

MAYKON PASSOS CRISTIANO

**HISTÓRIA EVOLUTIVA E FILOGEOGRAFIA DA FORMIGA
CORTADEIRA *Acromyrmex striatus* (Roger, 1863) (FORMICIDAE:
ATTINI)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

C933h
2013

Cristiano, Maykon Passos, 1984-
História evolutiva e filogeografia da formiga cortadeira
Acromyrmex striatus (Roger, 1863) (Formicidae: Attini) /
Maykon Passos Cristiano. – Viçosa, MG, 2013.
xv, 76 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Texto em português e inglês.

Orientador: Tânia Maria Fernandes Salomão

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Formiga. 2. Formiga-cortadeira. 3. Formiga - Evolução.
4. Evolução (Biologia). 5. *Acromyrmex striatus*. 6. Genética de
populações. 7. Genética molecular. 8. Filogenia.
9. Citogenética. 10. Biogeografia. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de
Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. II. Título.

CDD 22. ed. 595.796

MAYKON PASSOS CRISTIANO

**HISTÓRIA EVOLUTIVA E FILOGEOGRAFIA DA FORMIGA
CORTADEIRA *Acromyrmex striatus* (Roger, 1863) (FORMICIDAE:
ATTINI)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Aprovada: 30 de julho de 2013.

Marcos da Cunha Teixeira

José Eduardo Serrão

Jorge A. Dergam dos Santos

Lucio A. de Oliveira Campos
(Coorientador)

Tânia M. Fernandes Salomão
(Orientadora)

“What we know is a drop, what we don't know is an ocean”

Isaac Newton

Dedico à minha família

Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento (PPGGM) e a Universidade Federal de Viçosa (UFV) pela oportunidade e infraestrutura concedida para realização deste trabalho. Aos professores e secretários do PPGGM e da UFV, particularmente à professora Simone Facioni Guimarães que, durante sua estada na coordenação do PPGGM, nunca mediu esforços para me ajudar na realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa de doutorado nacional e doutorado sanduíche (CBB22003-11). À FAPEMIG também pelo financiamento do projeto “Estudo evolutivos com *Acromyrmex striatus*” (número do processo: CRA-APQ-00935-11) o qual possibilitou a realização deste estudo.

Gostaria de agradecer à minha orientadora professora Tânia Maria Fernandes Salomão por todo o seu suporte, encorajamento, amizade e confiança durante esses seis anos que permaneci aqui em Viçosa. Por estar disposta a me ajudar sempre de forma otimista em qualquer momento, mas, principalmente, nos mais difíceis. Por ser muito bem recebido por ela aqui na UFV, desde o primeiro contato.

Aos professores Alci Loeck, Dionísio Link e Stela Quirán pela ajuda em campo durante as coletas das amostras de *A. striatus*. À professora Terezinha Della Lucia que por seu intermédio, colocou-me em contato com esses professores. À Anayansi Valderrama, Hermogenes Fernandez e Jose Guillermo Sanchez pelo envio de amostras do Panamá. E a todos aqueles não nomeados que contribuíram enormemente durante os períodos de coleta. Muito obrigado!

À Anayansi Valderrama pela amizade, conversas e troca de experiências durante sua estada aqui no Brasil.

Ao professor Jorge Dergam, pela amizade, conselhos, conversas e momentos de descontração, e, que, sempre de bom humor, recebeu-me de modo receptivo em seu laboratório Beagle.

À professora Karla Yotoko, pela amizade, críticas, sugestões e conselhos nos meus trabalhos, ajudando a melhorá-los ainda mais.

A todos os meus amigos que a distância não separou, e de modo especial a Danon Cledes, Vivian Sandoval, Andreia Borges, Camila Arent e Lara Assis, pelos momentos felizes que compartilhamos. E a todos aqueles não nomeados que conheci em Viçosa durante todos estes anos, agradeço imensamente por ter compartilhando com todos momentos inestimáveis da minha vida.

Aos professores do Laboratório de Biologia Molecular de Insetos: Mara Tavares, Lucio Campos, Gustavo Martins e Denilce Lopes pela boa convivência, disponibilidade em ajudar no que era preciso, e por sempre estarem interessados nos trabalhos desenvolvidos no laboratório.

A banca examinadora professores José E. Serrão, Marcos C. Teixeira, Jorge A. Dergam e Lucio O. Campos pelas contribuições e sugestões que ajudaram a enriquecer este trabalho.

Throughout my PhD, I have also had the opportunity work with others collaborators in Regensburg/Germany, which was a great and wonderful experience for my professional and personal growth. I would like to thank Professor Jürgen Heinze for kindly hosting me in his chair and give me the change to exchange experiences with so many people. In special, thanks to PD Dr. Christoph Schubart and Nicole Rivera for their help during the phylogeographic analyses, contributions and comments in my works. I am most indebted to so many people from Biologie I, in special to Andreas Trindl, Tina Wanke, Doris Rothgänger and Sonja Dorfner.

I would like to express my sincere gratitude for all friends I have made in Regensburg that made my stay so pleasure: Mary Noske, Charlie Weber, Abel

Bernadou, Alexandra Schrempf, Ivana Silva, Marion Füßl, Alireza Keikhosravi, Antonia Klein, Nicolas Thiercelin, Jürgen Trettin (JT), Claudia Laurenzano, Sandra Theobald, Temin Deli, Nana Gratiashvili and Simon Rothgänger. I have enjoyed every minute that I have stayed with you. Vielen Dank!

A minha mãe, Fátima Maria dos Passos Cristiano, meu pai, Jairo Cristiano, e minha irmã, Débora Passos Cristiano, que estiveram incondicionalmente ao meu lado, apoiando-me em todas as escolhas que fiz na vida. A minha avó Maria F. dos Passos pelo apoio e por sempre se preocupar comigo.

Finalmente, a todos que de modo direto ou indireto possibilitaram a realização deste trabalho.

Sumário

Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas	xi
Resumo	xii
Abstract	xiv
Introdução Geral	1
Referências	6
Capítulo 1	9
Abstract.....	10
Introduction.....	10
Materials and Methods.....	11
<i>Sampling</i>	11
<i>Chromosome preparation, banding, and karyotype analysis</i>	11
<i>DNA extraction, PCR amplification, and sequencing</i>	11
<i>Sequence Alignment and phylogenetic analysis</i>	11
<i>Chromosome evolution analysis</i>	12
Results	12
<i>Karyotype characterization and analysis</i>	12
<i>Phylogenetic analysis</i>	12
<i>Inference of chromosome change</i>	12
Discussion	15
References	17
Acknowledgements.....	17
Supporting information	19
Capítulo 2	21
Resumo	22
Introdução.....	23
Material e métodos.....	25
<i>Coleta de amostras</i>	25
<i>Extração de DNA, amplificação e sequenciamento</i>	26
<i>Diversidade genética e estrutura da população</i>	27
<i>Demografia histórica e divergência</i>	28

<i>Modelagem da distribuição potencial atual e histórica</i>	29
Resultados	30
<i>Caracterização e diversidade das sequências</i>	30
<i>Relações filogenéticas e estrutura geográfica</i>	30
<i>Demografia histórica e datação molecular</i>	32
<i>Distribuição potencial atual e histórica</i>	32
Discussão.....	33
Referências	38
Tabelas	45
Figuras.....	51
Capítulo 3	57
Abstract.....	58
Introduction.....	58
Material and Methods.....	60
<i>DNA isolation, amplification and sequencing</i>	60
<i>DNA sequence analyses and comparisons</i>	61
Results	61
Discussion	63
Acknowledgements.....	65
References	65
Table.....	70
Figures.....	71
Conclusões Gerais	76

Lista de Figuras

Capítulo 1

Figure 1 – Conventional staining of mitotic cells of *Acromyrmex striatus*. (A) Diploid karyotype $2n = 22$ and (B) its metaphase. Scale bar = $5\mu\text{m}$12

