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

**FILOGENIA MOLECULAR DE *Atta sexdens* (MYRMICINAE: ATTINI) E
INVESTIGAÇÃO DE PSEUDOGENES EM FORMIGAS DA TRIBO ATTINI**

JOAQUIM MARTINS JUNIOR

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

Fevereiro - 2011

JOAQUIM MARTINS JUNIOR

**Filogenia Molecular de *Atta sexdens* (Myrmicinae: Attini) e investigação
de pseudogenes em formigas da tribo Attini**

**Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia 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
(Biologia Celular e Molecular).**

Orientador: Prof. Dr. Maurício Bacci Junior

Co-orientador: Prof. Dr. Henrique Ferreira

**Rio Claro
2011**

595.796 Martins Júnior, Joaquim
M386f Filogenia molecular de *Atta sexdens* (Myrmicinae: Attini)
e investigação de pseudogenes em formigas da tribo Attini /
Joaquim Martins Júnior. - Rio Claro : [s.n.], 2011
68 f. : il., figs., gráfs., tabs., mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Maurício Bacci Júnior
Co-Orientador: Henrique Ferreira

1. Formiga. 2. Formigas cortadeiras. 3. Numts. 4.
Evolução. 5. DNA nuclear e mitocondrial. 6. Especiação. I.
Título.

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

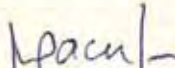
TÍTULO: Filogenia Molecular de *Atta sexdens* (Myrmicinae: Attini) e investigação de pseudogenes em formigas da tribo Attini

AUTOR: JOAQUIM MARTINS JUNIOR


ORIENTADOR: Prof. Dr. MAURÍCIO BACCI JUNIOR

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. HENRIQUE FERREIRA

Aprovado 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 de Rio Claro


Profa. Dra. MARCIA REGINA BROCHETTO BRAGA


Departamento de Biologia / Instituto de Biociências de Rio Claro


Prof. Dr. SERGIO RUSSO MATIOLI

Depto. de Genética e Biologia Evolutiva / USP


Prof. Dr. REINALDO OTAVIO A. ALVES BRITO

Departamento de Genética e Evolução / Universidade Federal de Sao Carlos


Prof. Dr. JOÃO MIGUEL DE BARROS ALEXANDRINO

Depto de Ciências Biológicas / UNIFESP-São Paulo

Data da realização: 25 de fevereiro de 2011.

Resumo

A formiga *Atta sexdens* possui ampla distribuição no continente Americano e é praga de várias culturas como citrus e cana-de-açúcar. Devido aos aspectos divergentes das últimas revisões morfológicas, ainda existem dúvidas se *Atta sexdens* é uma única espécie ou um grupo de espécies crípticas. Estudos baseados em caracteres moleculares são mais precisos para avaliar a filogenia de populações ou linhagens ainda próximas. Entretanto, esses estudos são comumente atrapalhados no seu curso pela co-amplificação de *numts*, que são pseudogenes nucleares de origem mitocondrial e que podem levar a interpretação equivocada de relações filogenética se analisados conjuntamente com o seu homólogo mitocondrial. Por isso, no presente trabalho, nós apresentamos dois capítulos, em que no primeiro nós analisamos 100 ninhos de *A. sexdens* coletados ao longo do continente Americano, a fim de verificar a existência de espécies crípticas, bem com o tempo de divergência entre elas, avaliando a utilidade de marcadores nucleares e mitocondriais em estudos desta natureza; e no segundo capítulo nós investigamos a presença dos *numts* N1 e N2 em formigas de diversos gêneros da tribo Attini e caracterizamos um terceiro tipo de *numt*, que denominamos N3. Os resultados do primeiro capítulo, a partir de análises filogenéticas, utilizando genes nucleares e genes mitocondriais mostram que *Atta sexdens* pode ser dividida em três espécies distintas corroborando Gonçalves (1965). As topologias das árvores filogenéticas obtidas apresentaram bom suporte para seus ramos, mas divergiram em relação a qual evento cladogenético ocorreu primeiro dentro de *A. sexdens*. A região IGS mitocondrial, devido à sua característica hipervariável, parece trazer ruído à análise filogenética. As análises de divergência indicam uma origem de *A. sexdens* por volta de 10 milhões de anos atrás, relativamente precoce em relação à origem das formigas cortadeiras. Os resultados do segundo capítulo confirmaram nossa hipótese de que N1

teve uma origem mais antiga, por volta de 10 milhões de anos, e que N2 e N3 originaram-se mais recentemente, há cerca de 5,5 e 7 milhões de anos, respectivamente. N2 e N3 parecem não estar submetidos a fortes pressões seletivas, pois o teste para seleção purificadora não foi significativo. Ao contrário, N1 pode ter adquirido alguma função importante, como modulação de algum gene, após sua transferência para o núcleo, pois os resultados de seleção purificadora foram significativos. N1 está presente em 8 espécies, sendo 7 do gênero *Atta* e outra do gênero *Acromyrmex*, enquanto N2 e N3 parecem ser exclusivos de *A. cephalotes* e *A. sexdens*. Nossos resultados ainda fornecem evidências sobre a origem do gênero *Atta* e sugerem que N1 possa ser utilizado como fonte de calibração como um marcador molecular fóssil.

Palavras-chave: *Atta sexdens*, filogenia, tempo de divergência, numts, DNA nuclear e mitocondrial

Abstract

The ant *Atta sexdens* is widely spread in the Americas and is a pest of several crops like citrus and cane sugar. Due to the divergent aspects of the last morphological revisions, there are still doubts whether *Atta sexdens* is a single species or a group of cryptic species. Studies based on molecular characters are more accurate for assessing the phylogeny of populations or lineages even close. However, these studies are often hampered in their course by co-amplification of numts, which are nuclear pseudogenes of mitochondrial origin and that can lead to misinterpretation of phylogenetic relationships were analyzed together with its counterpart in mitochondria. Therefore, in this paper, we present two chapters, where we looked first at 100 nests of *A. sexdens* collected throughout the American continent in order to verify the existence of cryptic species, together with the time of divergence between them, assessing the utility of nuclear and mitochondrial markers in studies of this nature, and in the second chapter we investigated the presence of numts N1 and N2 in various ant genera of the attine tribe and characterized a third type of numt, we called N3. The results of the first chapter, from phylogenetic analysis, using nuclear genes and mitochondrial genes show that *Atta sexdens* can be divided into three distinct species corroborating Gonçalves (1965). The topologies of phylogenetic trees obtained showed good support for their branches, but they differed as to which event occurred first within cladogenic *A. sexdens*. The IGS region mitochondrial hypervariable due to its characteristic, seems to bring noise to the phylogenetic analysis. Analyses indicate a source of divergence of *A. sexdens* around 10 million years ago, relatively early in relation to the origin of the leaf-cutter ants results of the second chapter. The results confirmed our hypothesis that N1 had a more ancient origin, around 10 million years, and N2 and N3 originated most recently, an estimated 5.5 million and 7 years respectively. N2 and N3 do not seem to

be under strong selective pressures, because the test for purifying selection was not significant. In contrast, N1 may have acquired some important function, such as modulation of a gene transcription after its transfer to the nucleus, because the results indicated significant purifying selection. N1 is present in eight species, seven of the genus *Atta* and another of the genus *Acromyrmex*, while N2 and N3 seem to be unique to *A. cephalotes* and *A. sexdens*, respectively. Our results also provide evidence about the origin of the genus *Atta* and suggest that N1 can be used as a calibration source such as a molecular fossil.

Keywords: *Atta sexdens*, phylogeny, divergence time, *numts*, nuclear and mitochondrial DNA

"Quando nada parece dar certo, vou ver o cortador de pedras martelando sua rocha talvez 100 vezes sem que uma única rachadura apareça. Mas na centésima primeira martelada a pedra se abre em duas, e eu sei que não foi aquela que conseguiu isso, mas todas as que vieram antes."

(Jacob Riis)

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Joaquim e Geralda, por estarem sempre ao meu lado nos momentos mais felizes e naqueles um pouco tristes, me incentivando e apoiando. Vocês são os meus espelho e esteio.

À minha esposa Clécia pelo amor,
companheirismo e dedicação,
pelas alegrias e momentos de
felicidade e pelas palavras de
incentivo e apoio incondicional.

Te amo!

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu guia e mentor espiritual, por nunca me deixar perder o foco: da vida e do trabalho.

À Universidade Estadual Paulista – UNESP, campus Rio Claro e à Coordenação de Pós-Graduação do Instituto de Biociências pela oportunidade de realização do curso;

Ao Prof. Dr. Maurício Bacci Júnior pela orientação e confiança na capacidade de trabalho de seus alunos, amizade e incentivo.

Ao Prof. Dr. Henrique Ferreira pelas valorosas contribuições durante esta tese e pela amizade.

Aos demais professores do Centro de Estudos de Insetos Sociais que sempre foram solícitos durante o desenvolvimento desta Tese e contribuindo com seu conhecimento e amizade.

Aos amigos do CEIS, obrigado por me receberem e acolherem tão bem, fazendo com que me sentisse parte dessa família científica; e pelos momentos de alegria, festinhas, cervejas, risadas e conversas descontraídas;

À todos os amigos e parceiros de trabalho do Laboratório, com os quais aprendi muito sobre ciência e sobre a vida. Obrigado pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho, pelas risadas e brincadeiras e, sobretudo, pela amizade.

Ao André e a Paula, grande amigos desde o início desta caminhada, muito obrigado pela ajuda durante o trabalho e por sua amizade.

Aos funcionários do CEIS pelo apoio amizade e ajuda, e por estarem sempre prontos a nos socorrer e nos dar uma palavra de incentivo. Especialmente a Necis, uma segunda mãe para todos nós e uma amiga para vida toda! Obrigado, uai!

Ao Scott, Sasha, Aline Silva, Cintia “Bahia”, Adriana Ortiz, Prof. Dr. Dionísio Link e a todos pelo material coletado que possibilitou a realização desse trabalho. Principalmente aos amigos e companheiros do LEM e do Laboratório de Microbiologia que, em inúmeras vezes, ajudaram na execução desse trabalho;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram com a realização deste trabalho

E as formigas saúvas que “deram” suas vidas por este trabalho;

À CAPES, CNPq e FAPESP pelo auxílio financeiro concedido para a execução do trabalho.

Sumário

Capítulo 1: Introdução Geral.....	3
As formigas	3
Tribo Attini.....	4
Atíneas Derivadas: <i>Atta</i> Fabricius.....	7
Filogeografia, Sistemática Filogenética, DNA mitocondrial e DNA nuclear	8
Pseudogenes	12
Capítulo 2: Filogenia Molecular de <i>Atta sexdens</i> (Myrmicinae: Attini) baseada em genes mitocondriais e nucleares	16
Resumo.....	16
Introdução	17
Materiais e Métodos	20
Visão geral	20
Extração de DNA	24
Amplificação gênica.....	25
Sequenciamento de DNA.....	26
Análises Filogenéticas.....	26
Análise de Divergência	27
Análises populacionais e caracterização das sequências.....	29
Resultados	29
Discussão.....	39
Conclusões	41
Capítulo 3: Investigação de Pseudogenes em formigas da tribo Attini (Formicidae: Myrmicinae)	42
Resumo.....	42
Introdução	43
Materiais e Métodos	46
Material biológico	46
Extração de DNA	46
Amplificação dos loci mitocondriais e <i>numts</i>	47
Clonagem	47

Sequenciamento	48
Análises das sequências	48
Análises de tempo de divergência dos <i>numts</i>	49
Resultados e Discussão	50
Conclusões	57
Referências Bibliográficas	57

Capítulo 1: Introdução Geral

As formigas

As formigas (Hymenoptera: Formicidae) são insetos verdadeiramente sociais (Wilson, 1971; Hölldobler & Wilson, 1990; Wilson & Hölldobler, 2005), pois apresentam (i) cuidado com a prole, (ii) castas estéreis e reprodutivas, (iii) divisão de trabalho e (iv) sobreposição de gerações. Atualmente, estima-se que existam mais de 24.000 espécies de formigas agrupadas em 23 subfamílias (Bolton, 2005), das quais 12.627 já haviam sido descritas até Janeiro de 2011 (Agosti, 2005 - *consultado em 15/01/2011*). Esses insetos constituem um grupo monofilético cujas principais sinapomorfias são a (i) presença de pecíolo e pós-pecíolo, (ii) glândula metapleural e (iii) antenas divididas em camadas (Fernández & Palacio, 2003), o que possibilita distingui-las de qualquer outro himenóptero. Elas surgiram no período Cretáceo entre 115 e 135 milhões de anos atrás (Brady *et al.*, 2006) e estão distribuídas por todo planeta, exceto os polos (Hölldobler & Wilson, 1990), são capazes de nidificar no solo, entre rochas, árvores, folhas e ambientes urbanos (Diehl-Fleig, 1995), constituem de 15 a 20% da biomassa animal nas florestas tropicais e desempenham papéis-chaves em vários ecossistemas (Wilson & Hölldobler, 2005). As formigas são os principais predadores de outros invertebrados em diversos ecossistemas e herbívoros em várias comunidades em regiões neotropicais. Várias espécies participam de simbioses com plantas, com outros artrópodes e também fungos e outros microrganismos (Hölldobler & Wilson, 1990; Mueller *et al.*, 2005; Brady *et al.*, 2006). Algumas linhagens de formigas desenvolveram a capacidade de cultivar fungos, coletar sementes, parasitar outras formigas e também escravizá-las (Hölldobler & Wilson, 1990; Rabeling & Bacci Jr, 2010), o que aguça a curiosidade dos cientistas e do público em geral. Estes últimos dois casos, assim com o inquilinismo, caracterizam-se pela perda secundária da condição eussocial em que muitas espécies têm uma redução drástica da casta operária

ou sua completa eliminação (Buschinger, 1986, 2009; Rabeling & Bacci Jr, 2010). Outras peculiaridades de algumas formigas é o hábito de praticar agricultura. Esta prática surgiu mais de uma vez no decorrer da evolução dos animais de forma independente e podemos citar como exemplo, além das formigas cultivadoras de fungo, os cupins, alguns grupos de besouros e a própria espécie humana (Mueller *et al.*, 2005; Schultz & Brady, 2008).

Tribo Attini

As formigas cultivadoras de fungos (Formicidae: Myrmicinae) pertencem à tribo Attini, que reúne formigas com a habilidade de cultivar fungos e utilizá-los como alimento para suas larvas (Silva *et al.*, 2003). Estima-se que a origem do hábito de cultivar fungos ocorreu há cerca de 50 milhões de anos, período no qual o ancestral da tribo mudou de um comportamento caçador para o de cultivador de fungos (Mueller *et al.*, 2001; Schultz & Brady, 2008). Atualmente, a tribo Attini compreende 13 gêneros com aproximadamente 230 espécies descritas (Brandão & Mayhé-Nunes, 2001; Schultz & Brady, 2008). A tribo é encontrada somente no continente americano, porém abrangendo uma ampla área geográfica, desde o norte da Argentina até o sul dos Estados Unidos. Dentro dessa faixa, as formigas Attini ocorrem nos mais diversos biomas, como, por exemplo, a floresta amazônica (Solomon *et al.*, 2008) e em ambientes extremos, como o deserto (Weber *et al.*, 1972).

O trabalho de Weber (1972) indica a Região Amazônica como o provável centro de origem das atíneas e das primeiras especiações resultantes da dispersão ou isolamento geográfico, de modo que a presença dessas formigas na Argentina e em países vizinhos sugere que tenha havido o surgimento precoce de alguns gêneros que dispuseram de tempo suficiente para se ajustar às condições climáticas dos habitats secundários.

As rotas de migração sugeridas para as Attini a partir de seu centro de origem na Região Amazônica são (i) para o Norte da América do Sul, através do litoral, onde a Bacia Amazônica se comunica com o litoral do Caribe ou através do interior da Bacia Amazônica; (ii) para o Sul através da Bacia do Rio Paraná; e (iii) para América Central após o fechamento do istmo do Panamá, por onde as formigas atingiram a América do Norte (Weber, 1972). Estas rotas supostamente levaram o gênero *Atta* a expandir sua ocupação para o Sul dos Estados Unidos, para o Nordeste, Sudeste e Sul do Brasil, Argentina, Leste do Paraguai e todo o Uruguai, sendo algumas destas regiões no Sul propostas como centros secundários de evolução da tribo na América do Sul (Kusnezov, 1963).

As formigas cultivadoras de fungos foram anteriormente classificadas em dois grandes grupos filogenéticos (Attini basais e Attini derivadas) definidos segundo características do DNA mitocondrial e da morfologia das larvas (Schultz & Meier, 1995; Wetterer *et al.*, 1998). Recentemente, Schultz e Brady (2008) reconstruíram a história evolutiva das formigas Attini utilizando dados de sequenciamento de quatro genes nucleares bem como dados de fósseis preservados em âmbar. Com base nesse estudo, cinco novos agrupamentos foram definidos, os quais representam os diferentes tipos de agricultura dessas formigas. Os assim chamados sistemas de agricultura incluem: (i) a agricultura das formigas Attini primitivas (gêneros *Apterostigma*, *Cyphomyrmex*, *Mycocepurus* e *Myrmicocrypta*, entre outros); (ii) agricultura de algumas espécies do gênero *Apterostigma* que cultivam fungos filogeneticamente diferentes das demais formigas; (iii) um grupo de formigas que cultivam leveduras (ex: formigas do grupo *Cyphomyrmex rimosus*); (iv) a agricultura das formigas Attini derivadas (gêneros *Sericomyrmex* e *Trachymyrmex*) e, finalmente (v) um grupo dentro

das formigas derivadas que se adaptaram ao cultivo de fungos especializados (gêneros de formigas cortadeiras, *Atta* e *Acromyrmex*).

Dentre as diferenças morfológicas, comportamentais e de arquitetura dos ninhos que também auxiliam na divisão em grupos, o que chama a atenção dos pesquisadores é o tipo de substrato que as formigas utilizam para cultivar o fungo simbiote (Weber *et al.*, 1972). As *Attini* primitivas utilizam carcaças e fezes secas de insetos, além de matéria vegetal morta, como fonte de alimento para o fungo enquanto que as *Attini* derivadas e principalmente as formigas cortadeiras, cortam folhas e flores frescas para servir de substrato para o fungo; nesse caso, essas formigas podem se tornar pragas agrícolas quando presentes em áreas de culturas. Em ambos os casos a matriz de substrato juntamente com o micélio do fungo forma uma estrutura denominada “jardins de fungos”. Tal estrutura é construída pelas formigas em câmaras subterrâneas (nas espécies que constroem ninhos profundos) ou podem ser encontradas bem próximas à superfície do solo (Hölldobler & Wilson, 1990; Schultz & Brady, 2008).

Além do fornecimento de nutrientes, as formigas estimulam o desenvolvimento do fungo, tanto pela contínua implantação de fragmentos de micélio no substrato vegetal, quanto pela secreção de enzimas provenientes do fluido fecal das operárias (Weber, 1972; Pousen & Boosma, 2005). Recentemente, Licht *et al* (2010) demonstraram que durante os 50 milhões de anos de parceria entre o fungo simbiote e as formigas houve uma transição no perfil de atividade enzimática no jardim de fungos, passando de um aparato enzimático especializado na digestão de parede celular da material vegetal nas atíneas basais para um aparato especializado na digestão de proteínas e amido nas atíneas derivadas e nas cortadeiras, respectivamente. Há ainda trabalhos que mostram que existem outros fungos e bactérias presentes nessa relação

simbiótica além da formiga e o fungo cultivado por ela (Rodrigues *et al.*, 2008; Mueller *et al.*, 2010, 2010b).

Atíneas Derivadas: *Atta* Fabricius

O grupo das atíneas derivadas compreende os gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, conhecidas como formigas cortadeiras, que juntos somam 40 espécies (Bolton, 2005) e cultivam uma mesma espécie de fungo (*Leucoagaricus gongylophorus*) (Silva-Pinhati *et al.*, 2004; Mueller *et al.*, 2010) que serve como fonte primária de alimento para as larvas e fonte de enzimas para os indivíduos adultos (Silva *et al.*, 2003).

