias, ou seja, apesar da troca de nucleotídeo, o aminoácido codificado não se altera, consequentemente não alterando a proteína e sua expressão gênica; isso se dá pelo fato do código genético ser degenerado, sendo assim, transições permitem que mutações silenciosas sejam acumuladas no código genético, logo elas serão maiores em número do que as transversões. Por outro lado, transversões são mais comuns de gerarem mutações não silenciosas ou deletérias, ou seja, onde a troca de nucleotídeos altera o aminoácido consequentemente alterando a proteína expressada, esse tipo de mutação raríssima às vezes faz bem ao indivíduo, mas num geral elas são deletérias, as proteínas codificadas não funcionam perfeitamente e os indivíduos que as apresentam não deixam descendentes, logo era esperado que sua frequência fosse menor que a frequência das transições nas populações analisadas.

5. CONCLUSÕES

Com esse trabalho conclui-se que a espécie *Linepithema micans* está se espalhando rapidamente pela região Sul do Brasil e que possivelmente está numa situação de especiação, frente às diversas pressões seletivas que essa formiga deve estar sofrendo e pelo alto número de mitótipos encontrados em relação ao pequeno número amostral de populações estudadas.

Por sua vez, a utilização da ferramenta molecular *Barcode* com os genes mitocondriais Citocromo Oxidase 1, TRNA^{Leu}, e parte do Citocromo Oxidase 2 se mostrou um excelente e eficiente mecanismo na diferenciação dos mitótipos de *L. micans*, dados que podem vir a ser importantes para estudos futuros comparando os diferentes mitótipos e seus respectivos comportamentos no ambiente em que eles estão inseridos.

Por fim, mais estudos sobre essa formiga se fazem necessários nas diferentes áreas da Biologia, especialmente na área de Biologia Molecular, pois há pouquíssimos relatos bibliográficos sobre essa espécie que causa numerosos danos econômicos a diversas regiões do Brasil, principalmente quando associada a pérola-da-terra *Eurhizococcus brasiliensis*, e essa carência de informações dificulta a adoção de políticas de controle sanitário eficientes que venham a reduzir esse grande impacto econômico que apenas uma espécie de formiga é capaz de causar.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, K. L.; GREAVES, S. N. J.; RITCHIE, P. A.; LESTER, P. J. Behaviorally and genetically distinct populations of an invasive ant provide insight into invasion history and impacts on a tropical ant community. **Biological Invasions**, v. 9, p. 1573-1464, 2007.
- ALMEIDA, A. M.; FIGUEIREDO, R. A. Ants visit nectaries of *Epidendrum denticulatum* (Orchidaceae) in a brazilian rainforest: effects on herbivory and polinization. **Brazilian Journal of Biology**, v. 63, n. 4, p. 551-558, 2003.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- ANTWEB. **Linepithema humile**. 2007a. Disponível em: <<http://www.antweb.org/description.do?rank=species&genus=linepithema&name=humile>>. Acesso em: 20 jan. 2010.
- ANTWEB. **Linepithema micans**. 2007b. Disponível em: <<http://www.antweb.org/description.do?name=micans&genus=linepithema&rank=species&project=paraguayants>>. Acesso em: 20 jan. 2010.
- AVISE, J. C. **Molecular markers, natural history, and evolution**. Nova York: Chapman and Hall, 1994. 511p.
- AVISE, J. C. **Phylogeography: the history and formation of species**. Harvard University Press, London, 2001. 447p.
- AVISE, J. C.; ARNOLD, J.; BALL, R. M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NIGEL, J. E.; REEB, C. A.; SAUNDERS, N. C. Intraspecific Phylogeography – The Mitochondrial DNA Bridge Between Population-Genetics And Systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 18, p. 489-522, 1987.
- BACCI JR, 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. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 51, n. 3, p. 427-437, 2009.
- BAER, B.; ARMITAGE, S. A. O.; BOOMSMA, J. J. Sperm storage induces an immunity cost in ants. **Nature**, v. 441, p. 872-875, 2006.
- BALLARD, J. W. O.; WHITLOCK, M. The incomplete natural history of mitochondria. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 729-744, 2004.
- BANDELT, H. J.; FOSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining Networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, p. 37-48. 1999.

- BEHURA, S.K. Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. **Molecular Ecology**, v. 15, p. 3087-3113, 2006.
- BENSASSON, D.; ZHANG, D. X.; HARTL, D. L.; HEWITT, G. M. Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. **Trends Ecol. Evol.**, v. 16, p. 314-321, 2001.
- BOLTON, B. Synopsis and Classification of Formicidae. **Memoirs of the American Entomological Institute**, v. 71, p. 370, 2003.
- BOLTON, B.; ALPERT, G.; WARD, P.; NASKRECKI, P. **Bolton's Catalogue of the Ants of the World: 1758–2005**. Harvard University Press, Cambridge, 2006. CD-ROM
- BOTTON, M. HICKEL, E.; SORIA, S. J. Pragas. In: FAJARDO, T. M. V. (Org.). **Uva e Processamento: Fitossanidade, Embrapa Uva e Vinho** (Bento Gonçalves, RS). Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, 2003. 131p.
- BOTTON, M. HICKEL, E.; SORIA, S. J.; TEIXEIRA, T. **Bioecologia e controle da pérola-da-terra *Eurhizococcus brasiliensis* (Hempel 1922) (Hemiptera: Margarodidae) na cultura da videira**. Bento Gonçalves: Embrapa-CNPUV, 2000. 23 p.
- BOTTON, M.; HICKEL, E. R.; SORIA, S. J.; SCHUCK, E. Pérola-da-terra. In: SALVADORI, J. R.; ÁVILA, C. J.; SILVA, M. T. B. (Org.). **Pragas do solo no Brasil**. Passo Fundo: Embrapa, 2004. p. 457–476.
- BRADY, S. G.; SCHULTZ, T. R.; FISHER, B. L.; WARD, P. S. Evaluating alternative hypotheses for the early evolution and diversification of ants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 48, p. 18172-18177, 2006.
- BRANDÃO, C. R. F. Adendos ao Catálogo Abreviado das Formigas da Região Neotropical (Hymenoptera: Formicidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 35, n. 2, p. 319-412, 1991.
- BRANDÃO, C. R. F. Família Formicidae. In: BRANDÃO, C. R. F.; CANCELLO, E. M. (Org.). **Invertebrados terrestres**. São Paulo: FAPESP, 1999. p. 215-223.
- BROTHERS, D. J. Phylogeny and evolution of wasps, ants and bees (Hymenoptera, Chrysidoidea, Vespoidea and Apoidea). **Zoologica Scripta**, v. 28, n. 1-2, p. 233-249, 1999.
- BROWN, W. M., GEORGE, M.; WILSON, A. C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, p. 1967-1971, 1979.
- BUENO, O. C.; CAMPOS-FARINHA, A. E. C. Formigas urbanas 2: estratégias de controle. **Vetores & Pragas**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 5, p. 5-7, 1999.
- CAMPOS, M. C. G. **Comportamento de competição entre formigas urbanas frente a uma fonte de alimento**. 2004. 101f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2004.