Figure 2 – C-banding in the worker metaphase of *Acromyrmex striatus*. The dark-grey regions denote chromosome pairs containing obvious heterochromatin blocks. Scale bar = $5\mu\text{m}$ 13

Figure 3 – *Acromyrmex striatus* metaphase stained with fluorochromes: (A) CMA₃ and (B) DAPI. Positive GC-rich blocks were observed in five chromosome pairs (arrows), which matched the negative AT-rich regions in (B) indicated by arrows. Scale bar = $5\mu\text{m}$ 14

Figure 4 – Bayesian inference phylogenetic tree based on the concatenated sequences of four nuclear genes (WG, LW, EF1 α F1 and EF1 α F2). Sequences are identified by organism name. Numbers above the nodes indicate the posterior probabilities from the Bayesian analysis. Clades of leafcutter ants and fungus-growing ants are indicated by arrows. The clustered groups of *Acromyrmex* species, *Atta*, and *Acromyrmex striatus* are represented as red, blue, and green, respectively. The topology was rooted using three species in the Myrmicinae subfamily.....14

Figure 5 - Ancestral haploid chromosome state reconstruction inferred under Bayesian and Maximum Likelihood optimizations, with out-groups (other Attini and non-Attini) included and known chromosome states (tips). Pie charts at nodes represent the inferred chromosome number in both approaches and its Bayesian posterior probabilities15

Figure 6 – Summary of results in the present and previous studies. From the left to right: Phylogenetic relationship among *Acromyrmex striatus*, *Acromyrmex* spp. and *Atta* ssp. showing *A. striatus* as a sister group of the remainder leafcutter ants. Ideograms representing the haploid chromosome complement know for each cluster, *Atta* ssp. and *A. striatus* shared the haploid number of 11 chromosomes and the majority of metacentric chromosomes. Morphological characters (from description by Mayhé-Nunes [7]) shared among *A. striatus*, *Atta* spp. and *Acromyrmex* spp., three pairs of spines on promesonotum are beard by *A. striatus* and *Acromyrmex* spp, while *Atta* spp. display two pairs of spines, on the other hand *A. striatus* and *Atta* spp. display smooth gastral tergum whereas *Acromyrmex* spp. has a tuberculate gaster16

Capítulo 2

Figura 1 – Mapa da América do Sul com a distribuição geográfica das populações amostradas de *Acromyrmex striatus*. (a) Mapa do continente Sul Americano (b) população coletada na Argentina e (c) populações coletadas no Brasil. Cada local de coleta é representado por um ponto, e as cores dos pontos indicam cada população. Estas mesmas cores utilizadas para representar cada população, também foram empregadas na rede de haplótipos51

Figura 2 – Relação genealógica inferida para 58 haplótipos do gene mitocondrial COI de *Acromyrmex striatus* estimada por meio do algoritmo *median-joining*. As áreas são proporcionais à frequência dos haplótipos, o qual variou de 1 a 36. As cores representam cada população amostrada, e correspondem com as cores da Figura 1.

Números em vermelhos indicam os passos mutacionais entre haplótipos maiores que um. Os números dos haplótipos de *A. striatus* correspondem com os representados na Tabela 1. É possível visualizar cinco haplogrupos. Os pequenos círculos brancos representam os haplótipos perdidos ou não amostrados.....52

Figura 3 – Distribuição geográfica e relação genealógica de *Acromyrmex striatus*. A rede de haplótipos (Figura 2) do gene mitocondrial COI de *A. striatus* está sobreposta no mapa (Figura 1) aproximadamente nos pontos de amostragem.....53

Figura 4 – Análise espacial da variância molecular (SAMOVA) das 13 populações de *Acromyrmex striatus*. Os índices de fixação foram calculados independentemente para cada grupo *K*. O maior e significativo valor do índice de fixação *F_{ct}* para um dado valor de *K* reporta o melhor agrupamento das populações de *A. striatus*.....54

Figura 5 – *Mismatch distributions* para a população MOST de *Acromyrmex striatus*. Os histogramas representam as frequências observadas das diferenças par-a-par entre os haplótipos e as linhas representam a curva simulada para a população MOST sob o modelo de expansão demográfica (linha contínua) e expansão espacial (linha tracejada)55

Figura 6 – Distribuição geográfica para áreas preditas climaticamente para a ocorrência de *Acromyrmex striatus* utilizando variáveis bioclimáticas atuais e do passado. (a) Distribuição potencial nas condições atuais, (b) LIG 130K: última interglaciação (130 mil anos antes do presente), (c) MIROC 21k e (d) CCSM 21k: último máximo glacial (21 mil anos antes do presente). As cores quentes (vermelho/amarelo) representam áreas com alta probabilidade de ocorrência de *A. striatus*56

Capítulo 3

Figure 1 – Representation of the primers position for partial amplification of the cytochrome B gene (*cytb*). The arrows illustrate the direction of amplification of each primer. The detail is shown in the sequence of the tRNA^{Ser} based on the *Solenopsis invicta* genome (blue sequence), the original sequence primer (TS1-N-11683) and two adenines (red letters) modified from the primer (Modified).....71

Figure 2 – Chromatograms resulting from sequencing using the primer CB-J-10933 (above) and TS1-N-11683-modified (below) from *Acromyrmex striatus* (Genbank access). The primer TS1-N-11683-modified was visualized in reverse complement. The arrows show a double peak in the two primers used for sequencing these fragments, revealing co-amplification72

Figure 3 – Sequence alignments for 642 base pairs of *Acromyrmex striatus numts* and the *cytb* gene from other ants species. The alignment is based on the *cytb* gene of *Solenopsis invicta* (NC014672), and the numbers correspond to the position of this nucleotide sequence. Dots indicate no change in the nucleotide compared with the *cytb* of *S. invicta*. The sequences that encoded premature stop codons in the *numts* sequences are highlighted in yellow and deletion of part of the sequences is highlighted in blue. The *cytb* gene showed an insertion of two codons (six nucleotides) in the *Atta* species and one codon (three nucleotides) in *A. balzani*, which are in bold at position 904. The dash represents a gap73

Lista de Tabelas

Capítulo 1

- Table 1** – Morphological analyses of the chromosomes of *Acromyrmex striatus*.....13
- Table S1** – Ant species used in this study for constructing the molecular phylogeny and their accession numbers in GenBank.....19
- Table S2** – Models of evolution estimated for each gene and codon position with MrModeltest v3.7. The models listed below were employed for each data partition in a Bayesian analysis (see Material and Methods)20
- Table S3** – AIC scores and Maximum Likelihood (ML) estimates for the data set analyzed for each model implemented by ChromEvol software.....20

Capítulo 2

- Tabela 1** – Espécimes de *Acromyrmex striatus* amostradas para a análise filogeográfica. Locais de amostragens, coordenadas geográficas (S = Sul, W = Oeste), número de indivíduos e haplótipos estimados a partir do gene COI seguido do número de indivíduos (n). Amostras coletadas nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina estão apresentados por RS e SC, respectivamente.....45
- Tabela 2** – Diversidade genética e testes de neutralidade para cada população de *Acromyrmex striatus*. Os valores significativos são apresentados em negrito46
- Tabela 3** – Modelos de estruturação genética. Os índices de fixação foram testados ao nível de 10.000 permutações. As populações estão agrupadas de acordo com o resultado obtido a partir da SAMOVA. As populações pertencentes a cada grupo estão representadas dentro de cada colchete47
- Tabela 4** – Análise de variância molecular (AMOVA) para a espécie *Acromyrmex striatus*, realizada com três níveis hierárquicos, considerando os grupos formados pela SAMOVA48
- Tabela 5** – Valores de F_{st} das comparações par a par entre as populações de *Acromyrmex striatus*, estimados a partir do gene mitocondrial COI. Os valores apresentados em negrito são significativos ($p < 0,05$)49
- Tabela 6** – Estimativas em milhões de anos do tempo de divergência do ancestral comum mais recente entre os haplogrupos de *Acromyrmex striatus*. As estimativas foram baseadas sobre uma taxa de mutação para o gene mitocondrial COI de formiga (0,01455 pb por milhões de anos)50

Capítulo 3

- Table 1** – Sampling sites, species, coordinates and Genbank access numbers of the *numts* and *cytb* gene sequences70

Resumo

CRISTIANO, Maykon Passos. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2013. **História evolutiva e filogeografia da formiga cortadeira *Acromyrmex striatus* (Roger, 1863) (Formicidae: Attini)**. Orientadora: Tânia Maria Fernandes Salomão. Coorientadores: Mara Garcia Tavares e Lucio Antonio de Oliveira Campos.