Após 50 anos desde a última revisão do gênero *Atta* baseada puramente em morfologia, feita por Borgmeier (1959) e Gonçalves (1942), estudo recente baseado em genes nucleares e mitocondriais aponta que as formigas do gênero *Atta* compreendem quatro subgêneros (ATTA, EPIATTA, NEOATTA e ARCHEATTA) e 15 espécies: *Atta sexdens*, *Atta opaciceps*, *A. robusta*, *A. capiguara*, *A. laevigata*, *A. cephalotes*, *A. insularis*, *A. mexicana*, *A. texana*, *A. saltensis*, *A. colombica*, *A. bisphaerica*, *A. vollenweideri*, *A. cubana* e *A. goiana* (Bacci Jr *et al.*, 2009). Algumas dessas espécies ocorrem regionalmente, enquanto outras têm uma distribuição mais abrangente. Neste último caso, *Atta laevigata* (F. Smith, 1858), *Atta sexdens* (Forel, 1908) e *Atta cephalotes* (L., 1758) destacam-se por atingirem grandes extensões da América do Sul. Por esta razão estas espécies são modelos importantes para estudos sobre a evolução das atíneas (Weber, 1972) e origem da biodiversidade no bioma amazônico (Solomon *et al.*, 2008).

As formigas do gênero *Atta* são consideradas pragas em várias regiões do Brasil e do mundo (Cherrett, 1986a,b,c; Robinson & Fowler, 1982; Hernandez *et al.*, 1999; Varon *et al.*, 2007, Bacci Jr, 2009). Os prejuízos econômicos causados por essas formigas chegam a milhões de dólares por ano no Texas (Cameron & Riggs, 1985) e

cerca de US\$130 milhões por ano no estado de São Paulo (Fowler *et al.*, 1986). Apesar de serem consideradas pragas, as formigas do gênero *Atta* são importantes para os ecossistemas em que ocorrem e desempenham importante papel na ciclagem de nutrientes por trazerem matéria orgânica para os ninhos (Hölldobler & Wilson, 1990; Moutinho *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2003; Wirth *et al.*, 2003; Sternberg *et al.*, 2007). Embora o trabalho de Bacci Jr *et al* (2009) tenha comprovado a monofilia do gênero *Atta* e elucidado a filogenia e o posicionamento das espécies dentro do gênero, as relações filogenéticas das subespécies de *A. sexdens* e também de *A. robusta* com estas permanece sem esclarecimento.

Filogeografia, Sistemática Filogenética, DNA mitocondrial e DNA nuclear

Desde as viagens de Darwin e Wallace à publicação de seus trabalhos é clara a preocupação em entender como os eventos biogeográficos desempenham seu papel na evolução, surgimento e/ou desaparecimento das espécies (Futuyma, 2005). Um ramo da Biogeografia, a Filogeografia se preocupa em entender e interpretar o modo pelo qual os processos e eventos históricos relacionados à demografia populacional influenciaram a distribuição atual dos organismos num escopo baseado em perfis genéticos e análise de evidências fósseis (Avice, 2001). Dispersão, vicariância e extinção são os três principais processos históricos responsáveis pela distribuição atual dos organismos. Alguns autores consideram que existam dois tipos de dispersão: contínua em que as espécies migram ao longo de um hábitat mais ou menos contínuo e favorável e a dispersão que ocorre subsequentemente à transposição de uma barreira. Já vicariância é a separação de uma população ou populações de determinada espécie pelo surgimento de uma barreira devido a alterações geológicas, climáticas ou no próprio hábitat (Avice, 2001; Futuyma, 2005). É importante salientar que a princípio a distribuição de uma espécie não pode ser atribuída isoladamente a um desses eventos apenas, mas a uma combinação deles.

A partir do trabalho de Hennig (1966), que revolucionou a classificação dos organismos à luz da sistemática filogenética, inúmeros métodos baseados nessa teoria foram e vêm sendo criados. Os métodos filogenéticos são a base para os estudos filogeográficos e é cada vez mais crescente o número de estudos que visam reconstruir a evolução e explicar a distribuição atual das espécies bem como entender como a diversidade atual surgiu e quais os pontos de sua origem (Avise, 2001; Futuyma, 2005; Brady *et al.*, 2006; Graziotin *et al.*, 2006; Aguiar-Jr *et al.*, 2007; Schultz & Brady, 2008; Solomon *et al.*, 2008; Njabo *et al.*, 2008; Bacci Jr *et al.*, 2009; Weiss *et al.*, 2011). Estes trabalhos utilizam diferentes métodos de reconstrução filogenética, modelagem espacial, predição e datação de eventos cladogenéticos passados a partir de observações do cenário atual.

O DNA mitocondrial animal apresenta características interessantes do ponto de vista de estudos evolutivos. Possui herança exclusivamente maternal, o que impede a recombinação, além de alta taxa evolutiva e polimorfismos intraespecíficos, tornando-o uma molécula eficaz em estudos de filogeografia entre populações de uma espécie ou espécies próximas (Avise *et al.*, 1987, Graziotin *et al.*, 2006; Bacci Jr *et al.*, 2009). Algumas hipóteses foram lançadas para tentar explicar a alta taxa evolutiva do DNA mitocondrial: (i) relaxamento funcional, uma vez que não codifica proteínas diretamente envolvidas em sua própria replicação e transcrição e por codificar apenas 13 polipeptídeos, é capaz de tolerar certa falta de precisão durante a tradução; (ii) a alta taxa de mutação devido à ineficiência dos mecanismos de reparo, exposição a radicais livres no interior da mitocôndria e (iii) não estar associado a proteínas histônicas como o DNA nuclear (Avise, 2001). Por outro lado, problemas como heteroplasmia, ligação paternal, casos de não neutralidade e uma taxa variável de evolução de suas sequências

podem ser considerados fatores que limitam aplicação do mtDNA para fins de estudos evolutivos (Awise, 2001; Ballard & Whitlock, 2004).

Estruturalmente, o mtDNA é uma pequena molécula de DNA (16 – 20kb) de fita dupla e fechada circularmente através de ligações covalentes, que possui 13 genes codificadores de subunidades de enzimas envolvidas na cadeia transportadora de elétrons ou síntese de ATP (Moritz *et al.*, 1987), 2 de RNA ribossomal e 22 de RNA transportador, totalizando 37 genes, alguns pequenos espaçadores intergênicos (IGS) (Awise, 2001), além de uma região controladora de replicação e transcrição, conhecida com D-loop (em vertebrados e equinodermos) ou Região rica em A+T nos invertebrados (Awise *et al.*, 1987). Estudos recentes baseados em códigos de barra de DNA a partir de genes mitocondriais demonstraram a existência de espécies crípticas em ratos (Robbins *et al.*, 2007), anchovas (Borsa, 2002), oligoquetos (Sturmbauer *et al.*, 1999), ascídias (Tarjuelo *et al.*, 2001) e lepidópteros (Hebert *et al.*, 2004; Behere *et al.*, 2007), o que reafirma este marcador como boa ferramenta para os estudos desta natureza.

A filogenia se tornou uma ferramenta essencial para a compreensão de variação de sequências moleculares. Na última década, grande progresso tem sido feito no desenvolvimento de métodos para inferir filogenias e estimar datas de divergência entre espécies, populações e genes. Esta evolução tem sido caracterizada pelo aumento, tanto na complexidade dos modelos utilizados para descrever a evolução de sequências de DNA, quanto na sofisticação dos métodos para analisar estes novos modelos. No entanto, um problema bem conhecido neste tipo de abordagem, e que causa dificuldades nos estudos desta natureza é que variação da taxa de substituição entre as linhagens. Para inferir as datas de divergência, é conveniente assumir uma taxa constante de evolução para a árvore com um todo (Zuckerhandl & Pauling,

1962). Porém, esta premissa tem sido constantemente desafiada por vários conjuntos de dados que apresentam consideráveis desvios da evolução por relógio molecular (Britten, 1986; Ayala, 1997; Hasegawa & Kishino, 1989), e variações da taxa entre as linhagens podem levar a erros de interpretação dos tempos de divergências como da própria inferência filogenética. Devido a tais problemas, as abordagens utilizando relógio molecular foram abandonadas por algum tempo, perdendo espaço para abordagens baseadas em evolução molecular dos ramos independente. Assim, o problema para inferir filogenias com maior confiança foi resolvido, mas permanecia quando se desejava inferir taxas de variação molecular e tempos de divergência (Drummond *et al.*, 2006).

Uma alternativa que vem sendo empregada recentemente é o relógio molecular relaxado. Uma de suas variantes é relógio molecular local em que as taxas de variação molecular são estimadas separadamente para os ramos desejados. Mas ainda há o inconveniente de se delimitar esses ramos quando o conjunto de dados é grande e não existe certeza sobre a filogenia do grupo (Rambaut & Bromham, 1998; Yoder & Zang, 2000; Drummond *et al.*, 2006).

Recentemente, vários estudos têm aplicado abordagens Bayesianas baseadas na teoria do relógio molecular relaxado para inferir o tempo de divergência entre espécies, linhagens gênicas e populações (Grazziotin, *et al.*, 2006; Brady *et al.*, 2006; Schultz & Brady, 2008; Rabeling *et al.*, em prep.) e suprir as deficiências e dificuldades das abordagens tradicionais. Esse modelo assume uma autocorrelação entre as taxas de variação de cada ramo da árvore, de forma que é possível inferir *a priori* a taxa de cada ramo a partir de uma distribuição paramétrica em função da taxa do ramo principal. Assim, aplica-se uma distribuição lognormal com a variância escalonada relativamente ao comprimento dos ramos, em unidades de tempo, o que implica que a taxa evolutiva

muda de forma contínua ao longo do ramo. Ou ainda, utiliza-se uma distribuição exponencial, o que implicaria em mudanças ocorrendo nos nós dos ramos, sendo o tamanho dessas alterações independente do tamanho do ramo.

Visto que os modelos Bayesianos de relógio molecular relaxado se mostraram úteis em inúmeros estudos recentes, incluindo formigas (Brady *et al.* 2006; Schultz & Brady, 2008), nós empregamos esta abordagem para (i) estimar o tempo de divergência entre as populações de *A. sexdens* e (ii) as diferentes linhagens de pseudogenes.

Pseudogenes

Como primeira definição, pseudogenes são cópias de genes que não produzem uma cadeia de proteínas completamente funcional. Sua sequência aparentemente codificadora é, na verdade, distorcida por mutações, no decorrer do processo evolutivo, que causam mudanças de fase de leitura e códon de terminação prematuros, impedindo sua expressão (Harrison *et al.*, 2003; D'Errico *et al.*, 2004). Entretanto, essa definição vem sendo revisada e reformulada, o que traz novas evidências sobre a possibilidade de pseudogenes adquirirem novas funções durante o processo evolutivo (D'Errico *et al.*, 2004).

Atualmente são considerados três tipos de pseudogenes, definidos assim devido à forma como são formados e ao local na célula onde estão presentes. Os pseudogenes não processados são aqueles que encontrados no cromossomo juntamente com outros genes funcionais. Eles ainda contêm seus íntrons e sequências regulatórias, que os flanqueiam, assim como os genes funcionais. São originados por um mecanismo de duplicação que produz uma cópia extra do gene que, se não for necessária, pode acumular mutações sem danos ao organismo, embora também sejam gerados durante o mecanismo processo de permutação cromossômica (*crossing-over*). Um segundo grupo é aquele formado por pseudogenes processados, originados por retro transposição, em

três estágios. O RNA é sintetizado a partir de um DNA molde e processado (perde íntrons), dando origem ao mRNA. Por fim, esse mRNA vai funcionar como um novo molde para a fase de transcrição reversa, produzindo um DNA dupla hélice que é inserido em outro cromossomo. O terceiro e último grupo é o dos pseudogenes nucleares de origem mitocondrial, do inglês *numts* (*Nuclear mitochondrial-like sequences*), que são genes mitocondriais foram transferidos para o núcleo e vêm perdendo sua função ao longo da evolução, embora apresentem uma similaridade alta em relação ao gene de origem. Acredita-se que essa transferência de genes mitocondriais para o núcleo seja algo que ocorre desde a integração dos simbioses que deram origem às mitocôndrias e falhas na fidelidade das cópias transferidas é que originam esses pseudogenes no núcleo (D'Errico et al, 2004).

Os *Numts* são sequências nucleares de origem mitocondrial, que apresentam um alto grau de similaridade com as sequências de mtDNA, que podem ter migrado para o núcleo por transferência direta de DNA (Lopez *et al.*, 1994) ou mediada por RNA (Nugent & Palmer, 1991) em que, possivelmente, elementos transponíveis ou virais estão envolvidos (Farrelly & Butow, 1983; Zullo *et al.*, 1991; Ossario *et al.*, 1991; D'Errico *et al.*, 2004). A maioria dos *Numts* vem sendo descrita em vertebrados, particularmente em mamíferos e aves e relatos sobre sua presença em peixes são praticamente inexistentes (D'Errico *et al.*, 2004), embora isso provavelmente seja devido à atenção desproporcionalmente maior dispensada a esses dois primeiros táxons em relação aos demais grupos. Mesmo os organismos largamente estudados como a *Drosophila melanogaster* e o nematódeo *Caenorhabditis elegans*, aparentemente apresentavam poucos *Numts* (Bensasson *et al.*, 2001). Recentemente, Harrison *et al.* (2003) identificaram aproximadamente 100 pseudogenes em *Drosophila melanogaster*, dos quais pelo menos seis seriam pseudogenes processados (originados por

transferência de RNA). Martins *et al* (2007) caracterizaram os primeiros pseudogenes em formigas. Seus resultados mostraram que formigas cortadeiras da espécie *Atta cephalotes* (Myrmicinae: Attini) apresentam dois *numts*: N1 e N2. Utilizando sequências mitocondriais e destes *numts*, esses pesquisadores reconstruíram a filogenia desses genes e demonstraram que possivelmente N1 se originou primeiro, talvez antes do surgimento do próprio gênero *Atta* enquanto N2 parece ser fruto de uma transferência recente para o núcleo, pois ele está restrito à espécie *A. cephalotes*. Nos últimos anos, uma grande diversidade de *numts* (Lopez *et al.*, 1994) vem sendo observada em um número cada vez maior de organismos como aves, bactérias, peixes, vertebrados e insetos (Bensasson *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2008; Sawamura *et al.*, 2008; Hlaing *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009; Wattam *et al.*, 2009; Thibud-Nissen *et al.*, 2009).

A documentação e caracterização desses pseudogenes são de fundamental importância para a comunidade científica em geral, uma vez que os *Numts* e o mtDNA apresentam diferentes graus de funcionalidade e estão localizados em locais diferentes na célula, sendo, portanto, submetidos à pressões evolutivas distintas. Logo, se sequências de *Numts* e de DNA mitocondrial forem utilizadas simultaneamente em análises filogenéticas, relações errôneas podem ser propostas e espécies crípticas superestimadas como em estudos utilizando códigos de barra de DNA (Sorenson & Quinn, 1998; Martins *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2008). Entretanto, embora causem ruídos em alguns estudos filogenéticos, os *numts* são sugeridos e até utilizados como fósseis moleculares em estudos de filogeografia e marcadores importantes para indicar o tempo em que linhagens ou até mesmo espécies surgiram ou divergiram (Bensasson, 2001; Li *et al.*, 2009).

Assim, nos dois próximos capítulos tivemos como objetivos elucidar se (i) *A. sexdens* corresponde a uma única espécie ou a um complexo de espécies ou linhagens

críticas e (ii) determinar a prevalência em outras formigas da tribo Attini e o tempo de transferência dos pseudogenes citados para o núcleo.

Capítulo 2: Filogenia Molecular de *Atta sexdens* (Myrmicinae: Attini) baseada em genes mitocondriais e nucleares

Resumo

As formigas do gênero *Atta* são conhecidas pelo seu hábito de cortar folhas e flores frescas para servir de substrato para cultivar seu fungo simbiote. Devido a este hábito acabam se tornando pragas em ambientes urbanos e culturas cultivadas gerando graves prejuízos econômicos. A espécie *Atta sexdens* é uma das que possui maior distribuição no Continente Americano e é praga de várias culturas como citrus e cana-de-açúcar. Ainda existem dúvidas se *Atta sexdens* é uma única espécie ou um grupo de espécies crípticas e há poucos trabalhos tratando dos aspectos que levaram a seu sucesso em colonizar várias ambientes. No presente trabalho, nós analisamos 100 ninhos coletados ao longo das áreas de ocorrência da espécie no Continente Americano, a fim de verificar a existência de espécies crípticas, bem com o tempo de divergência entre elas, avaliando a utilidade de marcadores nucleares (rodopsina) e mitocondriais (citocromo oxidase I, espaçador intergênico, RNA transportador de Leucina e citocromo oxidase II) em estudos desta natureza. Os resultados de inferência filogenética utilizando genes nucleares e genes mitocondriais mostram que *Atta sexdens* pode ser dividida em três linhagens distintas, denominadas Norte, Central e Sul em. As topologias das árvores filogenéticas obtidas apresentaram bom suporte para seus ramos, mas divergiram em relação a qual evento cladogenético ocorreu primeiro dentro de *A. sexdens*. A região IGS mitocondrial, devido à sua característica hipervariável, parece trazer ruído à análise filogenética. As análises de divergência indicam uma origem de *A. sexdens* por volta de 10 milhões de anos atrás, relativamente precoce em relação à origem das formigas cortadeiras.

Palavras chaves: *Atta sexdens*, mtDNA, nDNA, Tempo de divergência, Filogenia.

Introdução

Atta sexdens L. (1758) (Myrmicinae: Attini) é uma espécie de formiga pertencente ao grupo das formigas cortadeiras, conhecidas pelo seu hábito de cortar material vegetal fresco, que elas utilizam como substrato para cultivar uma única e especializada espécie de fungo simbiote (Weber, 1972; Hölldobler & Wilson, 1990; Silva-Pinhati et al., 2004; Schultz & Brady, 2008; Mueller et al., 2010). Devido a este hábito peculiar de cortar folhas frescas e a sua extensa distribuição desde o Sul da América Central até o Norte da Argentina (Weber, 1972; Hölldobler & Wilson, 1990; Solomon et al., 2008), estas formigas são de relevante importância econômica por atuarem como pragas de várias culturas agrícolas em ambientes rurais e plantas ornamentais em ambientes urbanos (Mariconi, 1970; Cherrett, 1986a,b,c; Fowler et al., 1986; Moutinho et al., 2003), causando prejuízos da ordem de milhões de dólares. Apesar de terem a fama de insetos pragas, essas formigas desempenham importante papel nos diversos ecossistemas em que habitam, principalmente na ciclagem de nutrientes em ambientes florestais, por trazerem material orgânico para o interior de seus ninhos no subsolo (Moutinho et al., 2003).

Devido à sua importância ecológica e econômica, juntamente com sua larga distribuição, *A. sexdens* é uma das espécies mais estudadas da tribo Attini, sobretudo em aspectos relacionados a controle biológico, aspectos comportamentais, fisiológicos e morfométricos (Silva et al., 2003; Carlos et al., 2010; Castilho et al., 2010). Durante muito tempo a taxonomia e sistemática de *A. sexdens* foi motivo de controvérsias, principalmente devido à subjetividade dos caracteres morfológicos e alto grau de polimorfismo entre indivíduos de um mesmo ninho. Borgmeier (1950) propôs que *A. sexdens* fosse dividida em 6 subespécies (*Atta sexdens sexdens* Linnaeus 1758, *A. sexdens rubropilosa* Forel 1908, *A. sexdens piriventris* Santschi 1919, *A. sexdens tristis*

Santschi 1919, *A. sexdens fuscata* Santschi 1922, e *A. sexdens autuori*) e, nove anos depois, tornou sinônimas todas as subespécies e agrupou-as como *A. sexdens* (Borgmeier, 1959). Gonçalves (1965) se baseou em arquitetura dos ninhos, morfologia dos soldados e dividiu *A. sexdens* em 3 subespécies [*Atta sexdens sexdens* L. 1758 (= *A. sexdens fuscata* Santschi 1922), *A. sexdens rubropilosa* Forel 1908, e *A. sexdens piriventris* Santschi 1919 (= *A. vollenweideri tristis* Santschi 1919 e *A. sexdens autuorii* Borgmeier 1950)]. Esta última classificação, embora não seguida por Bolton (2005), ainda é empregada por vários autores em seus estudos (Delabie, 1997; Loeck *et al.*, 2001; Solomon *et al.*, 2008; Bacci Jr *et al.*, 2009; Myiashira *et al.*, 2010; Carlos *et al.*, 2010; Larcerda *et al.*, 2010; Bezerra *et al.*, em prep.).

A. sexdens sexdens (L, 1758) ou Formiga da Mandioca, ocorre na Amazônia, nos estados do Nordeste até o Sul da Bahia e no Norte dos estados de Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso; *A. sexdens rubropilosa* Forel, 1908 ou Saúva Limão, ocorre no Sul dos Estados de Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso e também nos estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro Distrito Federal, São Paulo, Norte, Nordeste e Oeste do Paraná; *A. sexdens piriventris* Santschi, 1919 ou Saúva Limão Sulina, ocorre no Rio Grande do Sul, Santa Catarina e no Sul do Paraná (Mariconi, 1970).