- CHIOTIS, M.; JERMIIN, L. S.; CROZIER, R. H. A molecular framework for the phylogeny of the ants subfamily Dolichoderinae. **Mol Phylogen Evol**, v. 17, n. 1, p. 108-116, 2000.
- CLARK, D. B., GUAYASAMÍN, C., PAZMIÑO, O., DONOSO, C.; PÁES de VILLACÍS, Y. The tramp ant *Wasmannia auropunctata*: Autoecology and effects on ant diversity and distribution on Santa Cruz Island, Galapagos. **Biotropica**, v. 14, p. 196-207, 1982.
- D'ERRICO, I.; GADALETA, G.; SACCONI, C. Pseudogenes in metazoa: origin and features. **Brief. Funct Genom. Proteom.**, v. 3, p. 157-167, 2004.
- DEL VAL, E.; DIZO, R. Mirmecofilia: las plantas con ejército propio. **Interciencia**, v. 29, n. 12, p. 673-679, 2004.
- DELABIE J. H. C.; FERNÁNDEZ, F. Relaciones entre hormigas y “homópteros” (Hemiptera: Sternorrhyncha y Auchenorrhyncha). In: FERNÁNDEZ, F. (Org.). **Introducción a las hormigas de la región Neotropical**. Bogotá-COL: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos, 2003. p. 181-200.
- DELABIE J. H. C.; OSPINA, M.; ZABALA, G. Relaciones entre hormigas y plantas: una introducción. In: FERNÁNDEZ, F. (Org.). **Introducción a las hormigas de la región Neotropical**. Bogotá-COL: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos, 2003. p. 167-180.
- DELABIE, J. H. C. Trophobiosis between Formicidae and Hemiptera (Sternorrhyncha and Auchenorrhyncha): an overview. **Neotropical Entomology**, v. 30, p. 501-516, 2001.
- DIEHL-FLEIG, E. Formigas invasoras: o caso da formiga argentina *Linepithema humile* (Mayr 1868). **Acta Biológica Leopoldensia**, v. 28, n. 1, p. 5-9, 2006.
- DRESCHER, J.; BLÜTHGEN, N.; FELDHAAR, H. Population structure and intraspecific aggression in the invasive ant species *Anoplolepis gracilipes* in Malaysian Borneo. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 1453-1465, 2007.
- FERNÁNDEZ, F.; PALACIO, E. E. Sistemática y filogenia de las hormigas: breve repaso a propuestas. In: FERNÁNDEZ, F. (Org.). **Introducción a las hormigas de la región Neotropical**. Bogotá-COL: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos, 2003. p. 29-44.
- FISCHER, M. K.; SHINGELTON, A. W. Host plant and ants influence the honeydew sugar composition of aphids. **Functional Ecology**, v. 15, p. 544-550, 2001.
- FOREL, A. **A fauna de formigas do Brazil**. Pará: Typographia de Alfredo Silva & Cia, 1895. 113 p.
- FOWLER, H. G.; FORTI, L. C.; BRANDÃO, C. R. F.; DELABIE, J. H. C.; VASCONCELOS, H. L. Ecologia nutricional de formigas. In: PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. (Org.). **Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas**. São Paulo: Manole, 1991. p. 131-223.
- GONÇALVES, C. Saúvas do Sul e Centro do Brasil. **Boletim Fitossanitário**, São Paulo, n. 2, v. 3-4, p. 183-218, 1945.

GOOGLE EARTH. **Estado de Rio Grande do Sul - Brasil**. Disponível em: <<http://earth.google.com/>>. Acesso em 22 out. 2010.

GORDON, D. **Formigas em ação**: como se organiza uma sociedade de insetos. Rio de Janeiro: Jorge Zahar Editor, 2002. 144 p.

GRAZZIOTIN, F. G.; MONZEL, M.; ECHEVERRIGARAY, S.; BONATTO, S. L. Phylogeography of the Bothrops jararaca complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. **Molecular Ecology**, v. 15, n. 13, p. 3969-3982, 2006.

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

HARRISON, P. M.; MILBURN, D.; ZHANG, Z.; BERTONE, P.; GERSTEIN, M. Identification of pseudogenes in the Drosophila melanogaster genome. **Nucleic. Acid. Research.**, v. 31, p. 1033-1037, 2003.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London B.**, v. 270, p. 313-321, 2003a.

HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; WAARD, J. R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proc. R. Soc. Lond. B**, v. 270, p. 96-99, 2003b.

HICKEL, E. R. Reconhecimento, coleta, transporte e depósito de ninfas da pérola-da-terra *Eurhizococcus brasiliensis* (Hempel), pela formiga argentina *Linepithema humile* (Mayr). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 23, p. 285-290, 1994.

HIGGS, P. G.; JAMERSON, D.; JOW, H.; RATTRAY, M. The evolution of tRNA-Leu genes in animal mitochondrial genomes. **J. Mol. Evol.**, v. 57, p. 435-445, 2003.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The ants**. Cambridge: Harvard University Press, 1990. 732 p.

HOLWAY, D. A.; LACH, L.; SUAREZ, A. V.; TSUTSUI, N. D.; CASE, T. J. The causes and consequences of ant invasions. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 33, p. 181-233, 2002.

JAIME, N. G. Levantamentos mirmecofaunísticos em três ambientes antrópicos nos Estados de Goiás e Tocantins, Brasil. 2010. 130 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

JOHNSON, A. P.; SCHMID-HEMPEL, R.; SCHMID-HEMPEL, P. Female lines in social insects – a homage to the Croziers' mitochondria. **Myrmecological News**, v. 15, p. 101-108, 2011.

KANEHISA, M. A database for post-genome analysis. **Trends in Genetics**, v. 13, n. 9, p. 375-376, 1997.

KASPARI, M. Introducción a la ecología de las hormigas. In: FERNÁNDEZ, F. (Org.). **Introducción a las hormigas de la región Neotropical**. Bogotá-COL: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt, 2003. p. 97-112.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2 Ed. São Paulo: Sarvier, 1995. 839 p.

LOWE, T. M.; EDDY, S. R. tRNAscan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. **Nucleic Acids Research**, n. 25, p. 955-964, 1997.

MARCHLER-BAUER, A.; ANDERSON, J. B.; CHITSAZ, F.; DERBYSHIRE, M. K.; DEWEESE-SCOTT, C.; FONG, J. H.; GEER, L. Y.; GEER, R. C. GONZALES, N. R.; GWARDZ, M.; HE, S.; HURWITZ, D. I.; JACKSON, J. D.; KE, Z.; LACZYNSKI, C. J.; LIEBERT, C. A.; LIU, C.; LU, S.; MARCHLER, G. H.; MULLOKANDOV, M.; TASNEEM, A.; THANKI, N.; YAMASHITA, R. A.; ZHANG, D.; SHANG, N.; BRYANT, S. H. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 39, p. 225-229, 2011.

MARTINS JR, J. **Filogenia molecular de *Atta sexdens* (Myrmicinae: Attini) e investigação de pseudogenes em formigas da tribo Attii**. 2011. 64 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2011.

MARTINS JR, J.; SOLOMON, S. E.; MIKHEYEV, A. S.; MULLER, U. G.; ORTIZ, A.; BACCI, Jr. M. Nuclear mitochondrial-like sequences in ants: evidence from *Atta cephalotes* (Formicidae: Attini). **Insect Molecular Biology**, v. 16, n. 6, p. 777-784, 2007.

MARTINS, C. **Caracterização de espécies de *Linepithema micans* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) das regiões Sul e Sudeste do Brasil, através de análise de genes mitocondriais**. 2007. 42 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007a.

MARTINS, C. Ferramentas moleculares para o estudo de formigas: O caso do gênero *Linepithema* (FORMICIDAE: DOLICHODERINAE) do estado de São Paulo. **Biológico**, São Paulo, v. 69, suplemento 2, p. 61-64, 2007b.