A espécie *Acromyrmex striatus* (Roger, 1863) é uma formiga cortadeira polimórfica que ocorre em ambientes abertos e de clima seco no sul da América do Sul, sendo facilmente distinguida dentro do gênero. A sua área de distribuição abrange os Pampas, a costa sul brasileira, nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, parte do Chaco na Argentina e extremo sul do Paraguai. Com o objetivo de entender a relação filogenética de *A. striatus* com as demais espécies de formigas cortadeiras, foram conduzidas diferentes abordagens de análise que integraram morfologia, citogenética e biologia molecular (Capítulo 1). A relação filogenética entre *A. striatus* e as demais formigas cortadeiras foi estimada a partir de quatro genes nucleares. *A. striatus* formou um clado diferente e separado das demais formigas do mesmo gênero. O número cromossômico também diferiu entre *A. striatus* ($2n = 22$) e as demais espécies do gênero *Acromyrmex* ($2n = 36-38$). Os resultados sugerem que *A. striatus* é uma espécie singular dentro do grupo de formigas cortadeiras, e que possivelmente foi uma das primeiras espécies a divergir do ancestral comum mais recente dentro do grupo. Para inferir as relações genealógicas entre as populações de *A. striatus*, uma abordagem filogeográfica foi realizada baseada no gene mitocondrial citocromo oxidase I (COI) (Capítulo 2). Um total de 128 colônias foram amostradas em 38 localidades no Brasil e Argentina. O gene mitocondrial COI foi sequenciado e as relações genealógicas foram inferidas por meio do algoritmo *median-joining*. Foi estimada também a área potencial de distribuição atual e a área potencial histórica, utilizando modelos paleoclimáticos disponíveis para uma melhor avaliação da história demográfica de *A. striatus*. Foi sugerido, a partir da análise dos padrões biogeográficos e modelagens climáticas, que a demografia histórica de *A. striatus* se manteve constante ao longo de sua história evolutiva, e que o padrão filogeográfico encontrado possivelmente se deve ao

isolamento por distância entre os grupos de populações. Durante a seleção de marcadores mitocondriais para o desenvolvimento dos estudos filogenéticos, foi amplificado pseudogenes mitocondriais do gene citocromo b (*cytb*), e assim, o objetivo do capítulo 3 foi reportar e caracterizar a presença destes pseudogenes em *A. striatus*. Utilizando primers universais para a amplificação do gene *cytb*, sequências de *A. striatus* e outras de formigas cortadeiras foram obtidas e comparadas com sequências do gene *cytb* de outras duas formigas obtidas no GenBank. Este é o primeiro registro da ocorrência de pseudogenes no gênero *Acromyrmex*.

Abstract

CRISTIANO, Maykon Passos. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2013. **Evolutionary history and phylogeography of the leafcutter ant *Acromyrmex striatus* (Roger, 1863) (Formicidae: Attini)**. Advisor: Tânia Maria Fernandes Salomão. Co-advisors: Mara Garcia Tavares and Lucio Antonio de Oliveira Campos.

The species *Acromyrmex striatus* (Roger, 1863) is a polymorphic leafcutter ant that occurs in open and dry environments of southern South America, and it is easily distinguished within the *Acromyrmex* genus. Its distribution range includes the Pampas, the southern Brazilian coast of Santa Catarina and Rio Grande do Sul States, part of Chaco in Argentina and southern Paraguay. In order to understand the phylogenetic position of *A. striatus* in relationship to other leafcutter ants we carried out one study integrating different approaches that includes morphology, cytogenetics and molecular biology (Chapter 1). The phylogenetic relationship of *A. striatus* and remainder leafcutter ants analyzed was estimated by mean of four nuclear genes. *A. striatus* fell into a distinct clade that is sister group from the other leafcutter ants. The diploid chromosome number of *A. striatus* was 22 and is different from those known to other *Acromyrmex* species ($2n = 36-38$). These results suggest that *A. striatus* is a particular species within the leafcutter ants group, and likely was the first species to diverge from the most recent common ancestor. To infer the genealogical relationship among population of *A. striatus*, we used a phylogeography approach based on the mitochondrial gene cytochrome oxidase I (COI) (Chapter 2). A total of 128 colonies were sampled across 38 localities in Brazil and Argentina. The mitochondrial gene COI was sequenced and the genealogical relationship were estimated by mean median-joining algorithm. We also carried out the modeling of the potential distribution of *A. striatus* under current and past climatic data. Our results indicate that *A. striatus* may have experienced a demographic stability throughout the evolutionary time, and the phylogeographic pattern observed seems to be a result of isolation by distance among population groups. During our screening for a mitochondrial DNA marker for using in the phylogenetic and phylogeographic studies, we amplified a nuclear copy of mitochondrial gene cytochrome b (*cytb*), thus the aim of Chapter 3 was to report and

characterize these pseudogenes in *A. striatus*. Using universal primers to amplify the gene *cytb* we obtained sequences of *A. striatus* and other leafcutter ants that was compared with *cytb* gene of other two ant species from GenBank. This is the first report of occurrence of pseudogenes in the *Acromyrmex* genus.

Introdução Geral

Os genes influenciam todos os processos biológicos e cada característica fenotípica exibida por um organismo teve alguma base na sua composição genética. Além disso, a variação fenotípica dentro e entre espécies são originadas das diferenças genéticas entre indivíduos e populações. Conseqüentemente, uma completa avaliação ao nível molecular é fundamental para o entendimento da diversidade da vida e os mecanismos básicos do sucesso das entidades biológicas (Goodisman et al., 2008).

Os padrões de biodiversidade atual são resultado tanto de eventos históricos quanto contemporâneos. Identificar os processos que permitiram a diversificação e expansão das espécies em diferentes habitats e ecossistemas é fundamental para o entendimento da evolução biológica. Tem-se observado que o padrão de distribuição das espécies não ocorre de maneira estocástica, e que estas apresentam algum grau de estruturação que pode ser analisado em um contexto geográfico e cronológico (Beheregaray, 2008). Uma vez que a constituição genética das espécies atuais é parcialmente o resultado de processos demográficos históricos, o uso de marcadores moleculares para caracterizar indivíduos, populações e espécies podem ser utilizados para quantificar a diversidade e reconstruir padrões de dispersão histórica (Freeland et al., 2011). Este é o principal objetivo da filogeografia, que busca identificar e compreender os princípios e processos que governam a distribuição geográfica de linhagens genealógicas, principalmente dentro e entre espécies proximamente relacionadas (Avice, 2000). É possível comparar as relações evolutivas destas linhagens genealógicas com suas localizações geográficas e conseqüentemente inferir sobre os fatores que influenciaram a distribuição da variação genética observada (Freeland et al., 2011). Entre estes fatores pode-se destacar a deriva genética, migração, fragmentação e demografia histórica.

As formigas representam um importante grupo de insetos para investigar a relação entre as linhagens genealógicas e os padrões de distribuição das espécies. Este fato se deve à ocorrência onipresente destes organismos nos diferentes habitats dos mais diversos ecossistemas. Este grupo de insetos é um dos mais notáveis devido a sua complexidade social e diversidade. Atualmente, existem

aproximadamente 12.500 espécies de formigas descritas (Bolton et al., 2006). As formigas compreendem um grupo monofilético composto de 21 subfamílias, e mais 4 subfamílias extintas, reunidas em um grupo natural denominado Formicidae (Bolton, 2003; Ward, 2009). Recentes filogenias inferidas por meio de caracteres moleculares suportam a monofilia deste grupo (Brady et al., 2006; Moreau et al., 2006; Ward, 2007).