Em seu estudo da biogeografia de formigas cortadeiras nos estados do Sergipe, Leste da Bahia e Minas Gerais e Norte do Espírito Santo, Delabie *et al.* (1997) verificaram a ocorrência de *Atta sexdens sexdens* e *Atta sexdens rubropilosa*. A primeira ocorre na parte Norte da região estudada, sendo excluída ao Sul desde Canavieiras até a divisa Norte do Estado de Minas Gerais. A segunda é frequente em toda parte sul da região de estudo, sendo aparentemente excluída ao norte de uma linha que passa no Recôncavo Baiano. Estes mesmo autores verificaram que se trata de duas subespécies com distribuição parapátrica, podendo ser encontradas simultaneamente numa faixa de

aproximadamente 300 km de largura, o que corrobora o estado de semi-espécies para ambas e, assim, *Atta sexdens* podendo ser considerada uma superespécie (Delabie, 1997). Já *Atta sexdens piriventris* é encontrada na região Sul do Brasil. Em seu trabalho sobre a distribuição geográfica desta subespécie, Loeck, *et al.* (2001) verificaram que ela está presente nas sete regiões estudadas do estado do Rio Grande do Sul, sendo a única espécie de saúva na maior parte dessa região, ocorrendo com maior frequência nas regiões do Planalto, Alto Uruguai e Noroeste.

Como relação aos caracteres morfológicos, *A. sexdens sexdens* e *A. sexdens rubropilosa* se diferenciam principalmente a partir da pilosidade da cabeça e do gáster do soldado (Borgmeier, 1959), enquanto *A. sexdens piriventris* possui o tórax e cabeça dos soldados vermelhos pardacentos, gáster piriforme brilhante dos lados e fosco superiormente (Gonçalves, 1942). Entretanto, esses caracteres se mostram por vezes dúbios e subjetivos, não sendo uma tarefa fácil utilizá-lo na caracterização de cada uma das subespécies. Solomon *et al.* (2008) demonstraram que *A. sexdens* teve sua origem e expansão entre 1,8-2 milhões de anos e Bacci Jr *et al.* (2009) trouxeram evidências de que *A. sexdens* fosse um complexo de espécies crípticas.

Entender a biologia e os processos que levaram ao grande sucesso em ocupar praticamente todo o território brasileiro é fundamental para o desenvolvimento de estratégias de controle biológico desse complexo de espécies. É importante ressaltar que em ambientes florestais não perturbados, a densidade de ninhos de *Atta sexdens* é 20 vezes menor do que áreas de agricultura ou floresta secundária, o que indica um estado de equilíbrio entre a formiga e a vegetação nativa (Moutinho *et al.*, 2003). Isso sugere que a ampliação das áreas de cultivo ao longo das últimas décadas favoreceu a expansão dessa formiga pelo território brasileiro, como uma praga agrícola. Neste contexto, algumas questões importantes permanecem ainda sem resposta: (i) *A. sexdens* representa

uma única espécie ou um complexo de espécies ou subespécies crípticas? (ii) quando teria havido a possível diversificação em subespécies? (iii) a expansão das lavouras facilitou a rápida expansão de *A. sexdens* ao longo do território brasileiro?

No presente trabalho, empregando abordagens filogenéticas, nós tivemos por objetivos (i) testar se *A. sexdens* compreende um complexo de espécies ou subespécies, (ii) determinar o tempo de divergência entre as prováveis subespécies, (iii) avaliar se as sequências de DNA mitocondrial e nuclear fornecem informação consistente para a reconstrução filogenética de *A. sexdens*.

Materiais e Métodos

Visão geral

Foram coletados 100 ninhos da formiga *Atta sexdens* abrangendo toda sua área de distribuição conhecida, desde o sul do Brasil até o norte da América do Sul (Venezuela e Peru), como apresentado na Tabela 2.1 e no mapa abaixo (Figura 2.1). As formigas foram armazenadas em tubos de 2,0 ml, contendo etanol 90 % durante a fase de coleta. Foram coletadas operárias máximas (soldados) e operárias menores. Os primeiros foram utilizados para identificação morfológica e as últimas para as análises moleculares. Posteriormente, no laboratório, foram acondicionados em ultra freezer a -80° C, até que as análises moleculares fossem realizadas.

Tabela 2.1: Lista dos ninhos coletados com coordenadas geográficas e códigos

ID	Longitude	Latitude	País	Estado	Cidade
SES040120-02	-35,84425	-8,720383333	Brasil	Pernambuco	Jaqueira
SES040124-05	-39,65983333	-14,18722222	Brasil	Bahia	Barra do Rocha
SES040124-07	-39,78102778	-14,09619	Brasil	Bahia	Ipiaú
SES040124-09	-39,78102778	-14,09619444	Brasil	Bahia	Ipiaú
SES040125-06	-39,81586111	-14,20027778	Brasil	Bahia	Itagibá

ID	Longitude	Latitude	País	Estado	Cidade
SES040125-07	-39,81586111	-14,20027778	Brasil	Bahia	Itagibá
SES040128-01	-56,09404	-9,89753	Brasil	Mato Grosso	Alta Floresta
SES040130-03	-56,02422	-9,59214	Brasil	Mato Grosso	Alta Floresta
SES040131-11	-55,59001	-10,06242	Brasil	Mato Grosso	Carlinda
SES040131-14	-56,07603	-9,86249	Brasil	Mato Grosso	Alta Floresta
SES040205-05	-48,54977	-1,68755	Brasil	Pará	Barcarena
SES040208-02	-51,506690	0,6772	Brasil	Amapá	Porto Grande
SES040208-03	-51,506690	0,6772	Brasil	Amapá	Porto Grande
SES040212-03	-54,78015	-2,64342	Brasil	Pará	Santarém
SES040212-06	-54,78015	-2,64342	Brasil	Pará	Santarém
SES040213-03	-54,72733	-2,55767	Brasil	Pará	Santarém
SES040214-08	-54,64113	-1,90357	Brasil	Pará	Alenquer
SES040214-10	-54,62662	-1,91676	Brasil	Pará	Alenquer
SES040214-12	-54,64113	-1,90357	Brasil	Pará	Alenquer
SES040215-04	-54,63676	-1,92631	Brasil	Pará	Alenquer
SES040215-06	-54,6368	-1,92631	Brasil	Pará	Alenquer
SES040215-08	-54,6368	-1,92631	Brasil	Pará	Alenquer
SES040215-09	-54,6368	-1,92631	Brasil	Pará	Alenquer
SES040215-11	-54,6368	-1,92631	Brasil	Pará	Alenquer
SES040216-03	-54,57096	-2,58981	Brasil	Pará	Santarém
SES040214-04	-54,64113	-1,90357	Brasil	Pará	Alenquer
SES040221-01	-60,0249	-2,31131	Brasil	Amazonas	Rio Preto da Eva
SES040125-05	-35,699998	-6,699996	Brasil	Paráíba	Solânea
A10	-35,699998	-6,699996	Brasil	Paráíba	Solânea
A115pi	-35,540004	-6,755002	Brasil	Rio Grande do Sul	Porto Alegre
A2piri	-50,382779	-25,874166	Brasil	Paraná	São Mateus do Sul
A310pi	-52,670556	-26,228614	Brasil	Paraná	Pato Branco
A4	-50,412219	-22,661665	Brasil	São Paulo	Assis
A5	-54,805553	-22,221113	Brasil	Mato Grosso Do Sul	Dourados
A6	-52,198059	-22,749165	Brasil	Paraná	Inajá
A7	-48,461668	-22,885833	Brasil	São Paulo	Botucatu
e849	-39,480278	-13,738056	Brasil	Bahia	Gandu
e847	-39,480278	-13,738056	Brasil	Bahia	Gandu
A813	-39,121944	-12,653056	Brasil	Bahia	Cruz das Almas
A9	-40,472504	-11,858883	Brasil	Bahia	Mundo Novo
e486	-60,026111	-3,135267	Brasil	Amazonas	Manaus
e634	-47,931945	-19,788334	Brasil	Minas Gerais	Uberaba
JM061010-01	-54,033274	-29,665787	Brasil	Rio Grande Do Sul	Santa Maria

ID	Longitude	Latitude	País	Estado	Cidade
JM061010-02	-54,033274	-29,665788	Brasil	Rio Grande Do Sul	Santa Maria
JM061010-03	-54,031687	-29,663551	Brasil	Rio Grande Do Sul	Santa Maria
JM061010-05	-54,032316	-29,663592	Brasil	Rio Grande Do Sul	Santa Maria
JM061010-06	-54,033627	-29,663621	Brasil	Rio Grande Do Sul	Santa Maria
JM061010-07	-54,033400	-29,663941	Brasil	Rio Grande Do Sul	Santa Maria
JM061010-08	-54,026675	-29,663691	Brasil	Rio Grande Do Sul	Santa Maria
JM061010-09	-54,027357	-29,663661	Brasil	Rio Grande Do Sul	Santa Maria
JM061010-11	-53,492930	-29,765820	Brasil	Rio Grande Do Sul	Restinga Seca
JM061010-12	-53,491927	-29,765406	Brasil	Rio Grande Do Sul	Restinga Seca
JM061010-13	-53,491663	-29,765186	Brasil	Rio Grande Do Sul	Restinga Seca
JM061011-01	-53,671713	-29,354915	Brasil	Rio Grande Do Sul	Júlio de Castilhos
JM061011-02	-53,671621	-29,354935	Brasil	Rio Grande Do Sul	Júlio de Castilhos
JM061011-14	-53,597258	-28,768945	Brasil	Rio Grande Do Sul	Cruz Alta
JM061011-16	-53,597385	-28,769141	Brasil	Rio Grande Do Sul	Cruz Alta
JM061012-02	-54,023105	-28,383119	Brasil	Rio Grande Do Sul	Coronel Barros
JM061012-03	-54,023102	-28,383200	Brasil	Rio Grande Do Sul	Coronel Barros
JM061012-04	-54,022778	-28,383121	Brasil	Rio Grande Do Sul	Coronel Barros
JM061012-05	-54,274511	-28,319743	Brasil	Rio Grande Do Sul	Santo Ângelo
JM061012-06	-54,315464	-28,220888	Brasil	Rio Grande Do Sul	Santo Ângelo
JM061012-07	-54,315428	-28,220716	Brasil	Rio Grande Do Sul	Santo Ângelo
JM061012-08	-54,377114	-28,015706	Brasil	Rio Grande Do Sul	Giruá
JM061013-01	-54,317152	-28,219794	Brasil	Rio Grande Do Sul	Santo Ângelo
JM061013-02	-54,493319	-27,882108	Brasil	Rio Grande Do Sul	Santa Rosa
JM061013-05	-54,477561	-27,793915	Brasil	Rio Grande Do Sul	Santa Rosa
E393E395E396	-47,849444	-21,164444	Brasil	São Paulo	Ribeirão Preto
e673e674	-52,055833	-17,539722	Brasil	Goiás	Perolândia
e687	-52,055833	-17,539723	Brasil	Goiás	Perolândia
e676	-52,826389	-16,749167	Brasil	Mato Grosso	Ponte Branca
e621e622e620	-43,705556	-22,741667	Brasil	Rio De Janeiro	Seropédica
e634	-47,932778	-19,750556	Brasil	Minas Gerais	Uberaba
e686	-52,055833	-17,539723	Brasil	Goiás	Perolândia
e486	-60,079444	-3,034722	Brasil	Amazonas	Manaus
a5	-54,805553	-22,221113	Brasil	Mato Grosso Do Sul	Dourados
a813	-39,121944	-12,653056	Brasil	Bahia	Cruz das Almas
e672	-47,873333	-15,746667	Brasil	Distrito Federal	Brasília
e726	-70,394444	-8,126667	Brasil	Amazonas	Envira
e728	-70,394444	-8,126667	Brasil	Amazonas	Envira
e727	-70,394444	-8,126667	Brasil	Amazonas	Envira

ID	Longitude	Latitude	País	Estado	Cidade
e732	-69,488056	-8,980556	Brasil	Acre	Manoel Urbano
e733	-69,488056	-8,980556	Brasil	Acre	Manoel Urbano
e734	-67,864722	-9,955278	Brasil	Acre	Rio Branco
E403	-47,543611	-22,393611	Brasil	São Paulo	Rio Claro
MB180504-01	-48,766389	-19,699722	Brasil	Minas Gerais	Campo Florido
MB170504-01	-48,781389	-19,656389	Brasil	Minas Gerais	Campo Florido
e612	-41,333889	-21,752778	Brasil	Rio De Janeiro	Campos dos Goytacazes
e681	-50,822500	-16,785556	Brasil	Goiás	Paraúna
e683	-50,822500	-16,785557	Brasil	Goiás	Paraúna
e684	-50,822500	-16,785558	Brasil	Goiás	Paraúna
e685	-50,822500	-16,785559	Brasil	Goiás	Paraúna
e921	-55,517500	-12,082222	Brasil	Mato Grosso	Sinop
e923	-56,08993	-09,87518	Brasil	Mato Grosso	Alta Floresta
e924	-56,08993	-09,87519	Brasil	Mato Grosso	Alta Floresta
e929	-55,907778	-9,895000	Brasil	Mato Grosso	Alta Floresta
e930	-55,907778	-9,895000	Brasil	Mato Grosso	Alta Floresta
e936	-56,01333	-09,57460	Brasil	Mato Grosso	Alta Floresta
SES050815-02	-63.54602	8.13762	Venezuela	Bolívar	Ciudad Bolivar
SES040614-04	-72.84978	-3.44336	Peru	Loreto	Explorama Lodge
SES040615-01	-72.84978	-3.44336	Peru	Loreto	Explorama Lodge
SES050815-01	-63.55125	8.14594	Venezuela	Bolívar	Ciudad Bolivar

As sequências mitocondriais foram obtidas para todos os 100 espécimes em estudos e para outros três utilizados como grupo externo, compreendendo três genes: Citocromo Oxidase I (COI), RNA Transportador de Leucina (tRNA-Leu) e Citocromo Oxidase II (COII), além do Espaçador Intergênico altamente variável (IGS). As sequências nucleares correspondentes à região codificadora do gene da rodopsina (Schultz & Brady, 2008) foram obtidas para 84 dos espécimes coletados e para três espécimes utilizados com grupo externo. As amostras estão depositadas na coleção entomológica do Laboratório de Evolução Molecular da Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, Brasil.



Figura 2.1: Mapa indicando os ninhos de *Atta sexdens* coletados (pontos vermelhos) ao longo do território Latino-Americano

Extração de DNA

Para a extração do DNA total, operárias menores foram trituradas em micro tubos de 1,5 mL contendo 550 μ L da solução de lise celular TNES (Tris Base 250 mM pH 7,5; NaCl 2M; EDTA 100 mM; SDS 2 %). Em seguida, foram acrescentados 5 μ L de Proteinase K (20mg/mL) e a mistura foi incubada por 3 horas a 55° C. Foi então feito um tratamento com 5 μ L de RNase A (10mg/mL) por 30 minutos. A precipitação das proteínas foi feita com a adição de 200 μ L de NaCl 5M. O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para um novo micro tubo e precipitado com igual volume de isopropanol 100 % e lavado com etanol 70 %, centrifugado e seco em centrífuga a

vácuo. O *pellet* de DNA foi dissolvido em 35 µL de tampão TE (1 mM Tris, 0,1 mM EDTA).

Amplificação gênica

Para amplificação dos genes mitocondriais (COI-IGS-tRNA^{Leu}-COII) foi utilizado o conjunto de iniciadores (*primers*) descritos em Martins Jr *et al.* (2007), enquanto para o gene nuclear da rodopsina (opsin) foram utilizados os iniciadores descritos por Schultz & Brady (2008) (Tabela 2.2). Para a região mitocondrial, um fragmento de ~650 pb foi amplificado em 25 µl de reação contendo kit *Ready-to-Go* (GE Healthcare), ~100 ng de DNA genômico e 6 pmol de cada um dos *iniciadores* ANT-F e ANT-R (Tabela 2.2). A reação foi incubada em termociclador e submetida à etapa inicial de desnaturação a 94° C por 5' seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94° C por 1', anelamento a 47° C por 30'' e extensão a 68° C por 2'.

Para o gene da rodopsina um único fragmento de ~600 pb foi amplificado em 25 µL de reação de PCR contendo kit *Ready-to-Go* (GE Healthcare) e ~50ng de DNA genômico e 5pmol de cada um dos *iniciadores* LR143F e LR639ER. A reação foi incubada em termociclador e submetida à etapa inicial de desnaturação a 94° C por 5', seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94° C por 1', anelamento a 50° C por 30'' e extensão a 68° C por 2'.

Tabela 2.2: Conjunto de *iniciadores* utilizados neste estudo para amplificar especificamente os genes mitocondriais e nucleares

<i>Iniciadores (sequencia 5'→ 3')</i>	Locus	Referência
ANT-F (ATTCATTCTTATCTTGAAATATTATTC)	COI-IGS-	Martins Jr <i>et al</i> (2007)
ANT-R (TTCATAAGTTCAGTATCATTGGTG)	tRNA ^{Leu} -COII	
LR143F (GACAAAGTKCCACCRGARATGCT)	Opsin	Schultz & Brady (2008)
LR639ER (YTTACCGRTTCCATCCRAACA)		

Sequenciamento de DNA

Ambos os produtos de PCR dos genes mitocondriais e nucleares foram purificados e sequenciados conforme descrito a seguir. A purificação foi feita através do *kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE HEALTHCARE), seguindo as especificações do fabricante. Em seguida, 3 µL do produto de PCR purificado foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1 % e visualizados por coloração de brometo de etídio. Finalmente, as reações de sequenciamento foram feitas para ambas as fitas senso e anti-senso, utilizando o *kit* ABI BigDye Terminator (versão 3.1) e posteriormente precipitadas com Isopropanol 85%/Etanol 70% ou Etanol 100% e 70%/EDTA 125mM/Acetato de Sódio 3M segundo recomendação do fabricante. O produto da reação foi analisado em sequenciador automático ABI 377 ou ABI 3500 (Applied Biosystems).

As sequências senso e anti-senso foram concatenadas para gerar as sequências consenso individuais para cada um dos loci, através dos programas Bioedit (Hall, 1999) e DnaSP 5.0 (Librado & Rozas, 2009).

Análises Filogenéticas

Para testar o sinal filogenético das sequências, nós aplicamos um teste de saturação de transições e transversões em função da divergência das sequências nucleotídicas, através do programa DAMBE v5.2.18.

As análises filogenéticas foram conduzidas para cada um dos segmentos gênicos mitocondriais e nucleares bem como para os dados concatenados (mtDNA+nDNA), utilizando análises de máxima parcimônia (MP), máxima verossimilhança (ML) e inferência Bayesiana. *Atta laevigata*, *A. cephalotes* e *A. robusta* foram utilizadas como grupos externos para ambas as análises com os genes mitocondriais e nucleares, separadamente e também concatenados. Sequências nucleares de *Acromyrmex*,

Cyphomyrmex e *Trachymyrmex* utilizadas por Schultz & Brady (2008) foram utilizadas adicionalmente como grupo externo. O melhor modelo de substituição nucleotídica foi escolhido para as análises de ML e Bayesiana utilizando o *Akaike Information Criteria* (AIC) implementado pelo programa jMODELTEST 0.1.1 (Posada, 2008) para cada gene (COI, tRNA^{Leu}, COII e opsin), bem como para todo o conjunto de dados concatenados.

As análises de MP foram implementadas no programa PAUP 4b10 (Swofford, 2003) através de 1000 buscas heurísticas, eTBR definido como algoritmo de substituição de ramos. O suporte dos ramos foi inferido a partir de análise de *bootstrap* não paramétrico com 1000 réplicas e iguais parâmetros de busca heurística. As análises de ML foram realizadas no programa Garli 1.0 (Zwickl, 2006) utilizando os parâmetros *default* segundo o manual do usuário. Para estimar o suporte dos ramos foram realizadas 100 réplicas de ML *bootstrap*.