MARTINS, C.; NONDILLO, A.; MARTINS, V. G.; BOTTON, M.; BUENO, O. C. Occurrence of Three Haplotypes of *Linepithema micans* (Forel) (Hymenoptera: Formicidae) in Southern Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 41, n. 1, p. 57-61, 2012.

MELLO, L. M. R. Cadastro vitícola. In: MELLO, L. M. R. (Org.). **Cadastro vitícola do Rio Grande do Sul – 1995/2000**. Bento Gonçalves: CD-ROM, 2001.

MORET, Y. Explaining the variable costs of the immune response: selection for specific versus non-specific immunity and facultative life history change. **Oikos**, v. 102, p. 213-216, 2003.

MORET, Y.; SCHMID-HEMPEL, P. Survival for immunity: the price of immune system activation for bumblebee workers. **Science**, v. 290, p. 1166-1168, 2000.

MORINI, M. S. C.; YASHIMA, M.; ZENE, F. Y.; SILVA, R. R.; JAHYNY, B. Observations on the *Acanthostichus quadratus* (Hymenoptera: Formicidae: Cerapachyinae) visiting underground bait and fruits of the *Syagrus romanzoffiana*, in an area of the Atlantic Forest, Brazil. **Sociobiology**, v. 43, p. 573-578, 2004.

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

PASSERA, L. Characteristic of tramp species. In: WILLIAMS, D. F. (Org.). **Exotic ants**: biology, impact and control of introduced species. Boulder, Colorado: Westview Press, 1994. p. 23-43.

PRYS-JONES, E. O. Foraging behaviour and the activity of substrate cycle enzymes in bumblebees. **Animal behaviour**, v. 34, p. 609-611, 1986.

QUEK, S. P.; DAVIES, S. J.; ASHTON, P. S.; ITINO, T.; PIERCE, N. E. The geography of diversification in mutualistic ants: a gene's-eye view into the Neogene history of Sundaland rain forests. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 2045-2063, 2007.

RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. N. Barcoding Bold: The barcode of life data system (www.barcodinglife.org). **Molecular Ecology Notes**, 2007.

ROMBEL, I. T.; SYKES, K. F.; RAYNER, S.; JOHNSTON, S. A. ORF-FINDER: a vector for high-throughput gene identification. **Gene**, v. 282, n. 1-2, p. 33-41, 2002.

SACCHETT, F.; BOTTON, M.; DIEHL, E. Ants species associated with the dispersal of *Eurhizococcus brasiliensis* (Hempel in Wille) (Hemiptera: Margarodidae) in vineyards of the Serra Gaúcha, Rio Grande do Sul, Brazil. **Sociobiology**, v. 54, n. 3, p. 943-954, 2009.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 2 Ed. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0-87969-309-6, 1989. 1659p.

SAUX, C.; FISCHER, B. L.; SPICER, G. S. Dracula ant phylogeny as inferred by nuclear 28S rDNA sequences and implications for ant systematics (Hymenoptera, Formicidae, Amblyoponinae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 33, p. 457-468, 2004.

SCHULTZ, T. R.; McGLYNN, T. P. The interactions of ants with other organisms. In: AGOSTINI, D.; MAJER, J. D.; ALONSO, L. E.; SCHULTZ, T. R. (Org.). **Ants**: Standard methods for measuring and monitoring. Washington: Smithsonian Institutional Press, 2000. 280 p.

SHOEMAKER, D. D.; AHRENS, M. E.; ROSS, K. G. Molecular phylogeny of fire ants of the *Solenopsis saevissima* species-group based on mtDNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 38, p. 200-215, 2006.

SIMON, C.; F RATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 87, p. 651-701, 1994.

SMITH, M. A.; FISHER, B. L.; HEBERT, P. D. N. DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar. **Philosophical Transactions of the Royal Society B.**, v. 360, p. 1825-1834, 2005.

SONG, H.; BUHAY, J. E.; WHITING, M. F.; CRANDALL, K. A. Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 36, p. 13486-13491, 2008.

SORENSEN, M. D.; QUINN, T. W. Numts: a challenge for avian systematics and population biology. **Auk**, v. 115, p. 214-221, 1998.

SORIA, S. J.; BRAGHINI, L. C. Controle químico da pérola-da-terra *Eurhizococcus brasiliensis* (Hempel in Wille, 1922) (Homoptera: Margarodidae) 2. Avaliação da bioeficácia do vamidothion na cultura da videira. **Entomologia y Vectores**, v. 6, n. 5, p. 555-561, 1999.

SORIA, S. J.; DAL CONTE, A. F. Bioecologia e controle das pragas da videira no Brasil. **Entomologia y Vectores**, v. 7, n. 1, p.73-102, 2000.

SPECIESMAPPER. Disponível em: < <http://splink.cria.org.br/mapper?criaLANG=en>>. Acesso em 01 ago. 2012.

STEIN, L. Genome Annotation: From sequence to biology. **Nature Reviews/Genetics**, v. 2, 2001.

SWOFFORD, D. L. **Phylogenetic analyses using parsimony, version 4.0b10**. Smithsonian Institution, Washington DC. 2003.

TAUTZ, D.; ARCTANDER, P.; MINELLI, A.; THOMAS, R. H.; VOGLER, A. P. A plea for DNA taxonomy. **Trends Ecol. Evol**, v. 18, p. 70-74, 2003.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gaps penalties and weight matrix choice. **Nuc. Ac. Res.**, v.22, p. 4673-4680, 1994.

TRIPLEHORN, C. A.; JOHNSON, N. J. **Borror and Delong's Introduction to the Study of Insects**. 7° Ed. Belmont: Thomson Brooks/Cole, 2005. 864 p.

URBANI, B. C.; BOLTON, B.; WARD, P. S. The internal phylogeny of ants (Hymenoptera: Formicidae). **Systematic Entomology**, v. 17, p. 301-329, 1992.

WATSON, J. D.; GILMAR, M.; WITKWSKY, J. Recombinant DNA and evolution. In: WATSON, J. D (Org.). **Recombinant DNA**. Nova York: Scientific American, 1993. p. 433-451.

WILD, A. L. Evolution of the Neotropical ant genus *Linepithema*. **Systematic Entomology**, v. 34, p. 49-62, 2009.

WILD, A. L. **Taxonomic revision of the ant genus *Linepithema* (Hymenoptera: Formicidae)**. Los Angeles: University of California Publications in Entomology, 2007. 151 p.

WILSON, E. O. **The insect societies**. Cambridge-Mass.: Belknap Press Harvard, 1971. 548 p.

WILSON, E. O.; B. HOLLOBLER. Eusociality: Origin and consequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 38, p. 13367-13371, 2005.

XIA, X.; XIE, Z. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. **Journal of Heredity**, v. 92, p. 371-73. 2001.

7. ANEXOS

Anexo 1: Sequências consenso das 34 populações estudadas com tamanho final de 489pb.