Dentre os Formicidae, Attini se destaca pela evolução de um comportamento complexo que surgiu apenas quatro vezes na história evolutiva, que foi a agricultura (Mueller et al., 2005). As espécies dessa tribo desenvolveram uma intrínseca relação de mutualismo formiga-fungo. As espécies de Attini obrigatoriamente dependem do cultivo do fungo simbiótico como fonte de alimentação, e em retorno, elas fornecem ao fungo, proteção contra patógenos e competidores, e ainda ajudam na sua dispersão (Hölldobler & Wilson, 1990). Attini pertence aos Myrmecinae e ocorre exclusivamente nas Américas, alcançando maior diversidade na região neotropical (Kempf, 1972). Com base em dados moleculares, esta tribo foi dividida em cinco sistemas de agricultura que são fortemente relacionados com o padrão filogenético das linhagens dos fungos e dos seus patógenos: agricultura inferior (*lower agriculture*), agricultura de fungo-coral (*coral-fungus agriculture*), agricultura de levedura (*yeast agriculture*), agricultura superior generalizada (*generalized higher agriculture*) e agricultura de cortadeiras de folhas (*leafcutter agriculture*) (Schultz & Brady, 2008; Mehdiabadi & Schultz, 2010).

As conspícuas espécies de formigas cortadeiras de folhas dos gêneros *Acromyrmex* e *Atta* são os herbívoros dominantes da região Neotropical (Mikheyev et al., 2008). Estas formigas estão organizadas em colônias contendo de milhares a milhões de operárias que cortam grandes quantidades de folhas para a manutenção do cultivo do fungo e, por isso, podem causar sérios danos econômicos na agricultura e no reflorestamento. Além do corte de material vegetal fresco, as operárias forrageiam outros substratos que são trazidos para o ninho, e estes podem variar desde fezes a carcaças de artrópodes (Lopes, 2005).

As formigas do gênero *Acromyrmex* ocorrem desde os Estados Unidos, na latitude 40°N, até a Argentina, na latitude 44°S (Weber, 1972), incluindo toda a América tropical e subtropical, com exceção apenas do Chile. Segundo Weber (1972), a ausência de formigas cortadeiras no Chile deve-se à incapacidade destes

organismos em cruzar o deserto do Atacama ao norte e os Andes ao sul. A distribuição geográfica e a frequência de espécies da tribo Attini estão ligadas a fatores como condições ambientais, vegetação, tipo de solo e índices pluviométricos.

Divergentes hipóteses foram propostas para a origem das formigas cortadeiras. Com base nos hábitos de nidificação destas espécies, Kusnezov (1963) sugere que o centro de diversificação deve ter sido os ambientes áridos da América do Sul, ao invés dos vales periodicamente inundados da bacia amazônica. Do mesmo modo, Fowler (1983) propôs que este grupo de formigas deve ter se originado e diversificado em terras baixas de vegetação aberta da América do Sul. Entretanto, outros estudos têm sugerido que a origem e diversificação do ancestral comum das formigas cortadeiras possivelmente ocorreu em ambientes úmidos de terras baixas na bacia amazônica (Weber, 1972; Mayhé-Nunes & Jaffé, 1998). Assim, estudos moleculares incluindo espécies adaptadas a ambientes secos, restritos a região subtropical da América do Sul, podem contribuir para elucidar a origem deste grupo de formigas.

Acromyrmex striatus (Roger, 1863) é uma espécie de formiga cortadeira polimórfica que ocorre em ambientes abertos e de clima seco no sul da América do Sul, sendo facilmente distinguida dentro do gênero (Lopes, 2005). Esta espécie é caracterizada por possuir operárias de cor castanha avermelhada ou ferruginosa, medindo 6,5 mm de comprimento, com gáster mais escura do que o resto do corpo, lisa, brilhante e inteiramente sem tubérculos (Gonçalves, 1961). Sua distribuição é conhecida para a Argentina, Uruguai, Brasil e Paraguai (Delabie et al., 2011). No Brasil, *A. striatus* é restrita aos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. No entanto, não há nenhum levantamento de ocorrência recente sobre a distribuição geográfica da espécie. *A. striatus* é uma espécie comum nos campos e terrenos cultivados e seu ninho é característico, pois as operárias limpam a superfície do solo sobre as câmaras de cultivo do fungo, removendo toda a vegetação e matéria vegetal morta como se o local tivesse sido capinado e varrido (Gonçalves, 1961).

Diehl-Fleig & Araújo (1996) estudaram *A. striatus* em laboratório para determinar se a fundação da colônia é um processo solitário ou mutualístico, e os resultados sugerem que o estabelecimento da nova colônia pode ser por haplometrose ou pleometrose dependendo, possivelmente, da densidade e distância

física entre as fundadoras. Adicionalmente, Diehl-Fleig & Rocha (1998) conduziram estudos visando determinar se as fêmeas recém-fecundadas de *A. striatus* selecionam o tipo de solo para o estabelecimento do ninho. Os resultados deste trabalho mostraram que as fêmeas de *A. striatus* são seletivas, e preferem solos arenosos e argilosos, pobres em matéria orgânica.

Com o objetivo de compreender a estrutura social e a variabilidade genética das colônias de *A. striatus*, Diehl et al. (2001; 2002) avaliaram a diversidade genética de populações dessa formiga por meio de marcadores isoenzimáticos. Os resultados destes trabalhos sugerem que as colônias de *A. striatus* possuem uma estrutura social variável colônia-específica. Foram identificadas tanto colônias monogínicas quanto poligínicas associadas à poliandria ou não. Além disso, foi relatado um alto polimorfismo entre algumas colônias, embora a endogamia tenha sido alta. No entanto, marcadores isoenzimáticos são menos informativos quando comparados a outros marcadores moleculares. Assim, estudos utilizando outros tipos de marcadores moleculares podem contribuir para o conhecimento mais detalhado da diversidade genética desta espécie.

É conhecido que as mudanças climáticas históricas influenciaram fortemente os padrões de distribuição geográfica e diversidade genética de espécies em geral (Hewitt, 2000, 2004), e o uso de marcadores moleculares tem contribuído para entender as consequências ecológicas e evolutivas destas mudanças. Enquanto marcadores nucleares tem sido úteis no estudo das relações filogenéticas interespecífica, o DNA mitocondrial (mtDNA) são úteis no estudo das relações filogenéticas intraespecífica. O mtDNA é amplamente utilizado em muitas espécies de animais devido ao seu padrão de herança uniparental, cópia única, rápida taxa de substituição nucleotídica comparada com marcadores nucleares e ausência de íntrons (Galtier et al., 2009). Apesar da grande vantagem da utilização do mtDNA sobre outros tipo de marcadores, um crescente número de estudos tem mostrado que as premissas acerca deste marcador são violadas pelo risco de coamplificação quando da presença de cópias nucleares de segmentos do mtDNA. Estes segmentos são conhecidos como *numts* ou pseudogenes nucleares de origem mitocondrial (Lopez et al., 1994). A presença despercebida dos *numts* no conjunto de dados de sequências infringe o princípio fundamental da ortologia das sequências em estudos filogenéticos. Oportunamente, vários métodos foram propostos para a identificação

e eliminação dos *numts* do conjunto de dados antes de sua análise. No entanto, é importante que os *numts*, quando identificados, sejam reportados com o intuito de alertar futuras investigações.