A inferência Bayesiana foi implementada através do programa MrBayes (versão 3.1) (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). Foram realizadas quatro corridas independentes, cada uma delas com 4 cadeias quentes, parâmetros iniciais mantidos na configuração padrão do programa e com os parâmetros de substituição nucleotídica particionados por gene; convergência, fase estacionária da corrida e ponto de corte (*burn-in*) foram acessados através do programa Tracer v.1.5 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>). Depois de descartada a fase inicial não estacionária, o consenso maioria foi calculado a partir da amostragem das análises subsequentes utilizando o programa FigTree 1.31 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Análise de Divergência

Para as análises de divergência nós utilizamos uma abordagem Bayesiana com modelo de relógio molecular relaxado e não correlacionado ao logaritmo normal,

aplicado pelo programa BEAST v1. 6.1, juntamente com a probabilidade *a priori* das árvores definida como *Yule process* (Drummond *et al.*, 2002, 2006; Drummond & Rambaut, 2007). O modelo de evolução nucleodítica escolhido foi o GTR+I+G com três partições de códons (códons 1, 2, 3). O modelo de substituição, a taxa de heterogeneidade e a frequência de bases foram configurados como não correlacionadas. A árvore foi enraizada utilizando uma espécie de *Apterostigma* sp que faz parte do grupo das Paleoattini e a idade do nó calibrada seguindo uma distribuição normal *a priori* (média=42,5; desvio padrão=1,2) (Schultz & Brady, 2008). Para os nós internos foi definida uma distribuição *a priori* e lognormal – *Cyphomyrmex rimosus* (média=2,2, desvio padrão=0,5; offset=15,0) e *Trachymyrmex* SP (média=1,5; desvio padrão=0,5; offset=15,0), considerando os registros fósseis das formigas cultivadoras de fungo e também seguindo a metodologia descrita por Schultz & Brady (2008). As buscas MCMC foram realizadas com 20.000.000 de gerações, sendo descartados 2.000.000 de gerações iniciais como fase não estacionária. As buscas atingiram convergência suficiente como indicado pelos altos valores de ESS para todos os parâmetros, platôs relativos aos tempos de divergência após o corte da fase não estacionária e pela reprodutibilidade dos resultados após dez corridas independentes. Os resultados de todas as corridas independentes foram reunidos no programa Tracer v 1.5 e reportados como valores médios de ± 95 % em relação aos limites superiores e inferiores. Para melhor visualização dos resultados de tempo de divergência, as árvores das melhores corridas inferidas a partir dos menores valores de $-\log$ verossimilhança, foram combinadas no programa TreeAnnotator v1.6.1 e visualizadas no programa FigTree v1.3.1 (Rambaut & Drummond, 2008).

Análises populacionais e caracterização das sequências

Para verificar a existência de correlação entre as distâncias geográficas e genéticas foi aplicado o teste de Mantel, em que as populações foram definidas segundo os clados obtidos a partir das análises de inferência filogenética. O teste de Mantel (1967) foi aplicado pelo programa AIS 1.0, com 1000 permutações.

Diversidade nucleotídica (π), diversidade haplotípica (h), e teste de distribuição *mismatch* foram implementados no programa DNAsp. O teste de neutralidade foi aplicado individualmente para cada uma das regiões codificadoras (COI e COII) através do programa MEGA 4, utilizando o método de Nei-Gojobori (1969) e *bootstrap* com 1000 permutações para testar a significância dos resultados, e pelo cálculo direto da razão d_n/d_s (ω), a partir da estimativa desses valores, também pelo programa MEGA4.

Resultados

Nós obtivemos 100 sequências mitocondriais com 530 pares de bases cada, excluída a região IGS (que variou de 141 a 159 pb) devido a sua alta variação, tornando-a difícil de ser alinhada com segurança. Estas sequências compreendem 49 haplótipos mitocondriais, para os quais a diversidade haplotípica (h), diversidade nucleotídica (π) e resultados de teste de neutralidade estão descritos na Tabela 2.3 Os resultados do teste de neutralidade (z e ω) rejeitaram a hipótese nula de que as sequências estão sob seleção neutra ($p < 0,05$), indicando seleção purificadora. Este resultado é o esperado para genes funcionais, uma indicação de que não se tratam de *numts*. As taxas de substituições sinônimas também superaram as de não sinônimas, o que reforça o resultado descrito acima que mostra que a sequência de proteínas é extremamente conservada. Foram geradas 60 sequências nucleares com 531 pb cada. As sequências nucleares compreenderam 17 haplótipos, para os quais diversidade haplotípica (h) foi de 0,75 e nucleotídica (π) de 0,013 (veja Tabela 2.3). Os melhores

modelos de substituição nucleotídica selecionados a partir do medo *Akaike Information Criteria* (AIC) implementado pelo jMODELTEST v.0.1 (Posada, 2008) foram: TPM2uf+G (COI), F81 (tRNA_{Leu}), TrN+I (COII) e TrN+G (opsin).

Os testes de sinal filogenético de transições e transversões em função da divergência nucleotídica, mostraram que a região IGS, por ser extremamente variável, leva a saturação do número de transições (Figura 2.2). Assim, as análises filogenéticas foram conduzidas com ou sem a região e IGS e posteriormente comparadas.

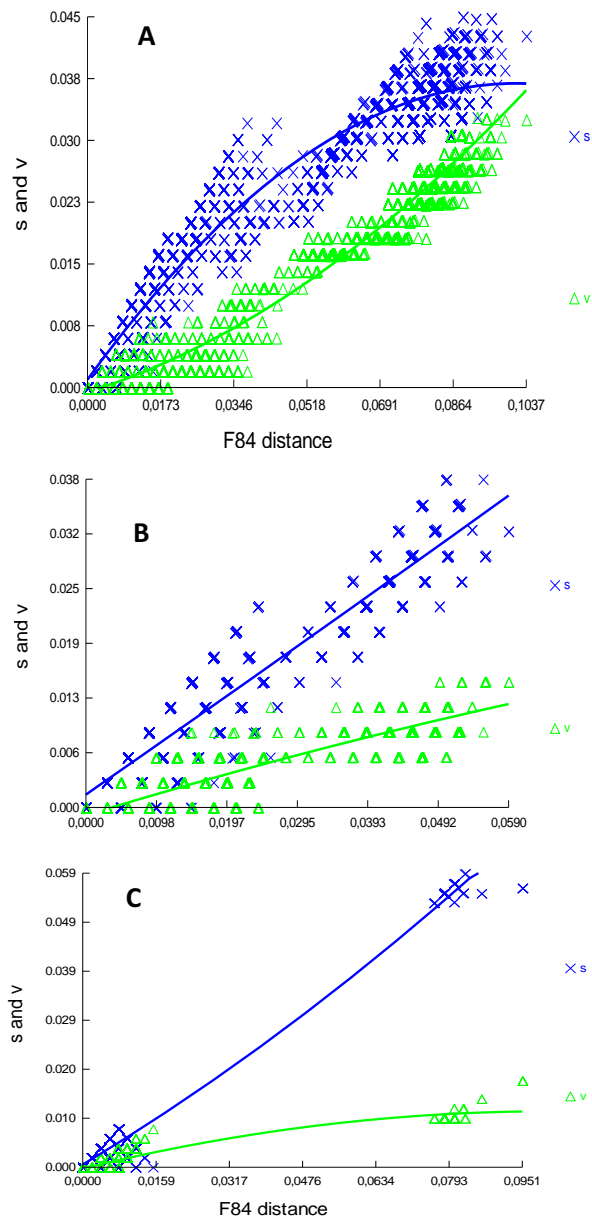


Figura 2.2: Gráficos representativos das transições e transversões em função da divergência nucleotídica. (A) mostra a saturação das transições (azul) pela inclusão da região IGS. (B) A saturação desaparece quando a região IGS é retirada e C mostra a análise feita para o gene nuclear da rodopsina (opsin).

Tabela 2.3: Diversidades haplotípica (h), nucleotídica (π), teste de neutralidade (z) e razão d_n/d_s (ω).

Locis	h	π	z	ω
COI*	-	-	0,003	0,00602
COII	-	-	0,00011	0,02499
COI-IGS-tRNA-Leu-COII*	0,95	0,039	-	-
Opsin	0,75	0,013		

*cálculo de z e ω feito apenas para regiões codificadoras isoladamente e os valores de π e h para todo o conjunto de dados somente.

As análises de reconstrução filogenética produziram topologias diferentes para os genes mitocondriais e nucleares utilizados separadamente. Os genes nucleares não apresentaram sinal filogenético suficiente o que se refletiu numa topologia com baixa resolução dos ramos mais internos, baixos valores de suporte e não possibilitou inferir com segurança qual população de *Atta sexdens* irradiou primeiro (Figura 2.3). Nas reconstruções com mtDNA, excluindo a região IGS, nós obtivemos uma topologia que divide *A. sexdens* em três ramos com bom suporte, conforme mostrado pelos altos valores de MP e ML *bootstrap* e probabilidade posterior da inferência Bayesiana (Figura 2.4). Como primeiro evento de cladogênese, temos o aparecimento do clado Norte, assim denominado por representar população da região amazônica. Este clado contém indivíduos da região de ocorrência de *Atta sexdens sexdens*. O segundo evento cladogenético deu origem à dois clados: clado Sul, contendo indivíduos da região Sul do Brasil e Norte da Argentina, onde ocorre *Atta sexdens piriventris*; o clado Central, contendo indivíduos do sul da Bahia até o extremo norte do Paraná, passando por Goiás, São Paulo, Minas Gerais e algumas regiões do Mato Gross e Mato Grosso do Sul (Weber, 1972; Gonçalves, 1942), onde é encontrada *A. sexdens rubropilosa*. Quando incluímos a região IGS da análise, a topologia resultante se manteve semelhante à anterior, exceto pela diminuição dos valores de suporte e baixa definição de alguns ramos mais internos (Figura 2.5). Finalmente, a filogenia com a matriz concatenando os genes mitocondriais e nucleares, excluindo a região IGS, apresentou uma topologia

com ramos com alto suporte deduzido a partir dos valores de ML e MP *bootstrap* e probabilidade posterior, porém foi diferente em relação ao primeiro evento de cladogênese dentro de *A. sexdens*, posicionando o Clado Sul como basal e um segundo evento cladogenético colocando os clados norte e central com irmãos (Figura 2.6). A mesma análise foi conduzida mantendo a região IGS e a topologia mostrou que o clado Central (*A. sexdens rubropilosa*) seria o mais basal, seguido pelos clados Sul (*A. sexdens piriventris*) e Norte (*A. sexdens sexdens*) (Figura 2.7).

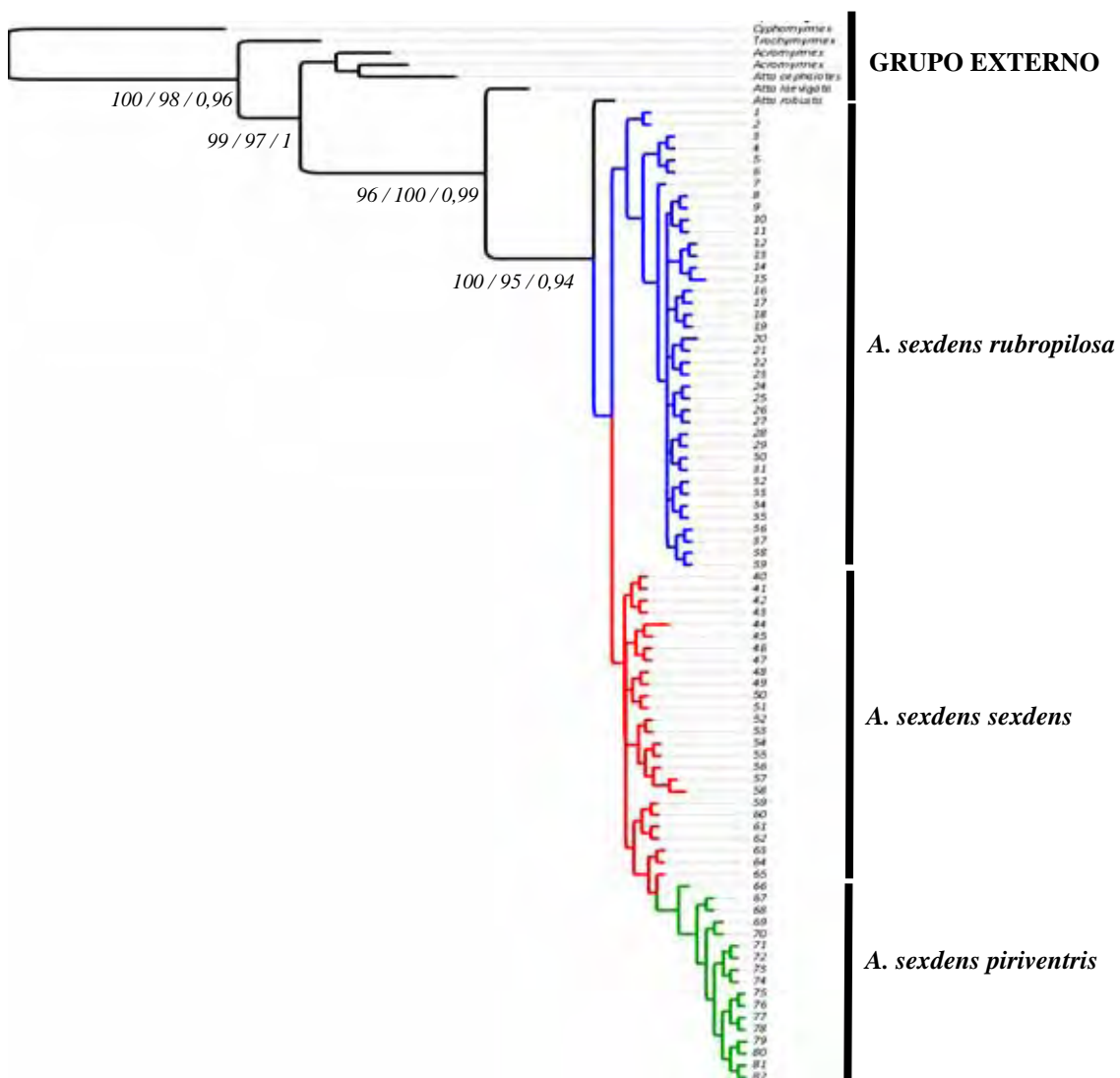


Figura 2.3: Árvore de máxima verossimilhança de *Atta sexdens* obtida a partir do gene nuclear da rodopsina (*opsin*). Valores de suporte estão representados nos nós, em ordem: MP *bootstrap* / ML *bootstrap* / probabilidade posterior. Valores menores que 50 foram omitidos. Os ramos em preto são os grupos externos, em azul o clado Central; vermelho o clado Norte; e verde o clado Sul. Números representam as OTUs (1 – 39: *A. sexdens rubropilosa*; 40 – 65: *A. sexdens sexdens*; 66 – 82: *A. sexdens piriventris*).

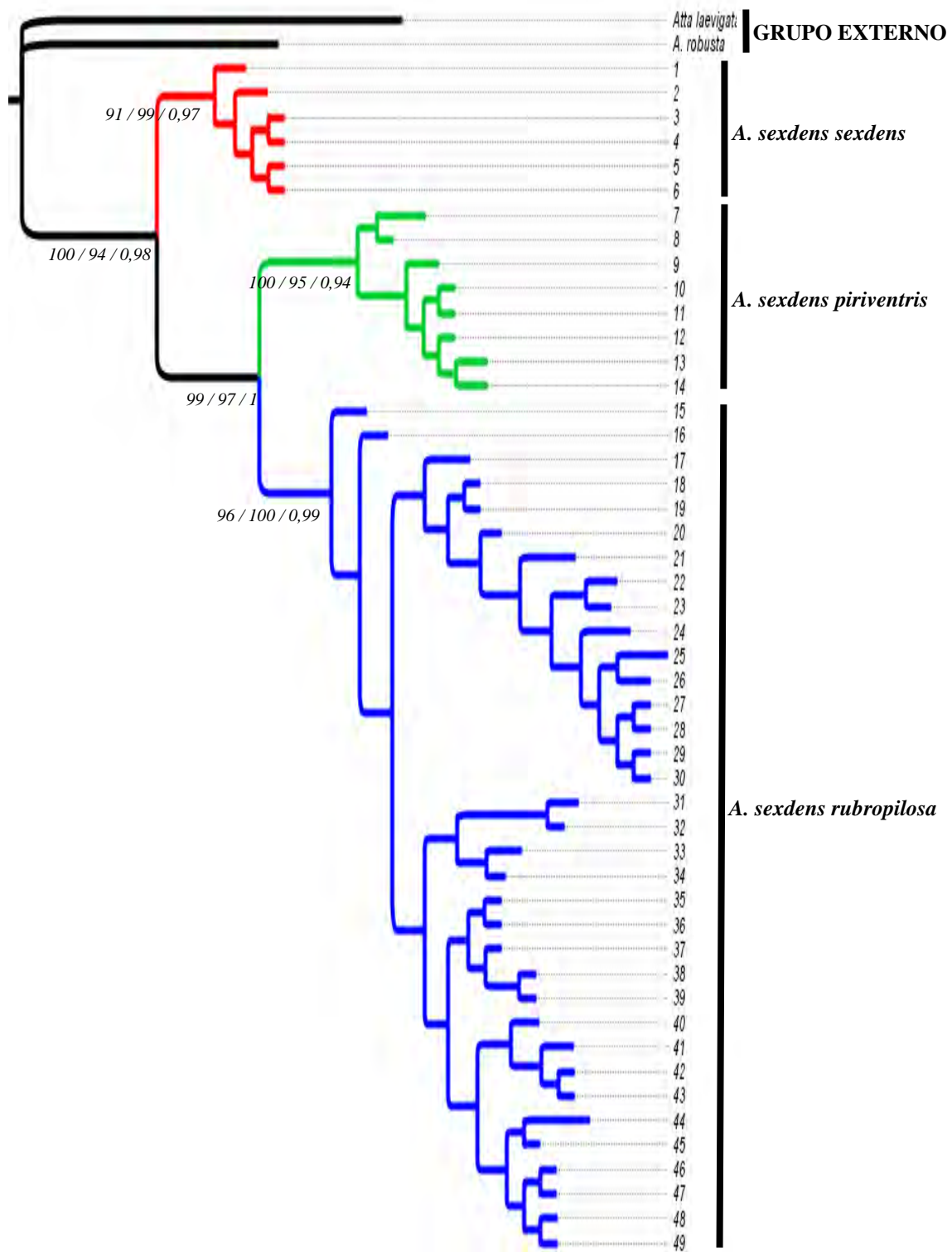


Figura 2.4: Árvore de máxima verossimilhança de *Atta sexdens* obtida a partir dos loci mtDNA, excluindo a região IGS. Valores de suporte estão representados nos nós, em ordem: MP *bootstrap* / ML *bootstrap* / probabilidade posterior. Valores menores que 50 foram omitidos. Os ramos em preto são os grupos externos, em azul o clado Central; vermelho o clado Norte; e verde o clado Sul. Números representam as OTUs (1 – 6: *A. sexdens sexdens*; 7 – 14: *A. sexdens piriventris*; 15 – 49: *A. sexdens rubropilosa*).