TITLE 1LM11 Cons.

```

1 TTATAAGATT AATCTTATTA ATTTTATTA TTTGAGAAGC TTTATCATCC AAACGTAAAA
61 TTATTTCTAT ATTTTATTA AATTCATCTC TAGAATGATT AAACATTATC CCACCAAAAA
121 ATCATAGTTA TGACGAAAT CCCTCAATTT TTTAATATGG CAGATAAGTG CAATGAATTT
181 AAACCTTCATA TATAAAAATA TTAATTTTAT ATTAATAATC AATACATGAA CTCTTTCCT
241 TCAAAATTCA AACTCTCCAA TTTATGATAT AATAATTTT TTTTCATGACT TTACCATAAT
301 AATTTTAAAT TTTATTACTT TAATAATTTT TTTTATTATA TTTAACTTA TTAATAATAA
361 ATTAATTGAT CGATTTTAC TTCAAGGACA TACAATTGAA CTAATTTGAA CTATTACCCC
421 AATATTTATT TTAATCTTTA TTGCTATCCC ATCCATTAAA ATCCTATATC TCCTGATGA
481 AATACATAA

```

//

TITLE 1LM15 Cons.

```

1 TTATAAGATT AATCTTATTA ATTTTATTA TTTGAGAAGC TTTATCATCC AAACGTAAAA
61 TTATTTCTAT ATTTTATTA AATTCATCTC TAGAATGATT AAACATTATC CCACCAAAAA
121 ATCATAGTTA TGACGAAAT CCCTCAATTT TTTAATATGG CAGATAAGTG CAATGAATTT
181 AAACCTTCATA TATAAAAATA TTAATTTTAT ATTAATAATC AATACATGAA CTCTTTCCT
241 TCAAAATTCA AACTCTCCAA TTTATGATAT AATAATTTT TTTTCATGACT TTACCATAAT
301 AATTTTAAAT TTTATTACTT TAATAATTTT TTTTATTATA TTTAACTTA TTAATAATAA
361 ATTAATTGAT CGATTTTAC TTCAAGGACA TACAATTGAA CTAATTTGAA CTATTACCCC
421 AATATTTATT TTAATCTTTA TTGCTATCCC ATCCATTAAA ATCCTATATC TCCTGATGA
481 AATACATAA

```

//

TITLE 1LM16 Cons.

```

1 TTATAAGATT AATCTTATTA ATTTTATTA TTTGAGAAGC TTTATCATCC AAACGTAAAA
61 TTATTTCTAT ATTTTATTA AATTCATCTC TAGAATGATT AAACATTATC CCACCAAAAA
121 ATCATAGTTA TGACGAAAT CCCTCAATTT TTTAATATGG CAGATAAGTG CAATGAATTT
181 AAACCTTCATA TATAAAAATA TTAATTTTAT ATTAATAATC AATACATGAA CTCTTTCCT
241 TCAAAATTCA AACTCTCCAA TTTATGATAT AATAATTTT TTTTCATGACT TTACCATAAT
301 AATTTTAAAT TTTATTACTT TAATAATTTT TTTTATTATA TTTAACTTA TTAATAATAA
361 ATTAATTGAT CGATTTTAC TTCAAGGACA TACAATTGAA CTAATTTGAA CTATTACCCC
421 AATATTTATT TTAATCTTTA TTGCTATCCC ATCCATTAAA ATCCTATATC TCCTGATGA
481 AATACATAA

```

//

TITLE 1LM21 Cons.

```

1 TTATAAGATT AATCTTATTA ATTTTATTA TTTGAGAAGC TTTATCATCT AAACGTAAAA
61 TTATTTCTAT ATTTTATTA AACTCATCTC TAGAATGATT AAACATTATC CCACCAAAAA
121 ATCATAGTTA TGACGAAAT CCCTCAATTT TTTAATATGG CAGATAAGTG CAATGAATTT
181 AAACCTTCATA TATAAAAATA TTAATTTTAT ATTAATAATC AATACATGAA CTCTTTCCT
241 TCAAAATTCA AACTCTCCAA TTTATGATAT AATAATTTT TTTTCATGACT TTACCATAAT
301 AATTTTAAAT TTTATTACTT TAATAATTTT TTTTATTATA TTTAACTTA TTAATAATAA
361 ATTAATTGAT CGATTTTAC TTCAAGGACA TACAATTGAA CTAATTTGAA CTATTACCCC
421 AATATTTATT TTAATCTTTA TTGCTATCCC ATCCATTAAA ATTCTATATC TCCTGATGA
481 AATACATAA

```

//

TITLE 1LM24 Cons.

```

1 TTATAAGATT AATCTTATTA ATTTTATTA TTTGAGAAGC TTTATCATCC AAACGTAAAA
61 TTATTTCTAT ATTTTATTA AATTCATCTC TAGAATGATT AAACATTATC CCGCAAAAAA
121 ATCATAGTTA TGACGAAAT CCCTCAATTT TTTAATATGG CAGATAAGTG CAATGAATTT
181 AAACCTTCATA TATAAAAATA TTAATTTTAT ATTAATAATC AATACATGAA CTCTTTCCT
241 TCAAAATTCA AACTCTCCAA TTTATGATAT AATAATTTT TTTTCATGACT TTACCATAAT
301 AATTTTAAAT TTTATTACTT TAATAATTTT TTTTATTATA TTTAACTTA TTAATAATAA
361 ATTAATTGAT CGATTTTAC TTCAAGGACA TACAATTGAA CTAATTTGAA CTATTACCCC

```

```

421 AATATTTATT TTAATCTTTA TTGCTATCCC ATCCATTAAA ATCCTATATC TCACTGATGA
481 AATACATAA
//

```

TITLE 1LM25 Cons.

```

1 TTATAAGATT AATCTTATTA ATTTTATTA TTTGAGAAGC TTTATCATCT AAACGTAAAA
61 TTATTTCTAT ATTTTTTTTA AACTCATCTC TAGAATGATT AAACATTATAC CCACCAAAAA
121 ATCATAGTTA TGACGAAATT CCCTCAATTT TTTAATATGG CAGATAAGTG CAATGAATTT
181 AAACCTCATA TATAAAAAATA TTACTTTTTT ATTAAAAATC AATACCTGAA CTCTTTCCT
241 TCAAAATTCA AACTCTCCAA TTTATGATAT AATAATTTTT TTTTCATGACT TTACCATAAT
301 AATTTTAATT TTTATTACTT TAATAATTTC TTTTATTATA TTTAACTTA TTAATAATAA
361 ATTAATTGAT CGATTTTTTAC TTCAAGGACA TACAATTGAA CTAATTTGAA CTATTACCCC
421 AATATTTATT TTAATCTTTA TTGCTATCCC ATCCATTAAA ATTCTATATC TCACTGATGA
481 AATACATAA
//

```

TITLE 1LM31 Cons.

```

1 TTATAAGATT AATCTTATTA ATTTTATTA TTTGAGAAGC TTTATCATCT AAACGTAAAA
61 TTATTTCTAT ATTTTTTTTA AACTCATCTC TAGAATGATT AAACATTATAC CCACCAAAAA
121 ATCACAGTTA TGACGAAATT CCCTCAATTT TTTAATATGG CAGATAAGTG CAATGAATTT
181 AAACCTCATA TATAAAAAATA TTACTTTTTT ATTAAAAATC AATACATGAA CTCTTTCCT
241 TCAAAATTCA AACTCTCCAA TTTATGATAT AATAATTTTT TTTTCATGACT TTACCATAAT
301 AATTTTAATT TTTATTACTT TAATAATTTC TTTTATTATA TTTAACTTA TTAATAATAA
361 ATTAATTGAT CGATTTTTTAC TTCAAGGACA TACAATTGAA CTAATTTGAA CTATTACCCC
421 AATATTTATT TTAATCTTTA TTGCTATCCC ATCCATTAAA ATCTTATATC TCACTGATGA
481 AATACATAA
//