O objetivo do presente estudo foi investigar as relações filogenéticas interespecíficas e intraespecíficas da formiga cortadeira *A. striatus* e analisar sua história evolutiva com o intuito de contribuir para um melhor entendimento dos processos envolvidos na distribuição e diversificação de espécies em ambientes abertos subtropicais. No primeiro capítulo da presente tese, foi realizada uma análise filogenética de *A. striatus* em relação a outras espécies de formigas cortadeiras, utilizando diferentes abordagens de análise que integraram morfologia, citogenética e biologia molecular. No segundo capítulo, foi estimada a diversidade genética intraespecífica e uma hipótese biogeográfica foi proposta com base nas linhagens genealógicas do gene citocromo oxidase I (COI) de *A. striatus*. Para isso, utilizou-se uma abordagem de relógio molecular e modelos potenciais de distribuição histórica e contemporânea das populações de *A. striatus* coletadas nas planícies de terras baixas do sul da América do Sul. No terceiro capítulo, foi reportado pela primeira vez a presença de *numts* do gene citocromo b (*cytb*) em *Acromyrmex*. Pseudogenes observados em *A. striatus* foram caracterizados por meio da comparação das sequências de DNA obtidas com sequências do genoma mitocondrial de outras espécies de formigas. Em conjunto, os dados obtidos no presente estudo, certamente contribuirão para uma maior compreensão dos princípios da história evolutiva deste grupo de formigas.

Referências

- Avice J.C., 2000. Phylogeography: the history and formation of species. Harvard University Press, Massachusetts, Cambridge.
- Beheregaray L.B., 2008. Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Molecular Ecology*. 17, 3754–3774.
- Bolton B., Alpert G., Ward P.S., Naskrecki P., 2006. Bolton's catalogue of ants of the world 1758-2005. Harvard University Press, Cambridge, MA.3
- Bolton B., 2003. Synopsis and classification of Formicidae. *Memoirs of the American Entomological Institute*. 71, 1–370.
- Brady S.G., Schultz T.R., Fisher B.L., Ward P.S., 2006. Evaluating alternative hypotheses for the early evolution and diversification of ants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103, 18172–18177.
- Delabie J.H., Alves H., Reuss-Strenzel G., Carmo A., Nascimento I., 2011. Distribuição das formigas cortadeiras dos gêneros *Acromyrmex* e *Atta* no Novo Mundo. in: Della-Lucia, T.(Eds.), *Formigas cortadeiras: da bioecologia ao manejo*, Editora Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, pp. 80–101.
- Diehl E., De Araújo A.M., Cavalli-Molina S., 2001. Genetic variability and social structure of colonies in *Acromyrmex beyeri* and *A. striatus* (Hymenoptera: Formicidae). *Brazilian Journal of Biology. Revista brasileira de biologia*. 61, 667–678.
- Diehl E., Cavalli-Molina S., Araújo A.M. de, 2002. Isoenzyme variation in the leaf-cutting ants *Acromyrmex beyeri* and *Acromyrmex striatus* (Hymenoptera, formicidae) . *Genetics and Molecular Biology*. 25, 173–178.
- Diehl-Fleig E., Araújo A.M., 1996. Haplometrosis and pleometrosis in the ant *Acromyrmex striatus* (Hymenoptera: Formicidae). *Insectes Sociaux*. 43, 47–51.
- Diehl-Fleig E., Rocha E.S. da, 1998. Escolha de solo por fêmeas de *Acromyrmex striatus* (Roger) (Hymenoptera: Formicidae) para construção do ninho. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*. 27, 41–45.
- Fowler H.G., 1983. Latitudinal gradients and diversity of the leaf-cutting ants (*Atta* and *Acromyrmex*) (Hymenoptera: Formicidae). *Revista de Biología Tropical*. 31, 213-216.
- Freeland J.R., Kirk H., Petersen S., 2011. *Molecular ecology*. Wiley-Blackwell,
- Galtier N., Nabholz B., Glémin S., Hurst G.D.D., 2009. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology*. 18, 4541–4550.

- Gonçalves C.R., 1961. O gênero *Acromyrmex* no Brasil (Hym. Formicidae). *Studia Entomologica*. 4, 113–180.
- Goodisman M.A.D., Kovacs J.L., Hunt B.G., 2008. Functional genetics and genomics in ants (Hymenoptera: Formicidae): The interplay of genes and social life. *Myrmecological News*. 11, 107–117.
- Hewitt G., 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*. 405, 907–913.
- Hewitt G.M., 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. 359, 183–195.
- Hölldobler B., Wilson E.O., 1990. *The ants*. Harvard University Press, Cambridge.
- Kempf W.W., 1972. Catalogo abreviado das formigas da região neotropical (Hymenoptera, Formicidae). *Studia Entomologica*. 15, 3–344.
- Kusnezov N., 1963. Zoogeografia de las hormigas en sudamerica. *Acta zoológica Lilloana*. XIX, 25–186.
- Lopes B.C., 2005. Recursos vegetais usados por *Acromyrmex striatus* (Roger) (Hymenoptera, Formicidae) em restinga da Praia da Joaquina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*. 22, 372–382.
- Lopez J. V., Yuhki N., Masuda R., Modi W., O'Brien S.J., 1994. Numt, a recent transfer and tandem amplification of mitochondrial DNA to the nuclear genome of the domestic cat. *Journal of Molecular Evolution*. 39, 174–190.
- Mayhé-Nunes A., Jaffé K., 1998. On the biogeography of Attini (Hymenoptera: Formicidae). *Ecoytopicos*. 11, 45–54.
- Mehdiabadi N.J., Schultz T.R., 2010. Natural history and phylogeny of the fungus-farming ants (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae: Attini). *Myrmecological News*. 13, 37–55.
- Mikheyev A.S., Vo T., Mueller U.G., 2008. Phylogeography of post-Pleistocene population expansion in a fungus-gardening ant and its microbial mutualists. *Molecular Ecology*. 17, 4480–4488.
- Moreau C.S., Bell C.D., Vila R., Archibald S.B., Pierce N.E., 2006. Phylogeny of the ants: diversification in the age of angiosperms. *Science*. 312, 101–104.
- Mueller U.G., Gerardo N.M., Aanen D.K., Six D.L., Schultz T.R., 2005. The Evolution of agriculture in insects. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 36, 563–595.
- Schultz T.R., Brady S.G., 2008. Major evolutionary transitions in ant agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105, 5435–5440.

Ward P.S., 2007. Phylogeny, classification, and species-level taxonomy of ants (Hymenoptera: Formicidae). *Zootaxa*. 1668, 549–563.

Ward P.S., 2009. Taxonomy, phylogenetics, and evolution. in: Lach L., Parr C., Abbot K.(Eds.), *Ant ecology*, Oxford Scholarship, Oxford.

Weber N.A., 1972. *Gardening ants: the Attines*. American Philosophical Society.

Capítulo 1



Artigo publicado no periódico Plos One, em 20/03/2013.

Cytogenetic and Molecular Analyses Reveal a Divergence between *Acromyrmex striatus* (Roger, 1863) and Other Congeneric Species: Taxonomic Implications

Maykon Passos Cristiano*, Danon Clemes Cardoso, Tânia Maria Fernandes-Salomão

Laboratório de Biologia Molecular de Insetos, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa – UFV, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

Abstract

The leafcutter ants, which consist of *Acromyrmex* and *Atta* genera, are restricted to the New World and they are considered the main herbivores in the neotropics. Cytogenetic studies of leafcutter ants are available for five species of *Atta* and 14 species of *Acromyrmex*, both including subspecies. These two ant genera have a constant karyotype with a diploid number of 22 and 38 chromosomes, respectively. The most distinct *Acromyrmex* species from Brazil is *A. striatus*, which is restricted to the southern states of Santa Catarina and Rio Grande do Sul. Several cytogenetic and phylogenetic studies have been conducted with ants, but the karyotypic characterization and phylogenetic position of this species relative to leafcutter ants remains unknown. In this study, we report a diploid number of 22 chromosomes for *A. striatus*. The phylogenetic relationship between *A. striatus* and other leafcutter ants was estimated based on the four nuclear genes. *A. striatus* shared the same chromosome number as *Atta* species and the majority of metacentric chromosomes. Nuclear data generated a phylogenetic tree with a well-supported cluster, where *A. striatus* formed a different clade from other *Acromyrmex* spp. This combination of cytogenetic and molecular approaches provided interesting insights into the phylogenetic position of *A. striatus* among the leafcutter ants and the tribe Attini.