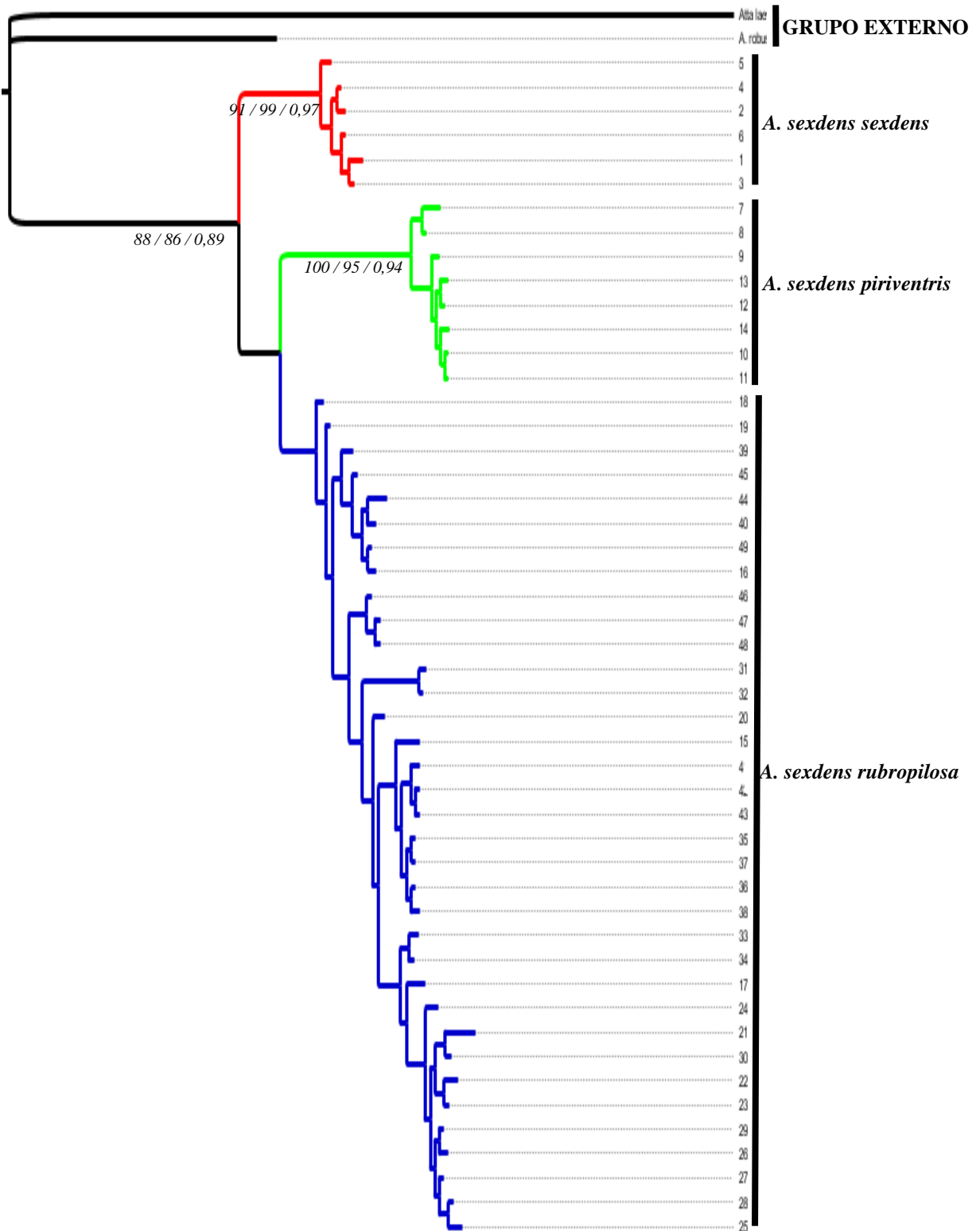


Figura 2.5: Árvore de máxima verossimilhança de *Atta sexdens* obtida a partir dos loci mtDNA, incluindo a região IGS. Valores de suporte estão representados nos nós, em ordem: MP *bootstrap* / ML *bootstrap* / probabilidade posterior. Valores menores que 50 foram omitidos. Os ramos em preto são os grupos externos, em azul o clado Central; vermelho o clado Norte; e verde o clado Sul. Números representam as OTUs (1 – 6: *A. sexdens sexdens*; 7 – 14: *A. sexdens piriventris*; 15 – 49: *A. sexdens rubropilosa*).

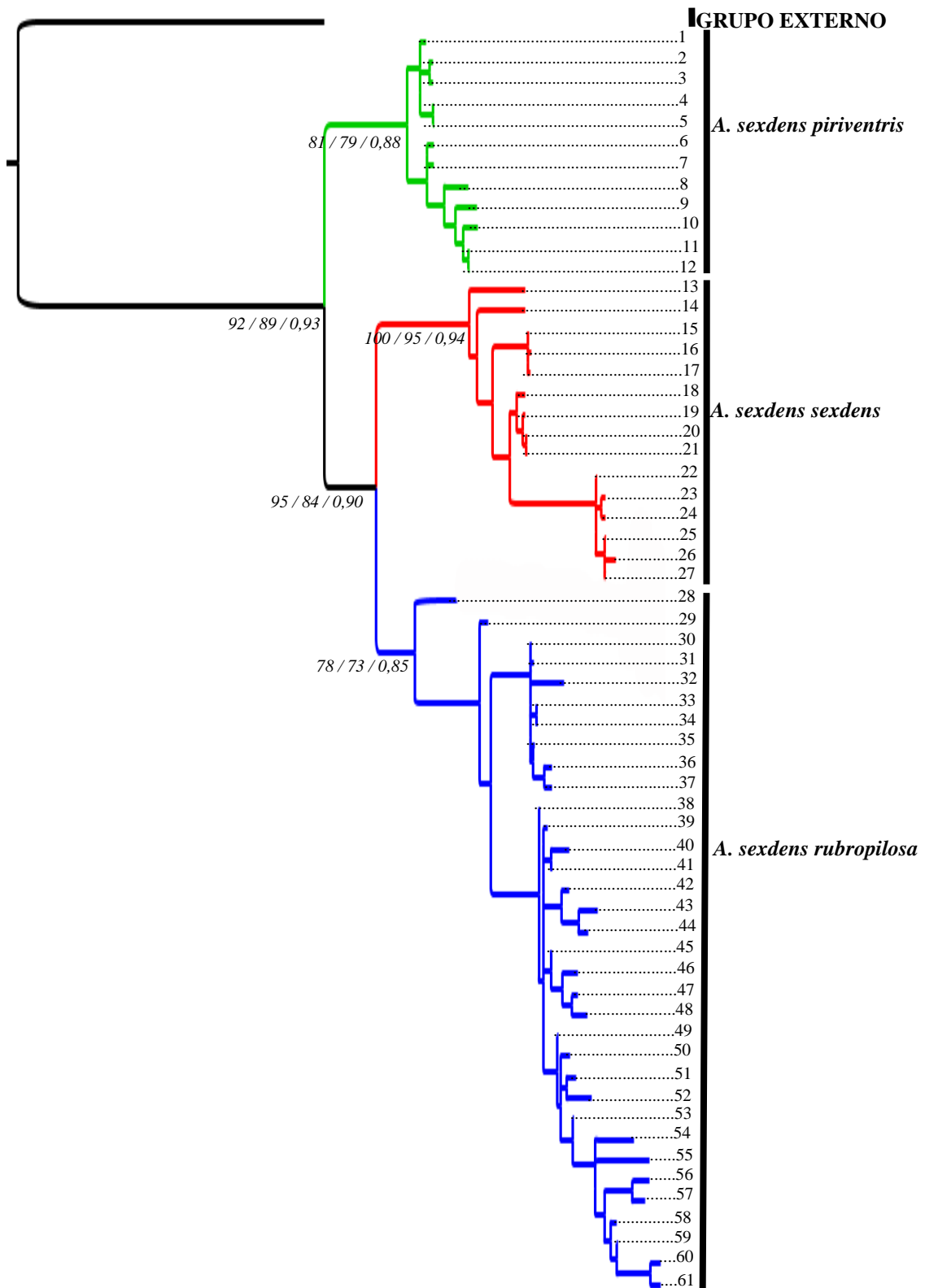


Figura 2.6: Árvore de máxima verossimilhança de *Atta sexdens* obtida a partir dos *loci* mtDNA+nDNA, excluindo a região IGS. Valores de suporte estão representados nos nós, em ordem: MP bootstrap / ML bootstrap / probabilidade posterior. Valores menores que 50 foram omitidos. Os ramos em preto são os grupos externos, em azul o clado Central; vermelho o clado Norte; e verde o clado Sul. Números representam as OTUs (1 – 12: *A. sexdens piriventris*; 13 – 27: *A. sexdens sexdens*; 28 – 61: *A. sexdens rubropilosa*).

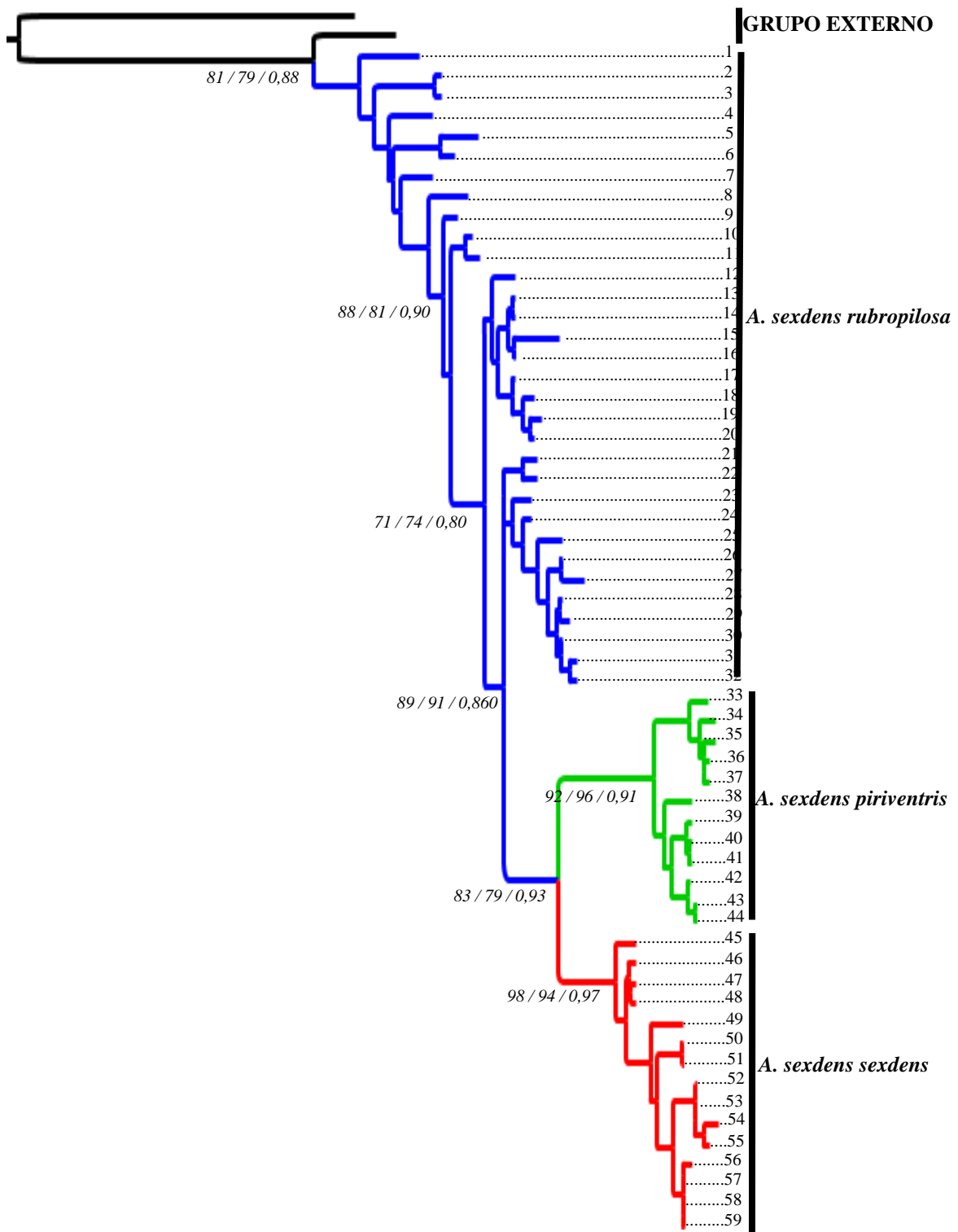


Figura 2.7: Árvore de máxima verossimilhança de *Atta sexdens* obtida a partir dos *loci* mtDNA+nDNA, incluindo a região IGS. Valores de suporte estão representados nos nós, em ordem: MP bootstrap / ML bootstrap / probabilidade posterior. Valores menores que 50 foram omitidos. Os ramos em preto são os grupos externos, em azul o clado Central; vermelho o clado Norte; e verde o clado Sul. Números representam as OTUs (1 – 32: *A. sexdens rubropilosa*; 33 – 44: *A. sexdens piriventris*; 45 – 59: *A. sexdens sexdens*).

As análises de divergência utilizando a abordagem Bayesiana de relógio molecular relaxado foram conduzidas apenas com os marcadores mitocondriais, excluindo a região IGS. Os resultados mostraram que a primeira diversificação dentro de *A. sexdens* ocorreu há aproximadamente 10 milhões de anos, representando o Clado Norte que representa a subespécie *A. sexdens sexdens*. A segunda diversificação ocorreu por volta de 8,5 milhões de anos, dando origem ao Clado Sul e Central, respectivamente representando *A. sexdens piriventris* e *A. sexdens rubropilosa*. (Figura 2.8)

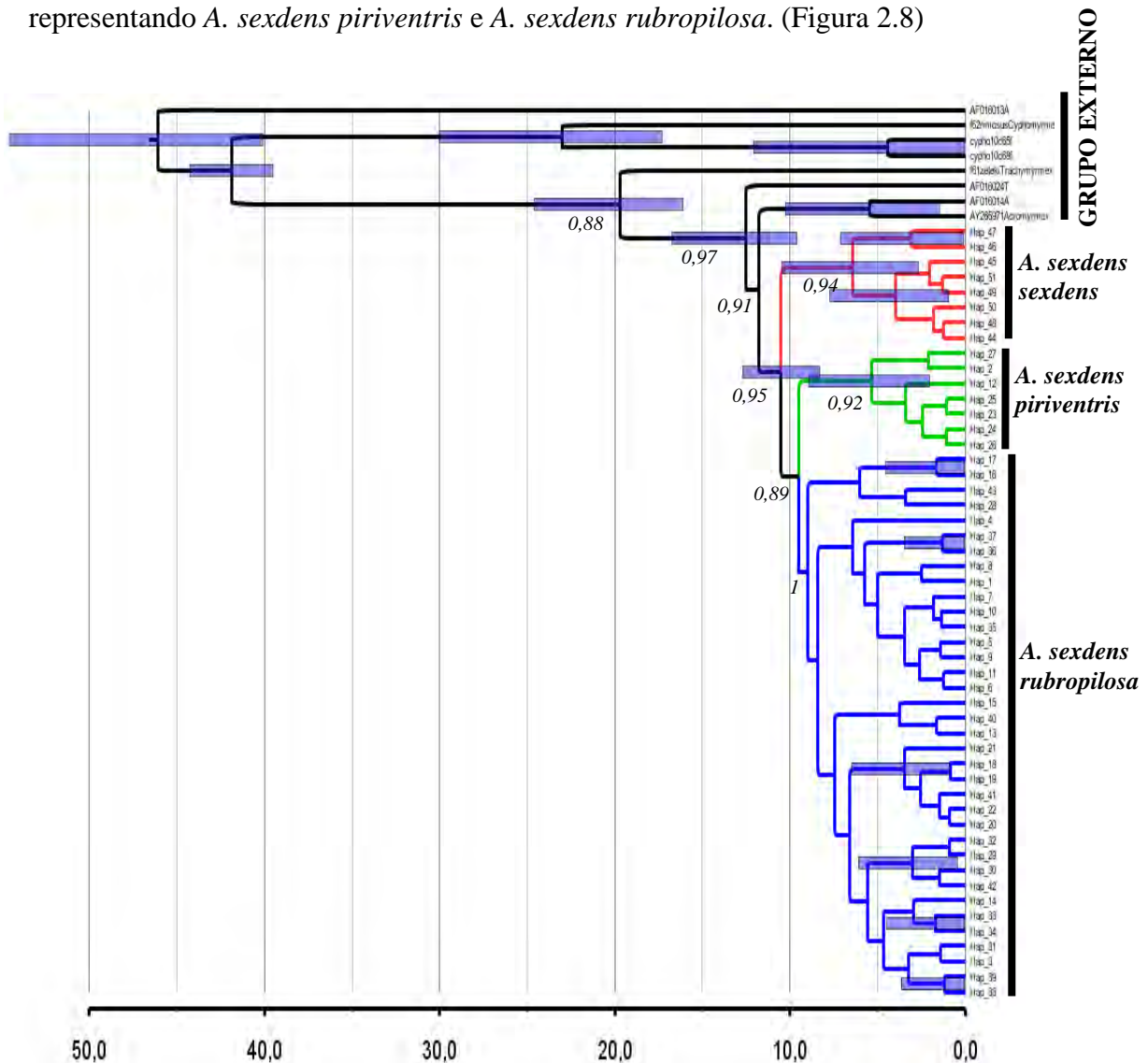


Figura 2.8: Estimativa de divergência entre as populações de *A. sexdens* em milhões de anos. A primeira diversificação ocorreu há ~10 milhões de anos, dando origem ao ramo *A. sexdens sexdens sexdens* (clado vermelho), seguida de um segundo evento cladogenético que ocorreu há ~8,5 milhões de anos originando os ramos que compreendem *A. sexdens piriventris* (clado verde) e *A. sexdens rubropilosa* (clado azul). Barras retangulares horizontais em azul claro indicam o intervalo de confiança ($\pm 95\%$).

Os resultados para os clados individuais e combinados submetidos ao teste de Mantel, implementado pelo programa AIS 1.0, demonstraram que apenas uma pequena parte da divergência genética está correlacionada com a distância geográfica (Tabela 2.4), sugerindo que outras forças além de isolamento pela distância, por exemplo, alguma barreira geográfica ou ecológica, estejam atuando para manter essas populações ou linhagens isoladas.

Tabela 2.4: Teste de Mantel

Clado Norte			Clado Central			Clado Sul			3 Clados			
r	r ²	p	r	r ²	P	r	r ²	p	r	r ²	p	
-0,15	0,022	0,68	0,40	0,16	0,001	-0,30	0,09	0,67	0,39	0,152	0,01	s/igs
0,55	0,302	0,045	0,50	0,25	0,00001	-0,02	0,0004	0,40	0,51	0,26	0,01	c/igs

Valores em negrito são significativos

Os resultados do teste de distribuição *mismatch*, implementado para cada um dos clados obtidos nas análises filogenéticas, demonstraram um perfil de distribuição multimodal (Figura 2.9A e B) para os clados norte e central e bimodal (Figura 2.9C) para o clado sul, compatível com populações em equilíbrio e que não tiveram uma diversificação muito recente (Figura 2.9).

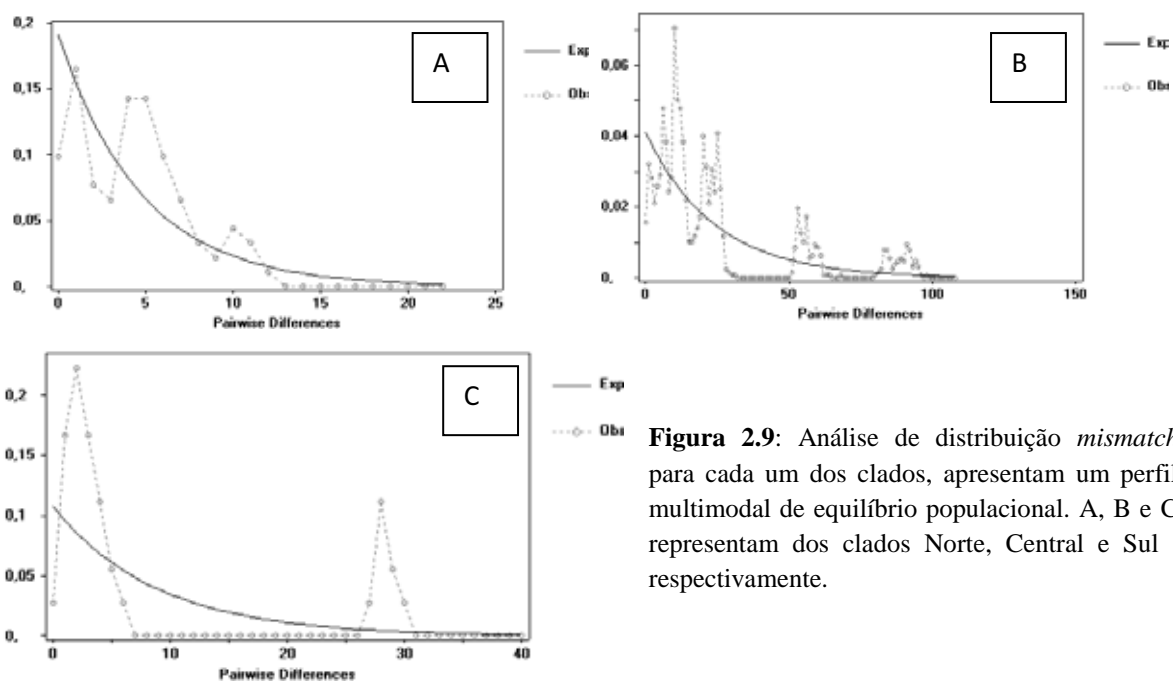


Figura 2.9: Análise de distribuição *mismatch* para cada um dos clados, apresentam um perfil multimodal de equilíbrio populacional. A, B e C representam dos clados Norte, Central e Sul, respectivamente.

Os resultados das análises de fluxo gênico estimados pelo teste F_{ST} mostraram forte estruturação geográfica entre os clados (Tabela 2.5) com valores significativamente próximo de 1 ($p < 0,001$).