```

TITLE 1LM32 Cons.

```

1 TTATAAGATT AATCTTATTA ATTTTATTA TTTGAGAAGC TTTATCATCT AAACGTAAAA
61 TTATTTCTAT ATTTTTTTTA AACTCATCTC TAGAATGATT AAACATTATAC CCACCAAAAA
121 ATCACAGTTA TGACGAAATT CCCTCAATTT TTTAATATGG CAGATAAGTG CAATGAATTT
181 AAACCTCATA TATAAAAAATA TTACTTTTTT ATTAAAAATC AATACATGAA CTCTTTCCT
241 TCAAAATTCA AACTCTCCAA TTTATGATAT AATAATTTTT TTTTCATGACT TTACCATAAT
301 AATTTTAATT TTTATTACTT TAATAATTTC TTTTATTATA TTTAACTTA TTAATAATAA
361 ATTAATTGAT CGATTTTTTAC TTCAAGGACA TACAATTGAA CTAATTTGAA CTATTACCCC
421 AATATTTATT TTAATCTTTA TTGCTATCCC ATCCATTAAA ATCTTATATC TCACTGATGA
481 AATACATAA
//

```

TITLE 1LM33 Cons.

```

1 TTATAAGATT AATCTTATTA ATTTTATTA TTTGAGAAGC TTTATCATCT AAACGTAAAA
61 TTATTTCTAT ATTTTTTTTA AACTCATCTC TAGAATGATT AAACATTATAC CCACCAAAAA
121 ATCATAGTTA TGACGAAATT CCCTCAATTT TTTAATATGG CAGATAAGTG CAATGAATTT
181 AAACCTCATA TATAAAAAATA TTACTTTTTT ATTAAAAATC AATACATGAA CTCTTTCCT
241 TCAAAATTCA AACTCTCCAA TTTATGATAT AATAATTTTT TTTTCATGACT TTACCATAAT
301 AATTTTAATT TTTATTACTT TAATAATTTC TTTTATTATA TTTAACTTA TTAATAATAA
361 ATTAATTGAT CGATTTTTTAC TTCAAGGACA TACAATTGAA CTAATTTGAA CTATTACCCC
421 AATATTTATT TTAATCTTTA TTGCTATCCC ATCCATTAAA ATCCTATATC TCACTGATGA
481 AATACATAA
//

```

TITLE 2LM11 Cons.

```

1 TTATAAGATT AATCTTATTA ATTTTATTA TTTGAGAAGC TTTATCATCC AAACGTAAAA
61 TTATTTCTAT ATTTTTTTTA AATTCTATCTC TAGAATGATT AAACATTATAC CCACCAAAAA
121 ATCATAGTTA TGACGAAATT CCCTCAATTT TTTAATATGG CAGATAAGTG CAATGAATTT
181 AAACCTCATA TATAAAAAATA TTACTTTTTT ATTAAAAATC AATACATGAA CTCTTTCCT
241 TCAAAATTCA AACTCTCCAA TTTATGATAT AATAATTTTT TTTTCATGACT TTACCATAAT
301 AATTTTAATT TTTATTACTT TAATAATTTC TTTTATTATA TTTAACTTA TTAATAATAA
361 ATTAATTGAT CGATTTTTTAC TTCAAGGACA TACAATTGAA CTAATTTGAA CTATTACCCC
421 AATATTTATT TTAATCTTTA TTGCTATCCC ATCCATTAAA ATTCTATATC TCACTGATGA
481 AATACATAA
//

```

TITLE 2LM12 Cons.

```

1 TTATAAGATT AATCTTATTA ATTTTATTA TTTGAGAAGC TTTATCATCC AAACGTAAAA
61 TTATTTCTAT ATTTTCTTA AATTCATCTC TAGAATGATT AAACATATTAC CCGCCAAAAA
121 ATCATAGTTA TGACGAAATT CCCTCAATTT TTTAATATGG CAGATAAGTG CAATGAATTT
181 AAACCTCATA TATAAAAATA TTACTTTTTT ATTAAAAATC AATACATGAA CTCTTTCCT
241 TCAAAATTCA AACTCTCCAA TTTATGATAT AATAATTTT TTTTCATGACT TTACCATAAT
301 AATTTTAATT TTTATTACTT TAATAATTTC TTTTATTATA TTTAACTTA TTAATAATAA
361 ATTAATTGAT CGATTTTAC TTCAAGGACA TACAATTGAA CTAATTGAA CTATTACCCC
421 AATATTTAT TTAATCTTTA TTGCTATCCC ATCCATTAAA ATCCTATATC TCACTGATGA
481 AATACATAA

```

//

TITLE 2LM13 Cons.

```

1 TTATAAGATT AATCTTATTA ATTTTATTA TTTGAGAAGC TTTATCATCC AAACGTAAAA
61 TTATTTCTAT ATTTTCTTA AATTCATCTC TAGAATGATT AAACATATTAC CCACCAAAAA
121 ATCATAGTTA TGACGAAATT CCCTCAATTT TTTAATATGG CAGATAAGTG CAATGAATTT
181 AAACCTCATA TATAAAAATA TTACTTTTTT ATTAAAAATC AATACATGAA CTCTTTCCT
241 TCAAAATTCA AACTCTCCAA TTTATGATAT AATAATTTT TTTTCATGACT TTACCATAAT
301 AATTTTAATT TTTATTACTT TAATAATTTC TTTTATTATA TTTAACTTA TTAATAATAA
361 ATTAATTGAT CGATTTTAC TTCAAGGACA TACAATTGAA CTAATTGAA CTATTACCCC
421 AATATTTAT TTAATCTTTA TTGCTATCCC ATCCATTAAA ATTCTATATC TCACTGATGA
481 AATACATAA

```

//

TITLE 2LM14 Cons.

```

1 TTATAAGATT AATCTTATTA ATTTTATTA TTTGAGAAGC TTTATCATCC AAACGTAAAA
61 TTATTTCTAT ATTTTCTTA AATTCATCTC TAGAATGATT AAACATATTAC CCACCAAAAA
121 ATCATAGTTA TGACGAAATT CCCTCAATTT TTTAATATGG CAGATAAGTG CAATGAATTT
181 AAACCTCATA TATAAAAATA TTACTTTTTT ATTAAAAATC AATACATGAA CTCTTTCCT
241 TCAAAATTCA AACTCTCCAA TTTATGATAT AATAATTTT TTTTCATGACT TTACCATAAT
301 AATTTTAATT TTTATTACTT TAATAATTTC TTTTATTATA TTTAACTTA TTAATAATAA
361 ATTAATTGAT CGATTTTAC TTCAAGGACA TACAATTGAA CTAATTGAA CTATTACCCC
421 AATATTTAT TTAATCTTTA TTGCTATCCC ATCCATTAAA ATCCTATATC TCACTGATGA
481 AATACATAA

```

//

TITLE 2LM15 Cons.

```

1 TTATAAGATT AATCTTATTA ATTTTATTA TTTGAGAAGC TTTATCATCT AAACGTAAAA
61 TTATTTCTAT ATTTTCTTA AACTCATCTC TAGAATGATT AAACATATTAC CCACCAAAAA
121 ATCACAGTTA TGACGAAATT CCCTCAATTT TTTAATATGG CAGATAAGTG CAATGAATTT
181 AAACCTCATA TATAAAAATA TTACTTTTTT ATTAAAAATC AATACATGAA CTCTTTCCT
241 TCAAAATTCA AACTCTCCAA TTTATGATAT AATAATTTT TTTTCATGACT TTACCATAAT
301 AATTTTAATT TTTATTACTT TAATAATTTC TTTTATTATA TTTAACTTA TTAATAATAA
361 ATTAATTGAT CGATTTTAC TTCAAGGACA TACAATTGAA CTAATTGAA CTATTACCCC
421 AATATTTAT TTAATCTTTA TTGCTATCCC ATCCATTAAA ATCTTATATC TCACTGATGA
481 AATACATAA