Citation: Cristiano MP, Cardoso DC, Fernandes-Salomão TM (2013) Cytogenetic and Molecular Analyses Reveal a Divergence between *Acromyrmex striatus* (Roger, 1863) and Other Congeneric Species: Taxonomic Implications. PLoS ONE 8(3): e59784. doi:10.1371/journal.pone.0059784

Editor: Ben J. Mans, Onderstepoort Veterinary Institute, South Africa

Received: November 6, 2012; **Accepted:** February 18, 2013; **Published:** March 20, 2013

Copyright: © 2013 Cristiano et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This research forms part of the DSc thesis of the first author, who was supported by a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) studentship. Additional financial support was provided by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and FAPEMIG (Process numbers: CRA-APQ-00935-11). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: maykoncristiano@hotmail.com

Introduction

Leafcutter ants from the genera *Acromyrmex* and *Atta* (Tribe Attini) are an ecologically conspicuous group in the New World tropics where they cut pieces from living plants to culture their symbiotic fungus [1], [2]. As all ants in the tribe Attini, leafcutter ants are engaged in a symbiosis with their fungal cultivars, which serve as food sources [3]. However, the leafcutter ants do not need to culture their fungi from external sources because *Acromyrmex* and *Atta* species possess domesticated symbiotic fungi, which appear to be incapable of living outside their associations with ants [4].

According to Bolton et al. [5], *Acromyrmex* comprises 30 species currently recognized. *Acromyrmex* is the largest genus of leafcutter ants and it has traditionally been divided into two subgenera, *Moellerius* and *Acromyrmex*, based on morphological traits [6]. The subgenera *Moellerius* has short and slightly distally curved mandibles in the lateral view and an absence of supra-ocular spines, which are present in the subgenera *Acromyrmex*. *Acromyrmex striatus* belongs to the subgenera *Moellerius* and it is reported to be a distinct member of the *Acromyrmex* genus [7], [8], which is distributed in Argentina, Uruguay, Paraguay, and Southern Brazil (Santa Catarina and Rio Grande do Sul States) [9]. Unlike other congeneric species, *A. striatus* does not possess tubers on its gaster or supra-ocular spines [7]. Previous studies based on molecular genetic markers (RAPD: random amplified polymorphic DNA;

and AFLP: amplified fragment length polymorphisms) [8] and morphological features [7] have analyzed the phylogenetic relationships between *A. striatus* and other species of the genus. These studies suggest that *A. striatus* is the most divergent member of the genus and it is phylogenetically closer to *Atta* spp. However, previous phylogenetic studies of leafcutter ants have not considered *A. striatus* in their analysis [4], [10] and the phylogenetic position of *A. striatus* remains unknown.

Chromosome number and structure, including their size and shape, are important aspects of genomic organization because chromosomal variation may lead to species divergence [11]. Chromosome number is also a useful trait in systematic and evolutionary analyses because each organism generally has a different set of chromosomes, while closely related species tend to have more similar karyotypes than more distantly related ones [12]. Ants have a remarkable diversity in their chromosome number ranging from $2n = 2$ to $2n = 120$ in *Myrmecia croslandi* and *Dinoponera lucida*, respectively (reviewed in Lorite & Palomeque [13]). Information on Formicidae karyotypes has been accumulating gradually and about 750 ant species have been analyzed [13]. However, the available cytogenetic information on leafcutter ants is confined to five species of *Atta* and 14 species of *Acromyrmex*, both including subspecies [14–18]. The majority of these studies simply report the chromosome number and the karyotype morphology, and all report a chromosomal complement of

$2n = 22$ for *Atta* species and $2n = 38$ for *Acromyrmex* species. The only known exception is *A. ameliae* with $2n = 36$ chromosomes [18–20]. Thus, *Atta* and *Acromyrmex* are considered to have a constant chromosome number and a homogeneous karyotype [15], [19], [20].

Given the morphological dissimilarity between *A. striatus* and other *Acromyrmex* species, the major aims of this study were the cytogenetic characterization of *A. striatus* and an evaluation of the phylogenetic relationships among *A. striatus* and other leafcutter ants, based on the DNA sequences of four nuclear genes. Recently, a method was developed and has been applied successfully in plants to infer of chromosome number evolution [21]. By means of formulated probabilistic models using either Maximum Likelihood (ML) or Bayesian methods, this approach infers the evolution of chromosome number from root to tips in a phylogenetic tree, taking possible duplication events into account. Thus, we used the chromosome evolution models developed by Mayrose et al. [21] in order to infer the direction of chromosomal changes (e.g. fusion or fission towards the results in the *A. striatus* chromosome number) and to test possible duplication events in the genus *Acromyrmex*.

Materials and Methods

Sampling

The biological material used for chromosome preparations of *A. striatus* was obtained from 11 colonies collected from the beaches of Southern Santa Catarina State, Brazil. Workers belonging to ten leafcutter ant species were collected from distinct sampling sites and stored in absolute ethanol, before DNA extraction and phylogenetic analysis. *A. striatus* was collected from five localities in Brazil, i.e., Araranguá-SC (28°57'11.3''S, 49°22'29.6''W), Florianópolis-SC (27°29'02.0''S, 48°23'10.3''W), Curumin-RS (29°37'18.2''S, 49°55'59.5''W), Pedro Osório (32°01'05.2''S, 52°49'46.1''W) and Unistalda-RS (29°02'22.6''S, 55°12'49.6''W), and one locality in Argentina, i.e., Santa Rosa (36°37'07.1''S, 64°19'42.8''W) (kindly provided by Dr. Stela Quirán). The other 11 specimens were collected from Brazil and Panama, as follows: *A. ambiguus* from Araranguá-SC (29°02'29.8''S, 49°27'59.6''W) and Pontal do Paraná-PR (25°36'35.0''S, 48°24'01.0''W); *A. balzani* from Araranguá-SC (29°00'54.2''S, 49°26'24.6''W) and Viçosa-MG (20°45'14.0''S, 42°52'55.0''W); *A. heyeri* from Caçapava do Sul-RS (30°36'44.0''S, 53°21'37.7''W); *A. bisphaerica* and *A. sexdens rufopilosa* from Viçosa-MG (20°45'14.0''S, 42°52'55.0''W); *A. sexdens piriiventris* from Novo Cabrais-RS (29°45'34.0''S, 52°57'32.9''W); *A. robusta* from São Francisco de Itabapoana-RJ (21°27'00.0''S, 41°02'01.0''W); *A. colombica* and *A. echinator* from Gamboa – Panama (kindly provided by Dr. Anayansi Valderama). All specimens were identified to the species level and some voucher specimens were deposited at Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP). All species' collections were authorized by the Brazilian Environment Institute (IBAMA) by means of a special permit (number 26441-1) recorded by SISBio. Collecting permit was issued to Danon Cleme Cardoso in Brazil.

Chromosome Preparation, Banding, and Karyotype Analysis

In order to obtain mitotic metaphase samples for cytogenetic analysis, we carefully excised cerebral ganglia from post-defecant larvae in hypotonic colchicine solution and transferred a drop of solution in the dark [22]. We analyzed at least five individuals per colony and we observed 10–12 metaphases per slide for each individual worker. No male brood were present in the colonies

analyzed. Conventional Giemsa staining was used to determine the chromosome number and morphology.