Tabela 2.5: Teste de F_{ST} para os clados norte, central e sul de *A. sexdens*

	Sul	Norte	Central
Sul	-	<i>0,000982</i>	<i>0,001</i>
Norte	0,939	-	<i>0,000453</i>
Central	0,816	0,791	-

Valores de p estão acima da diagonal, em itálico.

Discussão

Bacci *et al* (2009) demonstrou que associações de marcadores nucleares e mitocondriais em análises de reconstrução filogenéticas são robustas para avaliar a evolução dentro de uma gênero. Em nível intraespecífico, entretanto, marcadores mitocondriais são mais comumente utilizados, pois acumulam mutações suficientes para inferir a relação filogenética entre populações (Moritz, 1987; Avise, 2001; Graziotin *et al.*, 2006; Solomon *et al.*, 2008). Nossos resultados corroboram esse pensamento, uma vez que as reconstruções filogenéticas aqui apresentadas foram mais robustas e confiáveis quando conduzidas apenas com o mtDNA ou com a combinação dos dois tipos de marcadores. A filogenia inferida apenas a partir do gene da rodopsina não foi capaz de resolver a relação entre os ramos internos das populações de *A. sexdens* devido aos baixos valores de suporte para esses ramos (Figura 2.3). Apesar deste fato, as análises filogenéticas conduzidas individualmente para os marcadores mitocondriais ou combinando-os com os nucleares demonstram que *A. sexdens* pode ser dividida em três principais clados bem suportados. Entretanto, a primeira irradiação dentro do grupo é diferente conforme o conjunto de dados analisado. Quando os marcadores estão

combinados, a população do Clado Sul aparece como mais basal (Figura 2.6) e quando somente o mtDNA é analisado, a população do Clado Norte é que aparece como a mais basal (Figuras 2.4 e 2.5). Neste último caso, os valores de suporte são comparativamente mais robustos. Essa divergência nos resultados mostra que neste caso o nDNA esteja causando um ruído na análise filogenética. A baixa diversidade nucleotídica e haplotípica observada para estas sequências reforça ainda mais essa hipótese. A região IGS é um espaçador intergênico e devido à sua natureza não codificante, está sujeita a maior acúmulo de mutações. Entretanto, nas análises filogenéticas comparativamente feitas com ou sem a região IGS, a topologia dos ramos se manteve a mesma, embora a ausência da região IGS na árvore melhore a robustez dos ramos (Figura 2.4). Muitos trabalhos rejeitam o uso de íntrons ou espaçadores intergênicos devido a sua dificuldade de alinhamento e alta taxa de homoplasia (Avise, 2001; Ballard & Whitlock, 2004; Brady *et al.*, 2006; Schultz & Brady, 2008; Bacci *et al.*, 2009).

Associadas a essas considerações, o resultados do teste de Mantel (Tabela 2.4) apontam não ser possível correlacionar as distâncias geográficas e genéticas, sugerindo que a diversificação dessas populações não pode ser explicada por isolamento pela distância. Os resultados mostrados pela análise de distribuição *mismatch* mostram um perfil multimodal de distribuição, o que sugere um equilíbrio populacional condizente com táxons que não apresentam divergência e expansão recentes. Nossos resultados ainda mostram que primeira irradiação dentro de *A. sexdens* aconteceu por volta de 10 milhões de anos, confrontando os resultados obtidos por Solomon *et al* (2008), que sugere que a espécie teve seu auge de diversificação e expansão entre 10 mil e 1,8 milhões de anos. Provavelmente essa discrepância entre os resultados dos dois trabalhos está no fato de que o trabalho de 2008 não incluía ninhos de *A. sexdens piriventris*. Essa

diferenciação precoce do clado Norte pode estar relacionada à sua especialização em utilizar recursos vegetais de florestas. Ainda, outras capacidades adquiridas adiante na evolução possibilitaram que as formigas explorassem outros ambientes, escapando da Região Amazônica e colonizando outros habitats. Essas formigas apresentam grande plasticidade ambiental, pois são pragas de plantas nativas e cultivadas. Por isso, um evento vicariante recente pode ter sido a causa da separação entre as linhagens Central e Sul.

Conclusões

Os resultados de inferência filogenética mostram que *Atta sexdens* pode ser dividida em três linhagens distintas, que aparecem em todas as topologias obtidas para os genes nucleares ou mitocondriais. As topologias a partir dos marcadores combinados também foram bem suportadas, mas divergiram em relação a qual foi o primeiro evento cladogenético dentro de *A. sexdens*. A região IGS mitocondrial devido a sua característica hipervariável parece trazer ruído à análise. As análises de divergência indicam uma origem precoce de *A. sexdens* em relação à provável origem das formigas cortadeiras, por volta de 10 milhões de anos. Por isso acreditamos que *Atta sexdens* corresponde a um complexo de três espécies conforme já era defendido por Gonçalves (1965).

Capítulo 3: Investigação de Pseudogenes em formigas da tribo Attini (Formicidae: Myrmicinae)

Resumo

Pseudogenes são sequências de DNA que deixaram de codificar uma proteína funcional. Atualmente, são classificados segundo a sua origem como processados, não processados e *nuclear mitochondrial-like sequences (numts)*. Estes últimos são pseudogenes que tiveram sua origem a partir do mtDNA e foram transportados para o núcleo, sendo muitas vezes fonte de problema em estudos populacionais e filogenéticos, pois são geralmente co-amplificados juntamente com o seu “progenitor” mitocondrial, levando a falseamento das análises. No presente estudo, nós investigamos a presença dos *numts* N1 e N2 em formigas de diversos gêneros da tribo Attini e caracterizamos um terceiro tipo de *numt*, que denominamos N3. Os resultados confirmaram nossa hipótese de que N1 teve uma origem mais antiga, por volta de 10 milhões de anos, e que N2 e N3 originaram-se mais recentemente, há cerca de 5,5 e 7 milhões de anos, respectivamente. N2 e N3 parecem não estar submetidos a fortes pressões seletivas, pois o teste para seleção purificadora não foi significativo. Ao contrário, N1 pode ter adquirido alguma função importante, como modulação de algum gene, após sua transferência para o núcleo, pois os resultados de seleção purificadora foram significativos. N1 está presente em 8 espécies, sendo 7 do gênero *Atta* e outra do gênero *Acromyrmex*, enquanto N2 e N3 parecem ser exclusivos de *A. cephalotes* e *A. sexdens*. Nossos resultados ainda fornecem evidências sobre a origem do gênero *Atta* e sugerem que N1 possa ser utilizado como fonte de calibração como um marcador molecular fóssil.

Palavras chaves: Attini, *numts*, tempo de divergência, marcador fóssil.

Introdução

Tradicionalmente os pseudogenes são sequências de DNA ainda bastante similares estruturalmente aos genes que lhes deram origem, porém não produzem uma cadeia de aminoácidos funcional na maioria dos casos, pois apresentam mutações que levam a codificação abrupta de códons de parada e mudanças de fase de leitura (*frameshift*), alterando a codificação subsequente dos aminoácidos da cadeia (Bensasson *et al.*, 2001; D'Errico *et al.*, 2004; Martins *et al.*, 2007). Entretanto, este conceito vem sendo revisto, pois muitos estudos mostram que os pseudogenes podem ser transcritos e exercer função regulatória ou até mesmo serem expressos. Poliseno *et al.* (2010) demonstraram que o gene supressor de tumor *PTEN* é regulado por seu pseudogene *PTENP1*. Voorter *et al.* (2010) demonstraram que a inativação do gene *HLA-A* devido a uma deleção de 4kb originou um pseudogene. Ainda, Sen *et al.* (2010) descobriram que genes que dão origem a pseudogenes são altamente expressos, possuem elevado conteúdo GC e capacidade de codificar *hub*-proteínas (proteínas que realizam mais de 5 ligações com outras proteínas). Os pseudogenes são classificados em três tipos, assim designados de acordo com seu mecanismo de origem: processados, não processados e *numts* (Lopez, 1994; Bensasson *et al.*, 2001; D'Ericco, 2004; Ballard & Whitlock, 2004; Madsen *et al.*, 2010).

Numts são cópias nucleares de genes mitocondriais que foram transportadas para o núcleo, geralmente por eventos de transposição (Nugent & Palmer, 1991; Lopez *et al.*, 1994). Nas últimas décadas inúmeros estudos têm descrito pseudogenes numa grande variedade de organismo, incluindo bactérias (Wattan *et al.*, 2009; da Silva, comunicação pessoal), insetos e demais invertebrados e vertebrados, inclusive o homem (Martins *et al.*, 2007; den Tex *et al.*, 2010; Raboin *et al.*, 2010; Poliseno *et al.*, 2010). Os *numts* têm recebido especial atenção devido a sua alta ocorrência em estudos de filogenia baseados

em mtDNA, pois a co-amplificação desses pseudogenes juntamente com os genes mitocondriais é bastante comum e pode levar a inferências filogenéticas equivocadas, uma vez que eles não são ortólogos aos seus "progenitores" mitocondriais (Sorensson & Quinn, 1998; Song *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009; Hlaing *et al.*, 2009; Fritz *et al.*, 2010; Arthofer *et al.*, 2010b). Recentemente, den Tex *et al.* (2010) verificou a co-amplificação de *numts* em esquilos depositados em coleções científicas, o que é intrigante uma vez que o DNA se degrada ao longo do tempo nestas condições. Entretanto, existem estudos que apontam que a perda de função de alguns genes e a formação de pseudogenes está fortemente relacionada e tem papel importante na evolução de diferentes organismos. Goudet *et al.* (2008) verificaram que a perda progressiva de alelos do gene *ZP*, devido a sua transformação em pseudogenes, teve papel importante na evolução dos vertebrados. Muro *et al.* (2010) demonstrou que a origem de genes com atividades trans-regulatórias (trans-NATs) está associada à formação de pseudogenes.

Embora tenham a má reputação de causar ruído em vários estudos evolutivos, os *numts* são considerados úteis por alguns pesquisadores. Sawamura *et al.* (2008) verificaram que é possível estimar o fluxo gênico entre populações de *Drosophila* utilizando *numts* como marcadores. Bensasson *et al.* (2001) argumenta que devido a sua presença no núcleo e, conseqüentemente, menor taxa evolutiva, os *numts* poderiam ser utilizados como fósseis moleculares. Petrov *et al.* (1998) verificaram que a alta taxa de pseudogenes em *Drosophila* está relacionada à perda de genes e que tal fenômeno deve ter tido uma papel importante na evolução deste inseto.

Devido à grande ocorrência e importância dos *numts* várias metodologias já foram publicadas mostrando maneiras de identificá-los e, por sua vez, evitá-los (Wattan *et al.*, 2009; Rouchka & Cha, 2009). Estas metodologias incluem comparação de sequências suspeitas de serem *numts* com genes mitocondriais funcionais de organismos

próximos, testes de pressão seletiva, testes de distribuição *mismatch*, busca por códons de parada prematuros.

Martins *et al* (2007) verificaram que um *numt* então chamado N1 aparentemente estava congelado como um **fóssil molecular** por apresentar pouca variação nos espécimes amostrados e ter uma origem basal em relação a outro *numt* e a sua cópia mitocondrial original. No presente trabalho, nós (i) investigamos a prevalência desses *numts* e ou de suas variantes na tribo Attini, (ii) caracterizamos e posicionamos filogeneticamente um novo *numt*, aqui denominado N3, que foi detectado em *A. sexdens* por Bezerra *et al* (em prep.) e finalmente (iii) determinamos a provável data de transferência desses *numts* para o núcleo.

Foi analisada a presença dos pseudogenes previamente descritos por Martins *et al* (2007) em outras formigas da tribo Attini e também a caracterização de um novo pseudogene recém-encontrado exclusivamente em *A. sexdens*. Foram feitas sucessivos experimentos com vários espécimes de diferentes espécies da tribo Attini, cobrindo 12 dos 13 gêneros conhecidos (Brandão & Mayhé-Nunes, 2001; Schultz & Brady, 2008). Realizou-se ainda a estimativa do tempo em que esses pseudogenes migraram para o núcleo. Para isso, realizamos reações de PCR utilizando *iniciadores* já descritos para os *numts* conhecidos em Attini e novos *iniciadores* desenhados a partir do trabalho de Bezerra *et al* (em prep.).

Materiais e Métodos

Material biológico

Tabela 3.1: Espécies com amplificação positiva para *numts*.

Espécie	Numts investigados	n. de indivíduos amostrados
<i>Atta sexdens</i>	N1, N2, N3	60
<i>A. laevigata</i>	N1, N2, N3	10
<i>Acromyrmex heyeri</i>	N1, N2, N3	10
<i>Atta colombica</i>	N1, N2, N3	8
<i>Atta insularis</i>	N1, N2, N3	5
<i>Atta mexicana</i>	N1, N2, N3	5
<i>Atta texana</i>	N1, N2, N3	5
<i>Trachymyrmex</i>	N1, N2, N3	5
<i>Sericomyrmex</i>	N1, N2, N3	4
<i>Apterostigma</i>	N1, N2, N3	3
<i>Cyphomyrmex</i>	N1, N2, N3	3
<i>Mycocepurus</i>	N1, N2, N3	3
<i>Mycetarotes</i>	N1, N2, N3	3
<i>Mycetagroicus</i>	N1, N2, N3	3
<i>Mycetophylax</i>	N1, N2, N3	3
<i>Myrmicocrypta</i>	N1, N2, N3	3
<i>Mycetosoritis</i>	N1, N2, N3	3

Extração de DNA

Para a extração do DNA total, operárias menores foram trituradas em micro tubos de 1,5 mL contendo 550 μ L da solução de lise celular TNES (Tris Base 250 mM pH 7,5; NaCl 2M; EDTA 100 mM; SDS 2 %). Em seguida foram acrescentados 5 μ L de Proteinase K (20mg/mL) e a mistura foi incubada por 3 horas a 55° C. Foi feito então o tratamento com 5 μ L de RNase A (10mg/mL), com incubação por 30 minutos. A precipitação das proteínas foi feita a adição de 200 μ L de NaCl 5M. O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para um novo micro tubo, precipitado com igual volume de isopropanol 100 %, lavado com etanol 70 %, centrifugado e seco em centrífuga a vácuo. O *pellet* de DNA foi dissolvido em 35 μ L de tampão TE (1 mM Tris, 0,1mM EDTA).

Amplificação dos loci mitocondriais e *numts*

Foi analisada região do genoma mitocondrial que compreende os *loci* Citocromo Oxidase I (COI), Espaçador Intergênico (IGS), RNA Transportador de Leucina (tRNA-Leu) e o Citocromo Oxidase II (COII). A reação em cadeia da polimerase (PCR) para os loci mitocondriais *numts* foi realizada com o kit comercial *Pure Taq Read-To-Go PCR Beads* (GE HEALTHCARE), utilizando 6 pmol de cada um dos iniciadores descritos em Martins Jr *et al* (2007) e novos especificamente desenhados para amplificar o *numt* N3 (veja Tabela 3.2), ~100 ng de DNA total e água ultra pura suficiente para reação com volume final de 25 µL, nas seguintes condições: etapa inicial de desnaturação a 94° C por 5' seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94° C por 1', anelamento a 47° C por 30'' e extensão a 68° C por 2'. Somente para a amplificação do *numt* N1 foi necessário alterar a temperatura de anelamento para 50° C. Os produtos de PCR obtidos foram purificados com kit comercial *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE HealthCare).

Clonagem

Para identificação do *numt* N3 foi realizada clonagem dos produtos de PCR te *A. sexdens*. Os produtos de PCR foram inseridos em vetor plasmidial utilizando o kit de clonagem *CloneJet PCR Cloning Kit* segundo o protocolo do fabricante. Posteriormente, bactérias *E. coli* foram transformadas por choque térmico para introdução dos plasmídios e então semeadas em meio CG 4 % / Agar 1,5 % para crescimento *overnight* a 37° C. As colônias selecionadas foram inoculadas em 3 ml de meio CG 4 % líquido com antibiótico ampicilina 100mg/ml para selecionar apenas os transformantes positivos. A cultura cresceu *overnight* a 37° C e agitação à 180 rpm. A seguir, as culturas foram submetidas à minipreparação para extração do DNA plasmidial segundo Sambrook (1989).

Tabela 3.2: Conjunto de *iniciadores* utilizados neste estudo para amplificar especificamente os genes mitocondriais e pseudogenes (*numts*).

Iniciadores (sequencia 5'→ 3')	Locus	Referência
ANT-F (ATTCATTCTTATCTTGAAATATTATTC) + ANT-R2 (CAATAGTTTGATTTCTAG)	Mitocondrial (COI-IGS-tRNA ^{Leu} -COII)	Martins Jr <i>et al</i> (2007)
ANT-F+ANT-R3 (TTCATAAGTTCAGTATCATTGGTG)	<i>Numt1</i> (COI-IGS-tRNA ^{Leu} -COII)	Martins Jr <i>et al</i> (2007)
ANT-F2 (CTCTTCTATACCCAATTTCTATAACCC) + ANT-R (TTCATAAGTTCAGTATCATTGGTG)	<i>Numt2</i> (IGS-tRNA ^{Leu} -COII)	Martins Jr <i>et al</i> (2007)
ANT-F + NUMT3_R (GAA AAG TAA ATT AGA TGA GTG)	<i>Numt 3</i> (COI-IGS- tRNA ^{Leu})	Este estudo
NUMT3_F (GCT ATT GCT TAA TTT CTC C) + ANT-R	<i>Numt 3</i> (IGS- tRNA ^{Leu} -COII)	Este estudo

Sequenciamento

A reação de sequenciamento foi montada com 100 ng do produto de PCR purificado ou 250 ng do produto de clonagem, 6 pmol do iniciador ANT-F ou ANT-R (para o produto de PCR) ou 6 pmol de cada um dos iniciadores *forward* e *reverse* para o vetor de clonagem, 2,5 µL de Dyeamic ET Terminator (GE HealthCare), 2.5 µL de tampão “*save-money*” (200 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂) e 1 µL de água ultra pura. As reações foram incubadas em termociclador, com desnaturação inicial a 95° C por 5 minutos, seguido de 28 ciclos a 95° C por 1 minuto, 50° C por 1 minuto e 72° C por 4 minutos. Foi realizada uma reação para cada um dos iniciadores *forward* e *reverse*. Os produtos das reações de sequenciamento foram purificados e sequenciados em sequenciador automático ABI377 (Applied Biosystems).

Análises das sequências

As sequências obtidas neste estudo ou a partir do GenBank foram curadas e editadas semi-automaticamente através do pacote BioEdit (Hall, 1999) e o consenso final das sequências *forward* e *reverse* gerado e alinhado no programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). A divergência genética foi estimada baseada nos resultados de diversidade nucleotídica (π), diversidade haplotípica (h). As sequências foram inspecionadas para determinar o número de substituições sinônimas e não sinônimas, inserções e/ou deleções e mutações *frameshift* implementado pelo programa DnaSP

(Librado & Rozas, 2009). Os testes de pressão seletiva baseados em substituições sinônimas e não sinônimas (dn/ds ; ω) foi implementado pelo programa MEGA4 (Kumar *et al.*, 2004). As análises de equilíbrio demográfico foram implementadas através do teste de distribuição *mismatch* implementado pelo programa DnaSP (Librado & Rozas, 2009).

As análises filogenéticas foram realizadas pelo método de inferência Bayesiana, através do programa MrBayes 3.1 e baseadas no modelo evolutivo HKY+G, o melhor modelo evolutivo selecionado pelo programa jModeltest v0.1 (Posada, 2008). Por ser extremamente variável e de difícil obtenção de um alinhamento confiável, a região IGS foi excluída da análise. Foram realizadas 5 corridas independentes com 20.000.000 de gerações através de método de MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*) até que os valores da razão das verossimilhanças atingissem convergência, o que foi verificado pelos altos valores de ESS (acima de 300) no programa Tracer v1.5. A topologia e os valores de probabilidade *a posteriori* foram calculados a partir dados paramétricos da fase estacionária da distribuição posterior, sendo que 25 % das amostragens (*burnin*), que correspondem à fase não estacionária, foram descartadas. A árvore final foi gerada a partir dos resultados análise de inferência Bayesiana através do programa FigTree v1.31.