```

//

TITLE 2LM23 Cons.

```

1 TTATAAGATT AATCCTATTA ATTTTATTA TTTGAGAAGC TTTATCATCT AAACGTAAAA
61 TTATTTCTAT ATTTTCTTA AATTCATCTT TAGAATGATT AAACATATTAC CCCCCAAAAA
121 ATCATAGATA CGATGAAATC CCTTCAATTT TTTAATATGG CAGATAAGTG CAATGAATTT
181 AAACCTCATA TATAAAAATA TTACTTTTTT ATTAAAAATC AATACATGAA CTCTTTCCT
241 TCAAAATTCA AATTCTCCTA TTTATGATAT AATAATTTT TTCCATGACT TTACTATAAT
301 AATCTTAATT TTTATTACTT TAATAATTTC TTTTATTATA TTTAACTTA TTAATAATAA
361 ATTAATTGAT CGTTTTCTTC TTCAAGGACA TACAATTGAA TTAATCTGAA CTATTACCCC
421 AATATTTATC TTAATCTTTA TTGCTATCCC ATCCATTAAA ATCCTATATC TCACAGATGA
481 AATACATAA

```

//

TITLE 2LM24 Cons.

```

1 TTATAAGATT AATCTTATTA ATTTTATTA TTTGAGAAGC TTTATCATCT AAACGTAAAA
61 TTATTTCTAT ATTTTATTA AACTCATCTC TAGAATGATT AAACATTATC CCACCAAAAA
121 ATCATAGTTA TGACGAAATT CCCTCAATTT TTTAATATGG CAGATAAGTG CAATGAATTT
181 AAACCTTCATA TATAAAAAATA TTACTTTTTT ATTAAAAATC AATACATGAA CTCTTTTACT
241 TCAAAATTCA AACTCTCCAA TTTATGATAT AATAATTTTT TTTTATGACT TTACCATAAT
301 AATTTTAAAT TTTATTACTT TAATAATTTT TTTTATTATA TTTAACTTA TTAATAATAA
361 ATTAATTGAT CGATTTTAC TTCAAGGACA TACAATTGAA CTAATTTGAA CTATTACCCC
421 AATATTTAT TTAATCTTTA TTGCTATCCC ATCCATTAAA ATTCTATATC TCACTGATGA
481 AATACATAA

```

//

TITLE 3LM11 Cons.

```

1 TTATAAGATT AATCTTATTA ATTTTATTA TTTGAGAAGC TTTATCATCC AAACGTAAAA
61 TTATTTCTAT ATTTTATTA AATTTCATCTC TAGAATGATT AAACATTATC CCTCCAAAAA
121 ATCATAGTTA TGACGAAATT CCCTCAATTT TTTAATATGG CAGATAAGTG CAATGAATTT
181 AAACCTTCATA TATAAAAAATA TTACTTTTTT ATTAAAAATC AATACATGAA CTCTTTTACT
241 TCAAAATTCA AACTCTCCAA TTTATGATAT AATAATTTTT TTTTATGACT TTACCATAAT
301 AATTTTAAAT TTTATTACTT TAATAATTTT TTTTATTATA TTTAACTTA TTAATAATAA
361 ATTAATTGAT CGATTTTAC TTCAAGGACA TACAATTGAA CTAATTTGAA CTATTACCCC
421 AATATTTAT TTAATCTTTA TTGCTATCCC ATCCATTAAA ATCCTATATC TCACTGATGA
481 AATACATAA

```

//

TITLE 3LM12 Cons.

```

1 TTATAAGATT AATTTTATTA ATTTTATTA TTTGAGAAGC TTTATCATCC AAACGTAAAA
61 TTATTTCTAT ATTTTATTA AATTTCATCTC TAGAATGATT AAACATTATC CCACCAAAAA
121 ATCATAGTTA TAACGAAATT CCCTCAATTT TTTAATATGG CAGATAAGTG CAATGAATTT
181 AAACCTTCATA TATAAAAAATA TTACTTTTTT ATTAAAAATC AATACATGAA CTCTTTTACT
241 TCAAAATTCA AACTCTCCAA TTTATGATAT AATAATTTTT TTCCATGACT TTACCATAAT
301 AATTTTAAAT TTTATTACTT TAATAATTTT TTTTATTATA TTTAACTTA TTAATAATAA
361 ATTAATTGAT CGATTTTAC TTCAAGGACA TACAATTGAA CTAATTTGAA CTATTACCCC
421 AATATTTAT TTAATCTTTA TTGCTATCCC ATCCATTAAA ATCCTATATC TCACTGATGA
481 AATACATAA

```

//

TITLE 3LM13 Cons.

```

1 TTATAAGATT AATCTTATTA ATTTTATTA TTTGAGAAGC TTTATCATCC AAACGTAAAA
61 TTATTTCTAT ATTTTATTA AATTTCATCTC TAGAATGATT AAACATTATC CCACCAAAAA
121 ATCATAGTTA TGACGAAATT CCCTCAATTT TTTAATATGG CAGATAAGTG CAATGAATTT
181 AAACCTTCATA TATAAAAAATA TTACTTTTTT ATTAAAAATC AATACATGAA CTCTTTTACT
241 TCAAAATTCA AACTCTCCAA TTTATGATAT AATAATTTTT TTTTATGACT TTACCATAAT
301 AATTTTAAAT TTTATTACTT TAATAATTTT TTTTATTATA TTTAACTTA TTAATAATAA
361 ATTAATTGAT CGATTTTAC TTCAAGGACA TACAATTGAA CTAATTTGAA CTATTACCCC
421 AATATTTAT TTAATCTTTA TTGCTATCCC ATCCATTAAA ATCCTATATC TCACTGATGA
481 AATACATAA

```

//

TITLE 3LM14 Cons.

```

1 TTATAAGATT AATCTTATTA ATTTTATTA TTTGAGAAGC TTTATCATCC AAACGTAAAA
61 TTATTTCTAT ATTTTATTA AATTTCATCTC TAGAATGATT AAACATTATC CCTCCAAAAA
121 ATCATAGTTA TGACGAAATT CCCTCAATTT TTTAATATGG CAGATAAGTG CAATGAATTT
181 AAACCTTCATA TATAAAAAATA TTACTTTTTT ATTAAAAATC AATACATGAA CTCTTTTACT
241 TCAAAATTCA AACTCTCCAA TTTATGATAT AATAATTTTT TTTTATGACT TTACCATAAT
301 AATTTTAAAT TTTATTACTT TAATAATTTT TTTTATTATA TTTAACTTA TTAATAATAA
361 ATTAATTGAT CGATTTTAC TTCAAGGACA TACAATTGAA CTAATTTGAA CTATTACCCC
421 AATATTTAT TTAATCTTTA TTGCTATCCC ATCCATTAAA ATCCTATATC TCACTGATGA
481 AATACATAA

```

//

TITLE 3LM15 Cons.

```

1 TTATAAGATT AATCTTATTA ATTTTATTA TTTGAGAAGC TTTATCATCC AAACGTAAAA
61 TTATTTCTAT ATTTTATTA AATTTCATCTC TAGAATGATT AAACATTATC CCACCAAAAA
121 ATCATAGTTA TGACGAAATT CCCTCAATTT TTTAATATGG CAGATAAGTG CAATGAATTT