C-band stained was used to determine the distribution pattern of heterochromatin, as described by Sumner [23] with modifications proposed by Pompolo & Takahashi [24]. Sequential staining with fluorochromes was performed using 4'-6-diamidin-2-phenylindole (DAPI) and chromomycin A₃ (CMA₃) [25]. The slides were visualized using an Olympus BX 60 microscope and images of the best metaphases were captured with a digital camera using the Q capture® program. The chromosomal morphology was determined based on the arm ratio [26] where chromosomes were classified as metacentric (M), submetacentric (SM), subtelocentric (ST), or acrocentric (A). We measured 12 spread metaphases with chromosomal integrity, evident centromeres, and without overlapping during the morphometric karyotype analyses. The following features of chromosomes were evaluated: total length (TL), long arm length (L), short arm length (S), arm ratio between the long and short arms ($r = L/S$), relative chromosome length (RL) of each chromosome ($TL \times 100 / \sum TL$) and asymmetric index ($\sum \text{long arms} / \sum \text{total length} \times 100$).

DNA Extraction, PCR Amplification, and Sequencing

We extracted genomic DNA from one worker per colony for the six colonies of *A. striatus*, two colonies of *A. ambiguus* and *A. balzani*, and one colony each of *A. heyeri*, *A. echinator*, *A. bisphaerica*, *A. colombica*, *A. sexdens piriiventris*, *A. sexdens rufopilosa* and *A. robusta*, following a modified phenol-chloroform protocol [27]. Nuclear sequences were obtained for the wingless (WG), longwave rhodopsin (LW), elongation factor 1-alpha F1 (EF1 α F1) and elongation factor 1-alpha F2 (EF1 α F2) genes for the phylogenetic study of leafcutter ants using previously published primers [28], [29]. Polymerase chain reaction (PCR) was performed using 2 U of GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega), dNTPs (0.25 mM each), MgCl₂ (2.5 mM), reaction buffer (1 \times), a pair of primers (0.48 μ M each) and 1 μ L of DNA, in a final volume of 25 μ L. The amplification reaction included 2 min denaturation at 94°C, followed by 35 cycles of 94°C for 1 min, 60°C (for LW and EF1 α F1) or 55°C (WG and EF1 α F2) for 1 min, and 72°C for 1 min, with a final extension at 72°C for 7 min. Purified PCR products were sequenced directly using the same primers for amplification by Macrogen Inc., South Korea (www.macrogen.com).

Sequence Alignment and Phylogenetic Analysis

The chromatograms were evaluated and edited using the program Consed [30]. All four genes were aligned separately, then concatenated and analyzed by translation into amino acids using the program MEGA 5.0 [31]. The intron of the gene LW was excluded from the alignment and over 29 sequences were included from GenBank, i.e., 11 came from leafcutters and 15 from fungus-growing ants, which contained at least one species of each Attini genus. Three more sequences from species outside the Attini tribe were included as outgroups (Table S1 lists the species used and respective GenBank accession numbers).

Bayesian analysis [32] was conducted for phylogenetic inference using MrBayes 3.1 [33], [34] and MrModelTest 2.3 [35] was used to estimate the nucleotide substitution model that best fit for each gene codon position under Akaike's information criterion (AIC). The Bayesian analyses consisted of two independent runs of ten million generations each, sampled every 1000 generations and appropriated burn-in was determined using Tracer v1.4 [36]. A total of 25% of the tree was burned out to produce a consensus topology. Finally, the Bayesian topology was visualized using the FigTree v1.3.1. program [37].

Chromosome Evolution Analysis

We used the software chromEvol 1.3 [21] to infer the chromosome evolution model and haploid ancestral states (chromosome numbers) by means of ML and Bayesian methods relying on phylogenetic inferences presented in this study. The program evaluates eight chromosome evolution hypotheses and different transitions between chromosome numbers: dysploidy (decrease or increase by a single chromosome number in the haploid set of chromosomes constant or linear; the later dependent of current chromosome number), polyploidy (duplication of whole chromosome complement) and demi-polyploidy (process that allows karyotypes with multiples of a haploid karyotype). The later mechanism allows the transition from an n haploid karyotype to $1.5n$. It is widespread and common in plants but occurs very rarely in animals, so that models with this parameter were not evaluated. Each model has an alternative hypothesis that assumes no occurrence of polyploidization. All parameters were adjusted to date as described by Mayrose et al. [21]. The model that, to date, fits best and the null hypotheses of no duplication were analyzed with 10 000 simulations under the AIC.

Results

Karyotype Characterization and Analysis

In all the metaphases analyzed, *A. striatus* had a diploid chromosome number of $2n=22$ and a karyotype formula of $2K=20M+2SM$ (Figure 1). Thus, the chromosomes of *A. striatus* were classified into two types: metacentric with sizes ranging from large to small, and one submetacentric pair with an intermediate size. The morphometric data for the *A. striatus* chromosomes are shown in Table 1. The chromosome total length varied from 5.78 ± 0.15 to 1.77 ± 0.05 μm while the total length of all chromosomes was 78.67 μm . The asymmetric index was calculated as 57.82 .

The C-banding pattern showed that heterochromatin was quite visible in the centromeric region of most chromosomes (Figure 2).

It was also possible to observe more obvious positive heterochromatin blocks in six chromosome pairs (Figure 2, dark-grey marks). In these chromosomes, a pericentromeric heterochromatin block was located on the long arm while a terminal block was located on the short arm in the submetacentric chromosome pair. Four chromosome pairs had pericentromeric markings in one arm while the sixth pair had pericentromeric marks on two arms.

Sequential fluorochrome staining (CMA₃/DA/DAPI) indicated the presence of GC-rich blocks and an absence of AT-rich regions in different chromosomes (Figure 3, arrows). CMA₃ revealed a bright fluorescence that correlated with the most evident C-banding positive blocks, which suggested that the heterochromatin of *A. striatus* is GC-rich. However, DAPI did not detect any specific marks on the chromosomes of *A. striatus*, despite the presence of DAPI-negative regions complementary to the CMA₃-positive regions.

Phylogenetic Analysis

An alignment of 1517 base pairs was obtained for the concatenated nuclear genes LW, WG, EF1 α F1 and EF1 α F2 using the 43 sequences of fungus-growing ants with three species as outgroups, which included 476 variable sites and 335 parsimony informative sites. Nine different substitution models were estimated by MrModelTest 2.3 for each gene codon position (see Table S2 for details) and were employed in the Bayesian analysis. Figure 4 shows the Bayesian consensus phylogeny based on the concatenated sequences. All species of *Acromyrmex* and *Atta* genus formed a well-supported group. Likewise, all *Atta* spp. formed a strongly monophyletic group. However, the clade of *Acromyrmex* spp. included *Pseudoatta* spp. All specimens of *A. striatus* formed in a distinct clade that was a sister group to other leafcutter ants.

Inference of Chromosome Change

The hypothesis with constant gain, loss and duplication is, to date, the best supported model of chromosome evolution analyzed here (Table S3). The rate parameters estimated in the best model