Análises de tempo de divergência dos *numts*

Para as análises de divergência nós utilizamos uma abordagem Bayesiana com modelo de relógio molecular relaxado e não correlacionado ao logaritmo normal implementado pelo programa BEAST v1.6.1, juntamente com a probabilidade *a priori* das árvores definida como *Yule process* (Drummond *et al.*, 2002, 2006; Drummond & Rambaut, 2007). O modelo de evolução nucleotídica escolhido foi o GTR+I+G com três partições de códons (códons 1, 2, 3). O modelo de substituição, a taxa de

heterogeneidade e a frequência de bases foram configurados como não relacionados. A árvore foi enraizada utilizando um espécime de *Wasmannia* sp (Formicidae: Myrmicinae) como grupo externo. A idade dos nós internos foi calibrada seguindo uma distribuição normal *a priori* (média=10.0; desvio padrão=1,2) conforme definido para as formigas cortadeiras (Schultz & Brady, 2008); uma distribuição *a priori* e lognormal – *Cyphomyrmex rimosus* (média=2,2, desvio padrão=0,5; offset=15,0) e *Trachymyrmex* SP (média=1,5; desvio padrão=0,5; offset=15,0), considerando os registros fósseis das formigas cultivadoras de fungo e também seguindo a metodologia descrita por Schultz & Brady (2008). As buscas MCMC foram realizadas com 20.000.000 de gerações, sendo descartados 2.000.000 de gerações iniciais correspondentes a fase não estacionária. As buscas atingiram convergência suficiente como indicado pelos altos valores de ESS para todos os parâmetros, platôs relativos aos tempos de divergência após o descarte da fase não estacionária e pela reprodutibilidade dos resultados após dez corridas independentes. Os resultados de todas as corridas independentes foram reunidos no programa Tracer v1.5 e relatados como valores médios de \pm 95% em relação aos limites superiores e inferiores. Para melhor visualização dos resultados de tempo de divergência, as árvores das melhores corridas, inferidas a partir dos menores valores de $-\log$ verossimilhança, foram combinadas no programa TreeAnnotator v1.6.1 e visualizadas no programa FigTree v1.3.1 (Rambaut & Drummond, 2008).

Resultados e Discussão

Desde Martins *et al* (2007), esta é a primeira prospecção de pseudogenes em outras espécies compreendendo os 13 gêneros da tribo Attini. Nós verificamos que o então chamado *numts* 1 (N1) está presente em *A. sexdens*, *Acromyrmex heyeri*, *Atta laevigata*, *A. texana*, *A. mexicana*, *A. insularis* e *A. colombica*. N2 não foi encontrado em nenhuma outra espécie além de *A. cephalotes*, em que a ocorrência deste *numts*

parece exclusiva. Finalmente, N3 também foi encontrado apenas em *A. sexdens* (tabela 3.3). Para comparação, foram utilizadas sequências mitocondriais das mesmas espécies e também obtidas por Martins *et al* (2007).

Tabela 3.3: Espécies com amplificação positiva para *numts*.

Espécie / <i>numts</i>	N1	N2	N3	Percentual de indivíduos positivos em relação aos amostrados
<i>Atta sexdens</i>	X	-	x	100%
<i>A. laevigata</i>	X	-	-	100%
<i>Acromyrmex heyeri</i>	X	-	-	100%
<i>Atta colombica</i>	X	-	-	100%
<i>Atta insularis</i>	X	-	-	100%
<i>Atta mexicana</i>	X	-	-	100%
<i>Atta texana</i>	X	-	-	100%
<i>Trachymyrmex</i>	-	-	-	100%
<i>Sericomyrmex</i>	-	-	-	100%
<i>Apterostigma</i>	-	-	-	100%
<i>Cyphomyrmex</i>	-	-	-	100%
<i>Mycocepurus</i>	-	-	-	100%
<i>Mycetarotes</i>	-	-	-	100%
<i>Mycetagroicus</i>	-	-	-	100%
<i>Mycetophylax</i>	-	-	-	100%
<i>Myrmicocrypta</i>	-	-	-	100%
<i>Mycetosoritis</i>	-	-	-	100%

x- amplificação positiva; - amplificação negativa.

Foram identificados 14 novos haplótipos de N1 que apresentam identidade de 97~99% com N1 de *A. cephalotes* e 4 haplótipos de N3 exclusivos de *A. sexdens*. Os haplótipos mitocondriais N1 e N3 apresentaram diversidades nucleotídicas de variáveis conforme apresentado na tabela abaixo. A diversidade haplotípica (h) em N1 e N3 foi de 0,874 e 0,765, respectivamente, e próxima ao valor de diversidade dos genes mitocondriais analisados ($h=0,952$) (Tabela 3.3). O teste de força de seleção (ω) mostrou que os loci mitocondriais e N1 estão sob seleção purificadora com valores de p bastante significativo (0,002 e 0,02, respectivamente), enquanto N3 não ($p=1,000$) (Tabela 3.3). Este resultado diverge de Martins *et al* (2007) e de vários outros (Bensasson *et al.*, 2001). Estes autores verificaram que N1 e N2 não estavam sujeitos a

seleção purificadora, o que permite sua rápida diversificação. Entretanto, nosso estudo amostrou uma maior quantidade e diversidade de haplótipos de N1, o que explicaria nossos resultados. N1 está presente em formigas basais dentro de gênero *Atta* e numa espécie de *Acromyrmex*. Isso sugere que o numt1 mesmo com uma provável origem ancestral ao gênero *Atta*, adquiriu alguma função importante e passou a ser submetido à forte pressão seletiva. Entretanto, essa provável função deve ter surgido após sua relativa diversificação, pois a variação das sequências nucleotídicas e de aminoácidos traz essa indicação (Figura 3.1).

Tabela 3.3: Diversidade e teste de seleção

Locus	<i>n</i>	<i>H</i>	π	ω (<i>p</i>)	Ref.
Mitocondrial	30	0,975(0,016)	0,02278	0,002	Martins <i>et al</i> (2007) + este estudo
N1	14	0,980 (0,012)	0,123(0,008)	0,020	Este estudo
N3	4	0,800 (0,0254)	0,015(0,02)	1,000	Este estudo

Número (*n*) e diversidade (*h*) de haplótipos, diversidade nucleotídica (π) e teste de seleção (ω – valores de *p*). Valores de $p < 0,05$ estão em negrito e são significativos.

Comparativamente às sequências mitocondriais, a região COI em N1 apresentou mais sítios polimórficos e não sinônimos do que a região COII. Já N3 apresentou em COI menos substituições não sinônimas do que em COII em relação às sequências mitocondriais. Os numts N1 e N3 apresentaram menos sítios não sinônimos em COI do que em COII. Ainda, a variante de N1 encontrada em *A. sexdens* apresentou pouca variação não sinônima em COI comparado ao gene mitocondrial, ao passo que as maiores variações estavam em COII, que apresentou códon de parada interno e deleção de 8 nucleotídeos que casou mutação *frameshift* (Figura 3.1). A região IGS apresentou 124 pb em N1 e 246 pb em N3, ambos não apresentando variação entre os haplótipos. A tabela 3.4 resume os números de sítios polimórficos e não sinônimos entre as sequências mitocondriais e os numts N1 e N3.

```

          10      20      30      40
e1087_SES0  IINMFFLNSSLEWLSKYPPLNHSFTEIPSTIA*
SeS040220M  .....S..M...S...T.S*-----
CO656M      .....S..M...S...T.S*-----
SeS040125N2 .....S..M..LS..A..*-----
SeS040120N2 .....S..M...S...A..*-----
GV15080522  .....F...W.S.....?..*NSLKMVLFN-
E990N1F     ...IS.....S.....M..M.QKLIQTNNIL**
AOMB100904  ...ISL.....S.....M..M.QKLIQTNNIL**
CO5172670N1 .N.IS.....S.....M..M.QKLIQINNIL**
E1021c2N1   ...IS.....S.....M..M.QKLIQTNNIL**
E1038C1N1   ...IS.....S.....M..M.QKLIQTNNIL**
AsexdensN3  .NK*I.S*FF.SMIK.M.TFKS*IYSNSCYCL-----
AsexdensN3  .....SMIK.M.TFKS*IYSNSCYCL-----
AsexdensN3  .....A..*-----
AsexdensN3  ..K.....Q*IYSNSCYCL-----
AsexdensN3  .....A..*-----
AsexdensN3  ..KK.....Q*IYSNSCYCL-----
LIG3_A_texN1 .....S.....T...*-----
LIG3_A_texN1 .....S.....T...*-----
LIG1_A_insN1 ...I.....D..S...R.RK..MS.ME*-----
LIG1_A_insN1 ...I.....QC.S.....SDSNTLNS-----
LIG2_A_mexN1 .THI.....QC.S.....MS.M*-----
LIG2_A_mexN1 ...I..F.....L*IYSN...NMI*YGSMDHW-----
LIG3_A_texN1 ...I..F.*...L..YP.LNHSFTEIPSMT*F-----
LIG2_A_mexN1 ...I.....*..RS...I...ML.K*-----
LIG1_A_insN1 ...I.....F...S.....M.ML.M*-----
LIG3_A_texN1 ...I.....F...S.....M.ML.M*-----
LIG1_A_insN1 ...I.....S..A.....M..M*-----
LIG2_A_mexN1 ...I.L.....NS.....M..M*-----

```

COI

```

          10      20      30
e1087_SES040208-02_Macapa_AP INTWLISLQDSNSPTYDLMIFFHDFAMII-
SeS040220M  .....
CO656M      .....
SeS040125N2 .....F.....
SeS040120N2 .....F.....
GV15080522N1F .....S...*FPYLWFN.FFSMIYNH-----
E990N1F     ...S...N.....PW.MI.--
AOMB10090402N1F .....S...N.....PWIYNH--
CO5172670N1F .....S...N.....PW.MI.--
E1021c2N1   ...S...N.....PW.MI.--
E1038C1N1   ...S...N.....PW.MI.--
AsexdensN3a  ..M.....I.....L
AsexdensN3b  ..M.....I.....L
AsexdensN3c  ..M.....I.....L
AsexdensN3d  ..M.....I.....L
AsexdensN3e  ..M.....I.....V..L
AsexdensN3f  ..M.....I.....L
LIG3_A_texanaN1a .....S.....MI*WFF.HDL*S---
LIG3_A_texanaN1c .....S.....MI*WFF.HDL*S---
LIG1_A_insularisN1b .....SM...N.Y..P.....PW.MI---
LIG2_A_mexicanaN1a .....SM...Y.Y..P.....L*---
LIG2_A_mexicanaN1b ...ASS.....PW.MI---
LIG3_A_texanaN1b ...ASS..P.....PW.MI---
LIG2_A_mexicanaN1c .....S.L..N...L.....PW.MI---
LIG1_A_insularisN1 .....S...N...LLMT*WF...L*S---
LIG3_A_texanaN1d .....S...RN...LLMT*WF...L*S---
LIG1_A_insularisN1c .....S..F..*LPYLWFTDF.SMIYNH---
LIG2_A_mexicanaN1d .....S...N.....PW.MI---

```

COII

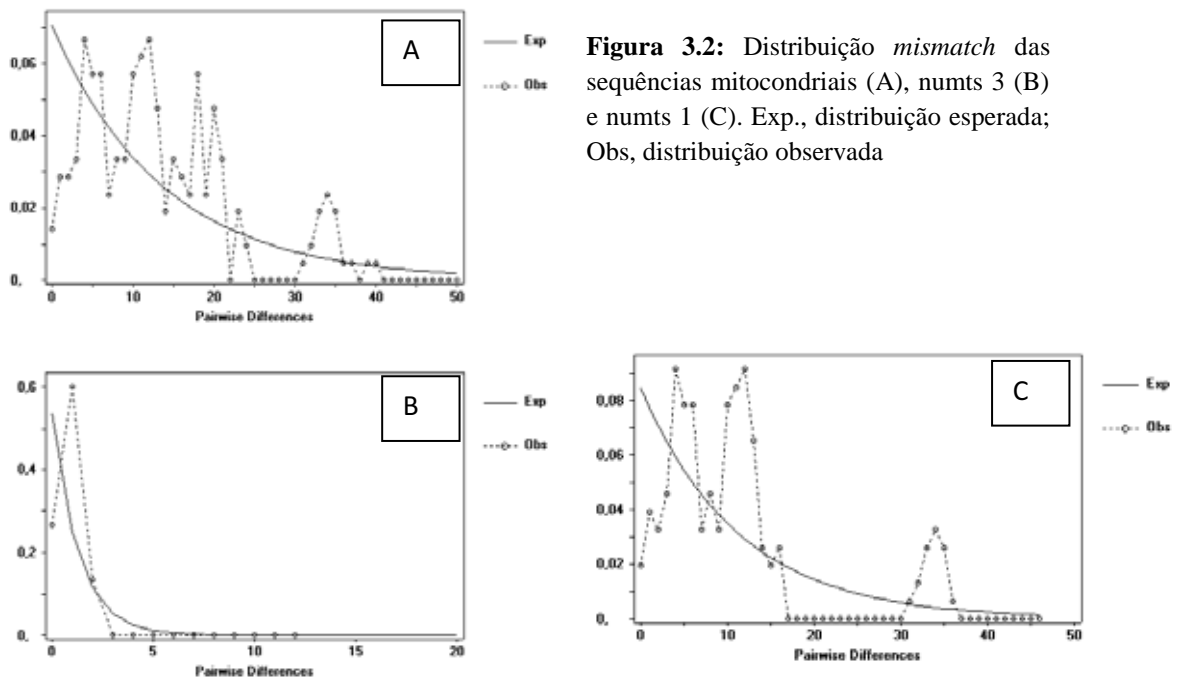
Figura 3.1: Alinhamento da sequência de aminoácidos a partir dos genes COI e COII dos *loci* mitocondriais, N1, N2 e N3. Pontos correspondem a regiões conservadas e letras indicam mudança de aminoácidos. Asteriscos representam códons de parada.

Tabela 3.4: Resumo dos números substituições nucleotídicas entre as sequências mitocondriais e os *numts*.

col ^{COII}	Mitocondrial	N1	N3
Mitocondrial	-	15(12)	16(13)
N1	19(7)	-	20(15)
N3	19(6)	17(9)	-

. Os números fora dos parênteses indicam o número de substituições e os valores dentro dos parênteses indicam o número de substituições não sinônimas. Valores abaixo da diagonal são de COI, e acima de COII.

O teste de distribuição demográfica de *mismatch* (Figura 3.2) demonstrou que os haplótipos de N1 encontrados neste estudo e associados ao já descritos por Martins *et al* (2007) apresentaram uma distribuição multimodal. Este resultado indica que esses genes estão em equilíbrio, o que provavelmente não foi verificado naquele estudo devido a não amostragem de N1 para outras espécies da tribo. Já N3 apresenta uma distribuição unimodal o que condizente com uma origem e expansão recentes (Solomon *et al*, 2008). Os loci mitocondriais apresentam uma distribuição também multimodal, o que é esperado para sequências codificadoras funcionais e sobre forte pressão seletiva (Harpending, 1994). Isso nos leva a imaginar que o N1 possa ter adquirido no núcleo alguma função reguladora de transcrição e ou tradução, o que já foi descrito em outros estudos (Muro *et al.*, 2010).



Os resultados das análises de inferência Bayesiana e de estimativa de tempo de divergência (Figura 3.3) produziram uma árvore cuja topologia confirma uma irradiação ancestral de N1 (probabilidade *a posteriori* = 0,989) por volta de 10 milhões de anos, sugerindo uma transferência para o núcleo concomitantemente a origem provável das formigas cortadeiras (Schultz & Brady, 2008). A irradiação de N2 (probabilidade posterior=0,962) aconteceu mais recentemente, por volta de 5,5 milhões de anos, aproximadamente 500 mil anos antes da provável diversificação de *A. cephalotes* (Solomon *et al.*, 2008). A irradiação de N3 (probabilidade posterior=0,975), que é clado irmão do clado que deu origem a N2 e aos haplótipos mitocondriais de *A. cephalotes*, *A. insularis* e *A. mexicana*, aconteceu há cerca 7 milhões de anos e sua diversificação somente há 2,8 milhões de anos. Essa transferência mais recente de N3 em relação à origem e a diversificação de *A. sexdens* é inquietante, pois não explica por que este pseudogene é encontrado somente nessa espécie até o momento. Ainda, verificamos que o ancestral comum mais recente de N3 e do clado que deu origem a N2 possuía ambos os haplótipos. Os resultados ainda nos dão pistas sobre a provável diversificação do gênero *Atta*, que pode ter ocorrido há 8 e 9 milhões de anos, o que corrobora os resultados de (Schultz & Brady, 2008) e os apresentados no Capítulo 2.

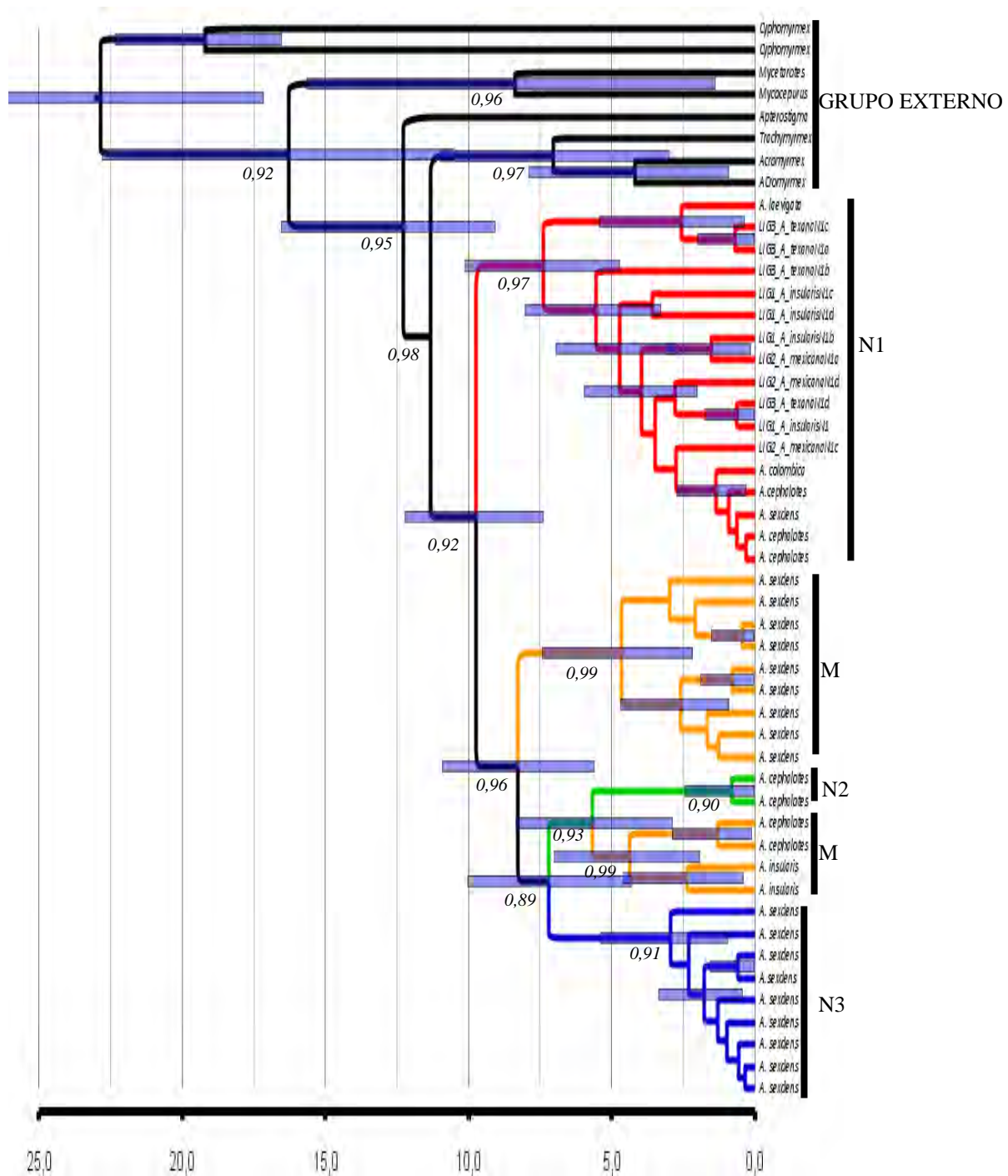


Figura 3.3: A topologia representa árvore filogenética obtida após inferência Bayesiana com buscas de 20.000.000 de gerações e descartadas as primeiras 2.000.000 de gerações como burnin. Valores abaixo dos ramos indicam o suporte (probabilidade *a posteriori*). Valores abaixo de 0,5 foram omitidos. Clado vermelho indica o clado N1, em amarelo haplótipos mitocondriais, verde claro, irradiação de N2 e azul irradiação de N3.

Conclusões

Conjuntamente, nossos resultados sugerem que N1 pode ter adquirido alguma função importante após sua origem e diversificação e sido fixado dentro dos diferentes gêneros amostrados. Ainda, este *numt* pode constituir um bom marcador de calibração fóssil para estudos de divergência.