```

```

181 AAACCTTCATA TATAAAAATA TTACTTTTTT ATTAAAAATC AATACATGAA CTCTTTCCT
241 TCAAAATTCA AACTCTCCAA TTTATGATAT AATAATTTTT TTTTCATGACT TTACCATAAT
301 AATTTTAAAT TTTATTACTT TAATAATTTT TTTTATTATA TTTAACTTA TTAATAATAA
361 ATTAATTGAT CGATTTTAC TTCAAGGACA TACAATTGAA CTAATTTGAA CTATTACCCC
421 AATATTTAT TTAATCTTTA TTGCTATCCC ATCCATTAAA ATTCTATATC TCACTGATGA
481 AATACATAA

```

//

TITLE 3LM21 Cons.

```

1 TTATAAGATT AATCTTATTA ATTTTATTA TTTGAGAAGC TTTATCATCC AAACGTAAAA
61 TTATTTCTAT ATTTTCTTA AATTCATCTC TAGAATGATT AAACATTAC CCACCAAAAA
121 ATCATAGTTA TGACGAAAT CCCTCAATTT TTTAATATGG CAGATAAGTG CAATGAATTT
181 AAACCTTCATA TATAAAAATA TTACTTTTTT ATTAAAAATC AATACATGAA CTCTTTCCT
241 TCAAAATTCA AACTCTCCAA TTTATGATAT AATAATTTTT TTTTCATGACT TTACCATAAT
301 AATTTTAAAT TTTATTACTT TAATAATTTT TTTTATTATA TTTAACTTA TTAATAATAA
361 ATTAATTGAT CGATTTTAC TTCAAGGACA TACAATTGAA CTAATTTGAA CTATTACCCC
421 AATATTTAT TTAATCTTTA TTGCTATCCC ATCCATTAAA ATCCTATATC TCACTGATGA
481 AATACATAA

```

//

TITLE 4LM21 Cons.

```

1 TTATAAGATT AATCTTATTA ATTTTATTA TTTGAGAAGC TTTATCATCC AAACGTAAAA
61 TTATTTCTAT ATTTTCTTA AATTCATCTC TAGAATGATT AAACATTAC CCACCAAAAA
121 ATCATAGTTA TGACGAAAT CCCTCAATTT TTTAATATGG CAGATAAGTG CAATGAATTT
181 AAACCTTCATA TATAAAAATA TTACTTTTTT ATTAAAAATC AACACATGAA CTCTTTCCT
241 TCAAAATTCA AACTCTCCAA TTTATGATAT AATAATTTTT TTTTCATGACT TTACCATAAT
301 AATTTTAAAT TTTATTACTT TAATAATTTT TTTTATTATA TTTAACTTA TTAATAATAA
361 ATTAATTGAT CGATTTTAC TTCAAGGACA TACAATTGAA CTAATTTGAA CTATTACCCC
421 AATATTTAT TTAATCTTTA TTGCTATCCC ATCCATTAAA ATCCTATATC TCACTGATGA
481 AATACATAA

```

//

TITLE 4LM22 Cons.

```

1 TTATAAGATT AATCTTATTA ATTTTATTA TTTGAGAAGC TTTATCATCT AAACGTAAAA
61 TTATTTCTAT ATTTTCTTA AACTCATCTC TAGAATGATT AAACATTAC CCACCAAAAA
121 ATCATAGTTA TGACGAAAT CCCTCAATTT TTTAATATGG CAGATAAGTG CAATGAATTT
181 AAACCTTCATA TATAAAAATA TTACTTTTTT ATTAAAAATC AATACCTGAA CTCTTTCCT
241 TCAAAATTCA AACTCTCCAA TTTATGATAT AATAATTTTT TTTTCATGACT TTACCATAAT
301 AATTTTAAAT TTTATTACTT TAATAATTTT TTTTATTATA TTTAACTTA TTAATAATAA
361 ATTAATTGAT CGATTTTAC TTCAAGGACA TACAATTGAA CTAATTTGAA CTATTACCCC
421 AATATTTAT TTAATCTTTA TTGCTATCCC ATCCATTAAA ATTCTATATC TCACTGATGA
481 AATACATAA

```

//

TITLE 4LM23 Cons.

```

1 TTATAAGATT AATCTTATTA ATTTTATTA TTTGAGAAGC TTTATCATCT AAACGTAAAA
61 TTATTTCTAT ATTTTCTTA AACTCATCTC TAGAATGATT AAACATTAC CCACCAAAAA
121 ATCATAGTTA TGACGAAAT CCCTCAATTT TTTAATATGG CAGATAAGTG CAATGAATTT
181 AAACCTTCATA TATAAAAATA TTACTTTTTT ATTAAAAATC AATACATGAA CTCTTTCCT
241 TCAAAATTCA AACTCTCCAA TTTATGATAT AATAATTTTT TTTTCATGACT TTACCATAAT
301 AATTTTAAAT TTTATTACTT TAATAATTTT TTTTATTATA TTTAACTTA TTAATAATAA
361 ATTAATTGAT CGATTTTAC TTCAAGGACA TACAATTGAA CTAATTTGAA CTATTACCCC
421 AATATTTAT TTAATCTTTA TTGCTATCCC ATCCATTAAA ATTCTATATC TCACTGATGA
481 AATACATAA

```

//

TITLE 4LM24 Cons.

```

1 TTATAAGATT AATCTTATTA ATTTTATTA TTTGAGAAGC TTTATCATCT AAACGTAAAA
61 TTATTTCTAT ATTTTCTTA AACTCATCTC TAGAATGATT AAACATTAC CCACCAAAAA
121 ATCATAGTTA TGACGAAAT CCCTCAATTT TTTAATATGG CAGATAAGTG CAATGAATTT
181 AAACCTTCATA TATAAAAATA TTACTTTTTT ATTAAAAATC AATACATGAA CTCTTTCCT
241 TCAAAATTCA AACTCTCCAA TTTATGATAT AATAATTTTT TTTTCATGACT TTACCATAAT
301 AATTTTAAAT TTTATTACTT TAATAATTTT TTTTATTATA TTTAACTTA TTAATAATAA

```

```

361 ATTAATTGAT CGATTTTAC TTCAAGGACA TACAATTGAA CTAATTTGAA CTATTACCCC
421 AATATTTATT TTAATCTTTA TTGCTATCCC ATCCATTAAA ATTCTATATC TCAGTGATGA
481 AATACATAA

```

//

TITLE 4LM25 Cons.

```

1 TTATAAGATT AATCTTATTA ATTTTATTA TTTGAGAAGC TTTATCATCT AAACGTAAAA
61 TTATTTCTAT ATTTTATTA AACTCATCTC TAGAATGATT AAACATTATC CCACCAAAAA
121 ATCATAGTTA TGACGAAAT CCCTCAATTT TTTAATATGG CAGATAAGTG CAATGAATTT
181 AAACCTTCATA TATAAAAAATA TTACTTTTTT ATTAAAAATC AATACATGAA CTCTTTCCT
241 TCAAAATTCA AACTCTCCAA TTTATGATAT AATAATTTT TTTTCATGACT TTACTATAAT
301 AATTTTAATT TTTATTACTT TAATAATTTT TTTTATTATA TTTAACTTA TTAATAATAA
361 ATTAATTGAT CGATTTTAC TTCAAGGACA TACAATTGAA CTAATTTGAA CTATTACCCC
421 AATATTTATT TTAATCTTTA TTGCTATCCC ATCCATTAAA ATCCTATATC TCAGTGATGA
481 AATACATAA

```

//

TITLE 5LM11 Cons.

```

1 TTATAAGATT AATCTTATTA ATTTTATTA TTTGAGAAGC TTTATCATCC AAACGTAAAA
61 TTATTTCTAT ATTTTATTA AACTCATCTC TAGAATGATT AAACATTATC CCACCAAAAA
121 ATCATAGTTA TGACGAAAT CCCTCAATTT TTTAATATGG CAGATAAGTG CAATGAATTT
181 AAACCTTCATA TATAAAAAATA TTACTTTTTT ATTAAAAATC AATACATGAA CTCTTTCCT
241 TCAAAATTCA AACTCTCCAA TTTATGATAT AATAATTTT TTTTCATGACT TTACCATAAT
301 AATTTTAATT TTTATTACTT TAATAATTTT TTTTATTATA TTTAACTTA TTAATAATAA
361 ATTAATTGAT CGATTTTAC TTCAAGGACA TACAATTGAA CTAATTTGAA CTATTACCCC
421 AATATTTATT TTAATCTTTA TTGCTATCCC ATCCATTAAA ATCCTATATC TCAGTGATGA
481 AATACATAA

```

//

TITLE 5LM12 Cons.

```

1 TTATAAGATT AATCTTATTA ATTTTATTA TTTGAGAAGC TTTATCATCT AAACGTAAAA
61 TTATTTCTAT ATTTTATTA AACTCATCTC TAGAATGATT AAACATTATC CCACCAAAAA
121 ATCATAGTTA TGACGAAAT CCCTCAATTT TTTAATATGG CAGATAAGTG CAATGAATTT
181 AAACCTTCATA TATAAAAAATA TTACTTTTTT ATTAAAAATC AATACCTGAA CTCTTTCCT
241 TCAAAATTCA AACTCTCCAA TTTATGATAT AATAATTTT TTTTCATGACT TTACCATAAT
301 AATTTTAATT TTTATTACTT TAATAATTTT TTTTATTATA TTTAACTTA TTAATAATAA
361 ATTAATTGAT CGATTTTAC TTCAAGGACA TACAATTGAA CTAATTTGAA CTATTACCCC
421 AATATTTATT TTAATCTTTA TTGCTATCCC ATCCATTAAA ATTCTATATC TCAGTGATGA
481 AATACATAA

```

//

TITLE 5LM13 Cons.

```

1 TTATAAGATT AATCTTATTA ATTTTATTA TTTGAGAAGC TTTATCATCC AAACGTAAAA
61 TTATTTCTAT ATTTTATTA AACTCATCTC TAGAATGATT AAACATTATC CCGCAAAAA
121 ATCATAGTTA TGACGAAAT CCCTCAATTT TTTAATATGG CAGATAAGTG CAATGAATTT
181 AAACCTTCATA TATAAAAAATA TTACTTTTTT ATTAAAAATC AATACATGAA CTCTTTCCT
241 TCAAAATTCA AACTCTCCAA TTTATGATAT AATAATTTT TTTTCATGACT TTACCATAAT
301 AATTTTAATT TTTATTACTT TAATAATTTT TTTTATTATA TTTAACTTA TTAATAATAA
361 ATTAATTGAT CGATTTTAC TTCAAGGACA TACAATTGAA CTAATTTGAA CTATTACCCC
421 AATATTTATT TTAATCTTTA TTGCTATCCC ATCCATTAAA ATCCTATATC TCAGTGATGA
481 AATACATAA

```

//

TITLE 5LM23 Cons.

```

1 TTATAAGATT AATCTTATTA ATTTTATTA TTTGAGAAGC TTTATCATCC AAACGTAAAA
61 TTATTTCTAT ATTTTATTA AACTCATCTC TAGAATGATT AAACATTATC CCACCAAAAA
121 ATCATAGTTA TGACGAAAT CCCTCAATTT TTTAATATGG CAGATAAGTG CAATGAATTT
181 AAACCTTCATA TATAAAAAATA TTACTTTTTT ATTAAAAATC AATACATGAA CTCTTTCCT
241 TCAAAATTCA AACTCTCCAA TTTATGATAT AATAATTTT TTTTCATGACT TTACCATAAT
301 AATTTTAATT TTTATTACTT TAATAATTTT TTTTATTATA TTTAACTTA TTAATAATAA
361 ATTAATTGAT CGATTTTAC TTCAAGGACA TACAATTGAA CTAATTTGAA CTATTACCCC
421 AATATTTATT TTAATCTTTA TTGCTATCCC ATCCATTAAA ATCCTATATC TCAGTGATGA
481 AATACATAA

```

//

TITLE 5LM31 Cons.

```

1 TTATAAGATT AATCTTATTA ATTTTATTA TTTGAGAAGC TTTATCATCT AAACGTAAAA
61 TTATTTCTAT ATTTTATTA AACTCATCTC TAGAATGATT AAACATTAC CCACCAAAAA
121 ATCATAGTTA TGACGAAAT CCCTCAATTT TTTAATATGG CAGATAAGTG CAATGAATTT
181 AAACCTCATA TATAAAAAATA TTAATTTTATTT ATTAATAATC AATACCTGAA CTCTTTTCACT
241 TCAAAATTCA AACTCTCCAA TTTATGATAT AATAATTTT TTTTATGACT TTACCATAAT
301 AATTTTAATT TTTATTACTT TAATAATTTT TTTTATTATA TTTAAACTTA TTAATAATAA
361 ATTAATTGAT CGATTTTAC TTCAAGGACA TACAATTGAA CTAATTTGAA CTATTACCCC
421 AATATTTATT TTAATCTTTA TTGCTATCCC ATCCATTAAA ATTCTATATC TCACTGATGA
481 AATACATAA

```

//

TITLE 5LM34 Cons.

```

1 TTATAAGATT AATCTTATTA ATTTTATTA TTTGAGAAGC TTTATCATCC AAACGTAAAA
61 TTATTTCTAT ATTTTATTA AATTATCTC TAGAATGATT AAACATTAC CCACCAAAAA
121 ATCATAGTTA TAACGAAAT CCCTCAATTT TTTAATATGG CAGATAAGTG CAATGAATTT
181 AAACCTCATA TATAAAAAATA TTAATTTTATTT ATTAATAATC AATACATGAA CTCTTTTCACT
241 TCAAAATTCA AACTCTCCAA TTTATGATAT AATAATTTT TTCCATGACT TTACCATAAT
301 AATTTTAATT TTTATTACTT TAATAATTTT TTTTATTATA TTTAAACTTA TTAATAATAA
361 ATTAATTGAT CGATTTTAC TTCAAGGACA TACAATTGAA CTAATTTGAA CTATTACCCC
421 AATATTTATT TTAATCTTTA TTGCTATTCC ATCCATTAAA ATCCTATATC TCACTGATGA
481 AATACATAA

```

//

TITLE 5LM35 Cons.

```

1 TTATAAGATT AATCTTATTA ATTTTATTA TTTGAGAAGC TTTATCATCC AAACGTAAAA
61 TTATTTCTAT ATTTTATTA AACTCATCTC TAGAATGATT AAACATTAC CCACCAAAAA
121 ATCATAGTTA TGACGAAAT CCCTCAATTT TTTAATATGG CAGATAAGTG CAATGAATTT
181 AAACCTCATA TATAAAAAATA TTAATTTTATTT ATTAATAATC AATACATGAA CTCTTTTCACT
241 TCAAAATTCA AACTCTCCAA TTTATGATAT AATAATTTT TTTTATGACT TTACCATAAT
301 AATTTTAATT TTTATTACTT TAATAATTTT TTTTATTATA TTTAAACTTA TTAATAATAA
361 ATTAATTGAT CGATTTTAC TTCAAGGACA TACAATTGAA CTAATTTGAA CTATTACCCC
421 AATATTTATT TTAATCTTTA TTGCTATCCC ATCCATTAAA ATCCTATATC TCACTGATGA
481 AATACATAA

```

//