Referências Bibliográficas

- Agosti, D., & N. F. Johnson. Editors. (2005). Antbase. World Wide Web electronic publication. antbase.org, version (05/2005). Disponível em <<http://www.antbase.org>>. Consultado em 25/01/2011.
- Aguiar, O., M. Bacci, et al. (2007). Phylogenetic relationships of *Pseudis* and *Lysapsus* (Anura, Hylidae, Hylinae) inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences." *Cladistics* 23: 455-463.
- Arthofer, W., D. N. Avtzis, et al. (2010) "Mitochondrial phylogenies in the light of pseudogenes and Wolbachia: re-assessment of a bark beetle dataset." *Zookeys*(56): 269-280.
- Avise J.C. (2001) *Phylogeography: the history and formation of species*. 447p. Harvard University Press, London.
- Avise, J. C., J. Arnold, et al. (1987). "Intraspecific Phylogeography - The Mitochondrial-Dna Bridge Between Population-Genetics And Systematics." *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489-522.
- Ayala FJ (1997) Vagaries of the molecular clock. *Proc Nat Acad Sci U S A* 94: 7776–7783.
- Bacci, M., S. E. Solomon, et al. (2009). "Phylogeny of leafcutter ants in the genus *Atta* Fabricius (Formicidae: Attini) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences." *Molecular Phylogenetics and Evolution* 51(3): 427-437.
- Ballard J.W.O. & Whitlock, M. (2004) The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*. 13: 729-744.
- Behere, G. T., W. T. Tay, et al. (2007). "Mitochondrial DNA analysis of field populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera : Noctuidae) and of its relationship to *H-zea*." *Bmc Evolutionary Biology* 7.
- Bensasson D., Zhang D.X, Hartl D.L., Hewitt G.M. (2001) Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. *Trends Ecol. Evol.*, 16: 314-321.
- Bolton, B., Alpert, G., Ward, P., Naskrecki, P., (2006). *Bolton's Catalogue of the Ants of the World: 1758–2005*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Borgmeier, T. (1950). Estudos sobre *Atta* (Hym. Formicidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 48: 239-263.

- Borgmeier, T. (1959) Revision der gattung *Atta fabricius* (Hymenoptera, Formicidae). *Studia Entomológica*, 2: 321-390.
- Borsa, P. (2002). "Allozyme, mitochondrial-DNA, and morphometric variability indicate cryptic species of anchovy (*Engraulis encrasicolus*)." *Biological Journal of the Linnean Society* 75(2): 261-269.
- Brady, S. G., T. R. Schultz, et al. (2006). Evaluating alternative hypotheses for the early evolution and diversification of ants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(48): 18172-18177.
- Brandão, C.R.F., Mayhé-Nunes, A. J. (2001). A new fungus-growing ant genus, *Mycetagroicus* gen n, with the description of three new species and comments on the monophyly of the Attini (Hymenoptera: Formicidae) *Sociobiology* 38:639–665.
- Britten RJ (1986) Rates of DNA sequence evolution differ between taxonomic groups. *Science* 231: 1393–1398.
- Buschinger, A. (1986) Evolution of social parasitism in ants. *Trends in Ecology and Evolution* 1: 155–160.
- Cameron, R.S., Riggs, C., (1985). Distribution, impact and control of the Texas leafcutting-ant-1983 survey results. *Texas Forest Service Publication* 139.
- Carlos, A. A., L. C. Forti, et al. (2010). "Behavioral Response of the Leafcutter Ant, *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera, Formicidae), to Components of Citrus Pulp." *Sociobiology* 55(2): 509-518.
- Castilho, A. M. C., M. E. Fraga, et al. (2010) "Selection of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* isolates pathogenic to *Atta bisphaerica* and *Atta sexdens rubropilosa* soldiers under laboratory conditions (vol 40, pg 1243, 2010)." *Ciencia Rural* 40(9): 2051-2051.
- Cherrett, J.M., (1986a). History of leaf cutting ant problem. In: Lofgren, C.S., Vander Meer, R.K. (Eds.), pp. 10–17.
- Cherrett, J.M., (1986b). The biology pest status and control of leaf-cutting ants. *Agricultural Zoology Reviews* 1: 1–38.
- Cherrett, J.M., (1986c). The economic importance and control of leaf-cutting ants. In: Vinson, S.B. (Ed.), *Economic Impact and Control of Social Insects*. Praeger, New York, pp. 165–192.
- D'Errico I., Gadaleta G. & Saccone, C. (2004). Pseudogenes in metazoa: origin and features. *Brief. Funct Genom. Proteom.* 3: 157-167.
- Delabie, J.H.C; Nascimento, I.C.; Fonseca, E.; Sgrillo, R.B.; Soares, P.A.O.; Casimiro, A.B. & Furst, M. (1997). Biogeografia das formigas cortadeiras (HYMENOPTERA; FORMICIDAE; MYRMICINAE; ATTINI) de importância econômica no leste da Bahia e nas regiões periféricas dos estados vizinhos. *Agrotropica*, 9(2): 49-58.
- den Tex, R. J., J. E. Maldonado, et al. (2010) "Nuclear copies of mitochondrial genes: another problem for ancient DNA." *Genetica* 138(9-10): 979-984.
- Diehl-Fleig, E., *Formigas: Organização social e ecologia comportamental*, 1 ed., São Leopoldo - RS, Editora Unisinos, 1995, 165p.

- Drummond, A. J. and A. Rambaut (2007). "BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees." *Bmc Evolutionary Biology* 7.
- Drummond, A. J., S. Y. W. Ho, et al. (2006). "Relaxed phylogenetics and dating with confidence." *Plos Biology* 4: 699-710.
- Farrelly, F. and Butow, R.A. (1983) Rearranged mitochondrial genes in the yeast nuclear genome. *Nature* 301: 296–301.
- Fernández, F. & Palacio, E. E. (2003). Sistemática y filogeia de lãs hormigas: breve repaso a propostas. In: *Introducción a las hormigas de la región Neotropical*. Humboldt, Bogotá, Colombia. p. 29-44.
- Fowler, H.G., Silva, V.P., Saes, N.B., (1986). Population dynamics of leaf-cutting ants: a brief review. In: Lofgren, C.S., Vander Meer, R.K. (Eds.), *Fire Ants and Leaf-Cutting Ants: Biology and Management*. West-View Press, Boulder, Colorado, pp. 123–145.
- Fritz, U., S. R. Daniels, et al. (2010) "Mitochondrial phylogeography and subspecies of the wide-ranging sub-Saharan leopard tortoise *Stigmochelys pardalis* (Testudines: Testudinidae) - a case study for the pitfalls of pseudogenes and GenBank sequences." *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 48(4): 348-359.
- Futuyma, D. J. (2005). *Evolution*, First Edition.
- Gonçalves, C.R. (1942). Contribuição para o gênero *Atta* Fabr., das formigas saúvas. *Bol. Soc. Bras. Agronomia*, Rio de Janeiro, 5(3).
- Gonçalves, C.R., 1986. Filogenia do gênero *Atta* Fabricius (Hymenoptera, Formicidae). *Anais do VI Congresso Brasileiro de Zoologia*. Publicações Avulsas do Museu Nacional, Rio de Janeiro, pp. 13–17.
- Grazziotin, F. G., M. Monzel, et al. (2006). Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Ecology* 15(13): 3969-3982.
- Harrison P.M., Milburn D., Zhang Z., Bertone P., (2003). Gerstein M. Identification of pseudogenes in the *Drosophila melanogaster* genome. *Nucleic Acid. Research*. 31: 1033-1037.
- Harpending HC (1994) Signature of ancient population-growth in a lowresolution mitochondrial-DNA mismatch distribution. *Human Biology* 66: 591–600.
- Hasegawa M, Kishino H (1989) Heterogeneity of tempo and mode of mitochondrial DNA evolution among mammalian orders. *Jpn J Genet* 64: 243–258.
- Hebert, P. D. N., E. H. Penton, et al. (2004). "Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(41): 14812-14817.
- Hennig, W. *Phylogenetic Systematics*, (1966). University of Illinois, Press, Chicago

- Hernandez, J.V., Ramos, C., Borjas, M., Jaffe, K., (1999). Growth of *Atta laevigata* (Hymenoptera : Formicidae) nests in pine plantations. *Florida Entomologist* 82: 97–103.
- Hlaing, T., W. Tun-Lin, et al. (2009). "Mitochondrial pseudogenes in the nuclear genome of *Aedes aegypti* mosquitoes: implications for past and future population genetic studies." *Bmc Genetics* 10.
- Hölldobler, B. & Wilson, E.O. (1990). *The ants*. The Belknap Press of Harvard University Press: Cambridge, MA, USA.
- KUSNEZOV, N. (1963). Zoogeografia de las hormigas en Sudamerica. *Acta Zool. Lin.* 18: 25-186.
- Lacerda, F. G., T. M. C. Della Lucia, et al. (2010) "Mortality of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers in contact with colony waste from different plant sources." *Bulletin of Entomological Research* 100(1): 99-103.
- Li, D. M., L. Q. Fan, et al. (2009). "The complete mitochondrial genome of *Macaca thibetana* and a novel nuclear mitochondrial pseudogene." *Gene* 429(1-2): 31-36.
- Librado, P; Rozas, J (2009). DnaSp v5: a software for the comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics.* 25: 1451-1452.
- Licht, H. H. D., M. Schiott, et al. (2010). Evolutionary transitions in enzyme activity of ant fungus gardens. *Evolution* 64(7): 2055-2069.
- Loeck, A.E.; Grützmacher, D. D.; STORCH, G. (2001). Distribuição geográfica de *Atta sexdens piriventris santschi*, 1919, nas principais regiões agropecuárias do estado do Rio Grande do Sul. *Rev. Bras. de AGROCIÊNCIA*, 7(1): 54-57.
- Lopez, J.V., Yuhki, N., Masuda, R., Modi, W. and O'Brien, S.J. (1994) Numt, a recent transfer and tandem amplifications of mitochondrial DNA to the nuclear genome of the domestic cat. *Journal of Molecular Evolution* 39: 174–190.
- Madsen, O., T. T. Kortum, et al. (2010) "Loss of Octarepeats in Two Processed Prion Pseudogenes in the Red Squirrel, *Sciurus vulgaris*." *Journal of Molecular Evolution* 71(5-6): 356-363.
- MARICONI, F.A.M. (1970). *As Saúvas*. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 167p.
- Martins, J., S. E. Solomon, et al. (2007). "Nuclear mitochondrial-like sequences in ants: evidence from *Atta cephalotes* (Formicidae : Attini)." *Insect Molecular Biology* 16(6): 777-784.
- Miyashira, C. H., D. G. Tanigushi, et al. (2010) "Comparison Of Radial Growth Rate Of The Mutualistic Fungus Of *Atta Sexdens Rubropilosa* Forel In Two Culture Media." *Brazilian Journal of Microbiology* 41(2): 506-511
- Moritz, C., T. E. Dowling, et al. (1987). "Evolution Of Animal Mitochondrial-Dna - Relevance For Population Biology And Systematics." *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 269-292.

- Moutinho, P., Nepstad, D.C., Davidson, E.A., (2003). Influence of leaf-cutting ant nests on secondary forest growth and soil properties in Amazonia. *Ecology* 84, 1265–1276.
- Mueller, U. G., H. Ishak, et al. (2010). Placement of attine ant-associated *Pseudonocardia* in a global *Pseudonocardia* phylogeny (*Pseudonocardiaceae*, *Actinomycetales*): a test of two symbiont-association models. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 98(2): 195-212.
- Mueller, U. G., J. J. Scott, et al. (2010b). Monoculture of Leafcutter Ant Gardens. *Plos One* 5(9).
- Mueller, U. G., N. M. Gerardo, et al. (2005). The evolution of agriculture in insects. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* 36: 563-595.
- Mueller, U. G., Schultz, T. R., Currie, C. R. et al (2001). The origin of the ant-fungus mutualism. *Quarterly Review of Biology*. 76(2): 169-197.
- Muro, E. M. and M. A. Andrade-Navarro (2010) "Pseudogenes as an alternative source of natural antisense transcripts." *Bmc Evolutionary Biology* 10.
- Njabo, K. Y., R. C. K. Bowie, et al. (2008). Phylogeny, biogeography and taxonomy of the African wattle-eyes (Aves: Passeriformes: Platysteiridae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48(1): 136-149.
- Nugent, J.M. and Palmer, J.D. (1991) RNA-mediated transfer of the gene COXII from the mitochondrion to the nucleus during flowering plant evolution. *Cell* 66: 473–481.
- Ossario, P.N., Sibley, D.L. and Boothroyd, J.C. (1991) Mitochondrial-like DNA sequences flanked by direct and inverted repeats in the nuclear genome of *Toxoplasma gondii*. *J Mol Biol* 22: 525–536.
- Petrov, D. A., Y. C. Chao, et al. (1998). "Pseudogene evolution in *Drosophila* suggests a high rate of DNA loss." *Molecular Biology and Evolution* 15(11): 1562-1567.
- Poliseno, L., L. Salmena, et al. (2010) "A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology." *Nature* 465(7301): 1033-U90.
- Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253-1256.
- Poulsen, M.; Boomsma J. J. (2005). Mutualistic fungi control crop diversity in fungus-growing ants. *Science*, Washington, 307(5710): 741-744.
- Rabeling, C. & M. Bacci (2010). A new workerless inquiline in the Lower Attini (Hymenoptera: Formicidae), with a discussion of social parasitism in fungus-growing ants. *Systematic Entomology* 35(3): 379-392.
- Raboin, M. J., A. F. Timko, et al. (2010) "Evolution of *Caenorhabditis* Mitochondrial Genome Pseudogenes and *Caenorhabditis briggsae* Natural Isolates." *Molecular Biology and Evolution* 27(5): 1087-1096.
- Rambaut A, Bromham L: (1998). Estimating divergence dates from molecular sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 15:442-448.

- Robins, J. H., M. Hingston, et al. (2007). "Identifying *Rattus* species using mitochondrial DNA." *Molecular Ecology Notes* 7(5): 717-729.
- Robinson, S.W., Fowler, H.G. (1982). Foraging and pest potential of Paraguayan grasscutting ants (*Atta* and *Acromyrmex*) to the cattle industry. *Zeitschrift Fur Angewandte Entomologie–Journal of Applied Entomology* 93: 42–54
- Rodrigues, A., Bacci, M., Mueller, U. G., et al (2008). Microfungal “weeds” in the leafcutter ant symbiosis. *56(4): 604-614.*
- Ronquist, F. and J. P. Huelsenbeck (2003). "MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models." *Bioinformatics* 19(12): 1572-1574.
- Rouchka, E. C. and I. E. Cha (2009). "Current Trends in Pseudogene Detection and Characterization." *Current Bioinformatics* 4(2): 112-119.
- Sawamura, K., K. Koganebuchi, et al. (2008). "Potential gene flow in natural populations of the *Drosophila ananassae* species cluster inferred from a nuclear mitochondrial pseudogene." *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48(3): 1087-1093.
- Silva-Pinhati, A. C. O. ; Bacci Jr., M. ; Pagnocca, F. C. ; Hebling, M. J. A. ; Bueno, O. C. ; Bruschi, S. M. ; Martins, V. G. (2004). Low diversity within sympatric and allopatric fungal symbiotic with leaf-cutting ants (Attini: Formicidae).. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 37: 1463-1472.
- Schultz, T. R. & S. G. Brady (2008). "Major evolutionary transitions in ant agriculture." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(14): 5435-5440.
- Schultz, T. R.; Meier, R. (1995). A phylogenetic analysis of the fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini) based on morphological characters of the larvae. *Systematic Entomology, Oxford*, 20(4): 337-370.
- Sen, K., S. Podder, et al. (2010) "Insights into the genomic features and evolutionary impact of the genes configuring duplicated pseudogenes in human." *Febs Letters* 584(18): 4015-4018.
- Silva, A. Bacci, M. Jr., Siqueira, C. G., Bueno, O. C., Pagnocca, F. C., Hebling, M. J. A. (2003). Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. *Journal of Insect Physiology, Oxford*, 49(4): 307-313.
- Solomon, S. E., M. Bacci, et al. (2008). Paleodistributions and Comparative Molecular Phylogeography of Leafcutter Ants (*Atta* spp.) Provide New Insight into the Origins of Amazonian Diversity. *Plos One* 3(7).
- Song, H., J. E. Buhay, et al. (2008). "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* 105(36): 13486-13491.
- Sorenson, M.D. and Quinn, T.W. (1998) Numts: a challenge for avian systematics and population biology. *Auk* 115: 214–221

- Sternberg, L.D., Pinzon, M.C., Moreira, M.Z., Moutinho, P., Rojas, E.I., Herre, E.A., (2007). Plants use macronutrients accumulated in leaf-cutting ant nests. *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences* 274, 315–321.
- Sturmbauer, C., G. B. Opadiya, et al. (1999). "Mitochondrial DNA reveals cryptic oligochaete species differing in cadmium resistance." *Molecular Biology and Evolution* 16(7): 967-974.
- Swofford, D.L. (2003). *Phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0b10*. Illinois Natural History Survey, Champaign.
- Tarjuelo, I., D. Posada, et al. (2001). "Cryptic species of *Clavelina* (Ascidiacea) in two different habitats: harbours and rocky littoral zones in the northwestern Mediterranean." *Marine Biology* 139(3): 455-462.
- Thibaud-Nissen, F., O. Y. Shu, et al. (2009). "Identification and characterization of pseudogenes in the rice gene complement." *Bmc Genomics* 10.
- Thompson, J.D.; Higgings, D.G.; Gibbson, T.J. (1994). *CusltalW*: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gaps penalties and weight matrix choice, *Nuc. Ac. Res.*
- Varon, E.H., Eigenbrode, S.D., Bosque-Perez, N.A., Hilje, L., (2007). Effect of farm diversity on harvesting of coffee leaves by the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. *Agricultural and Forest Entomology*. 9: 47–55.
- Voorter, C. E. M., N. Lauterbach, et al. (2010) "Inactivation of a functional HLA-A gene A 4-kb deletion turns HLA-A*24 into a pseudogene." *Human Immunology* 71(12): 1197-1202.
- Wattam, A. R., K. P. Williams, et al. (2009). "Analysis of Ten *Brucella* Genomes Reveals Evidence for Horizontal Gene Transfer Despite a Preferred Intracellular Lifestyle." *Journal of Bacteriology* 191(11): 3569-3579.
- Wattam, A. R., K. P. Williams, et al. (2009). "Analysis of Ten *Brucella* Genomes Reveals Evidence for Horizontal Gene Transfer Despite a Preferred Intracellular Lifestyle." *Journal of Bacteriology* 191(11): 3569-3579.
- Weber, N. A. (1972). *Gardening Ants, the Attines*. Americal Phylosophical, Phyladelphia Society.
- Weiss, S., S. Maric, et al. (2011) Regional structure despite limited mtDNA sequence diversity found in the endangered Huchen, *Hucho hucho* (Linnaeus, 1758). *Hydrobiologia* 658(1): 103-110.
- Wetterer, J. K.; Schultz, T. R.; Meier, R. (1998). Phylogeny of fungus-growing ants (Tribe Attini) based on mtDNA sequence and morphology. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, San Diego, 9(1): 42-47.
- Wilson, E. O. & B. Holldobler (2005). *Eusociality: Origin and consequences*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(38): 13367-13371.
- Wilson, E. O. (1971) *The insects societies*. Belknap, Cambridge.

- Wirth, R., Herz, H., Ryel, R.J., Beyschlag, W., Hölldobler, B., (2003). *Herbivory of Leaf-Cutting Ants: A Case Study on Atta colombica in the Tropical Rainforest of Panama*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Xia, X., and Xie. Z., (2001). DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity* 92:371-373.
- Yoder A, Yang Z: (2000). Estimation of Primate Speciation Dates Using Local Molecular Clocks. *Molecular Biology and Evolution* 2000, 17:1081-1090.
- Zuckerkandl E, Pauling L (1962) Molecular disease, evolution and genic heterogeneity. In: Kasha M, Pullman B, editors. *Horizons in biochemistry*. New York: Academic Press. pp. 189–225.
- Zullo, S., Leang, C.S., Slighton, J.L., Hadler, H.I. and Eisenstadt, J.M. (1991) Mitochondrial D-loop sequence are integrated in the rat nuclear genome. *Journal of Molecular Biology*. 221: 1223–1235.
- Zwickl, D.J., (2006). *Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion*. The University of Texas at Austin.