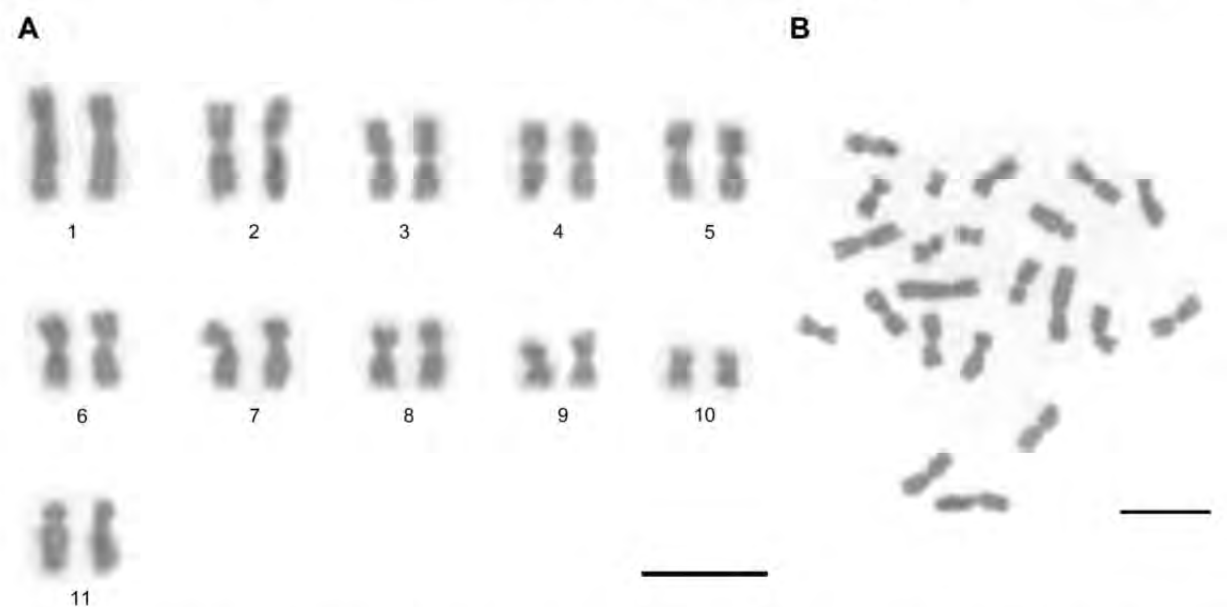


Figure 1. Conventional staining of mitotic cells of *Acromyrmex striatus*. (A) Diploid karyotype $2n=22$ and (B) its metaphase. Scale bar = 5 μm . doi:10.1371/journal.pone.0059784.g001

Table 1. Morphological analyses of the chromosomes of *Acromyrmex striatus*.

Chromosome	TL (μM)	L (μM)	S (μM)	RL	<i>r</i>	Chromosome Classification
1	5,78 \pm 0,15	3,54 \pm 0,12	2,23 \pm 0,06	7,35 \pm 0,10	1,60 \pm 0,05	Metacentric
1	5,45 \pm 0,18	3,39 \pm 0,14	2,06 \pm 0,06	6,93 \pm 0,16	1,65 \pm 0,05	Metacentric
2	4,92 \pm 0,15	2,92 \pm 0,13	2,00 \pm 0,07	6,25 \pm 0,10	1,48 \pm 0,08	Metacentric
2	4,69 \pm 0,17	2,65 \pm 0,11	2,04 \pm 0,06	5,95 \pm 0,11	1,29 \pm 0,03	Metacentric
3	4,15 \pm 0,13	2,28 \pm 0,09	1,87 \pm 0,08	5,27 \pm 0,07	1,24 \pm 0,07	Metacentric
3	4,01 \pm 0,13	2,13 \pm 0,07	1,89 \pm 0,07	5,09 \pm 0,07	1,13 \pm 0,03	Metacentric
4	3,83 \pm 0,10	2,08 \pm 0,09	1,75 \pm 0,05	4,87 \pm 0,05	1,20 \pm 0,06	Metacentric
4	3,72 \pm 0,10	2,06 \pm 0,08	1,65 \pm 0,05	4,72 \pm 0,04	1,26 \pm 0,06	Metacentric
5	3,66 \pm 0,10	2,02 \pm 0,06	1,64 \pm 0,06	4,65 \pm 0,05	1,25 \pm 0,05	Metacentric
5	3,60 \pm 0,09	1,94 \pm 0,05	1,66 \pm 0,05	4,58 \pm 0,03	1,18 \pm 0,04	Metacentric
6	3,52 \pm 0,09	1,93 \pm 0,05	1,59 \pm 0,06	4,48 \pm 0,02	1,23 \pm 0,04	Metacentric
6	3,42 \pm 0,08	1,93 \pm 0,05	1,49 \pm 0,06	4,35 \pm 0,03	1,31 \pm 0,06	Metacentric
7	3,38 \pm 0,08	1,90 \pm 0,06	1,48 \pm 0,05	4,30 \pm 0,03	1,30 \pm 0,05	metacentric
7	3,26 \pm 0,11	1,87 \pm 0,08	1,39 \pm 0,06	4,14 \pm 0,06	1,36 \pm 0,08	Metacentric
8	3,15 \pm 0,11	1,83 \pm 0,07	1,31 \pm 0,05	3,99 \pm 0,05	1,40 \pm 0,04	Metacentric
8	2,99 \pm 0,09	1,71 \pm 0,07	1,28 \pm 0,03	3,80 \pm 0,05	1,34 \pm 0,04	Metacentric
9	2,57 \pm 0,07	1,35 \pm 0,04	1,23 \pm 0,04	3,27 \pm 0,04	1,10 \pm 0,03	Metacentric
9	2,31 \pm 0,06	1,22 \pm 0,03	1,09 \pm 0,03	2,94 \pm 0,06	1,13 \pm 0,03	Metacentric
10	1,88 \pm 0,06	1,03 \pm 0,05	0,85 \pm 0,02	2,38 \pm 0,05	1,22 \pm 0,07	Metacentric
10	1,77 \pm 0,05	0,99 \pm 0,03	0,79 \pm 0,03	2,25 \pm 0,04	1,26 \pm 0,03	Metacentric
11	3,23 \pm 0,07	2,29 \pm 0,05	0,94 \pm 0,04	4,12 \pm 0,08	2,51 \pm 0,14	Submetacentric
11	3,40 \pm 0,09	2,45 \pm 0,08	0,95 \pm 0,04	4,33 \pm 0,07	2,62 \pm 0,14	Submetacentric

TL total length; L long arm length; S short arm length; RL relative length; *r* arm ratio ($r = L/S$).
doi:10.1371/journal.pone.0059784.t001



Figure 2. C-banding in the worker metaphase of *Acromyrmex striatus*. The dark-grey regions denote chromosome pairs containing obvious heterochromatin blocks. Scale bar = 5 μm .
doi:10.1371/journal.pone.0059784.g002

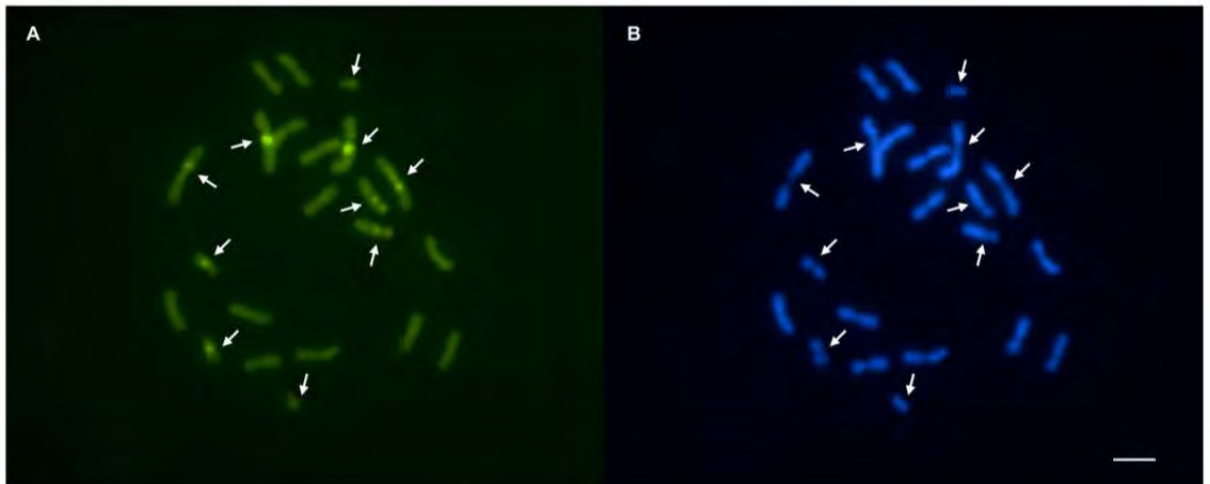


Figure 3. *Acromyrmex striatus* metaphase stained with fluorochromes: (A) CMA₃ and (B) DAPI. Positive GC-rich blocks were observed in five chromosome pairs (arrows), which matched the negative AT-rich regions in (B) indicated by arrows. Scale bar = 5 μm.
doi:10.1371/journal.pone.0059784.g003

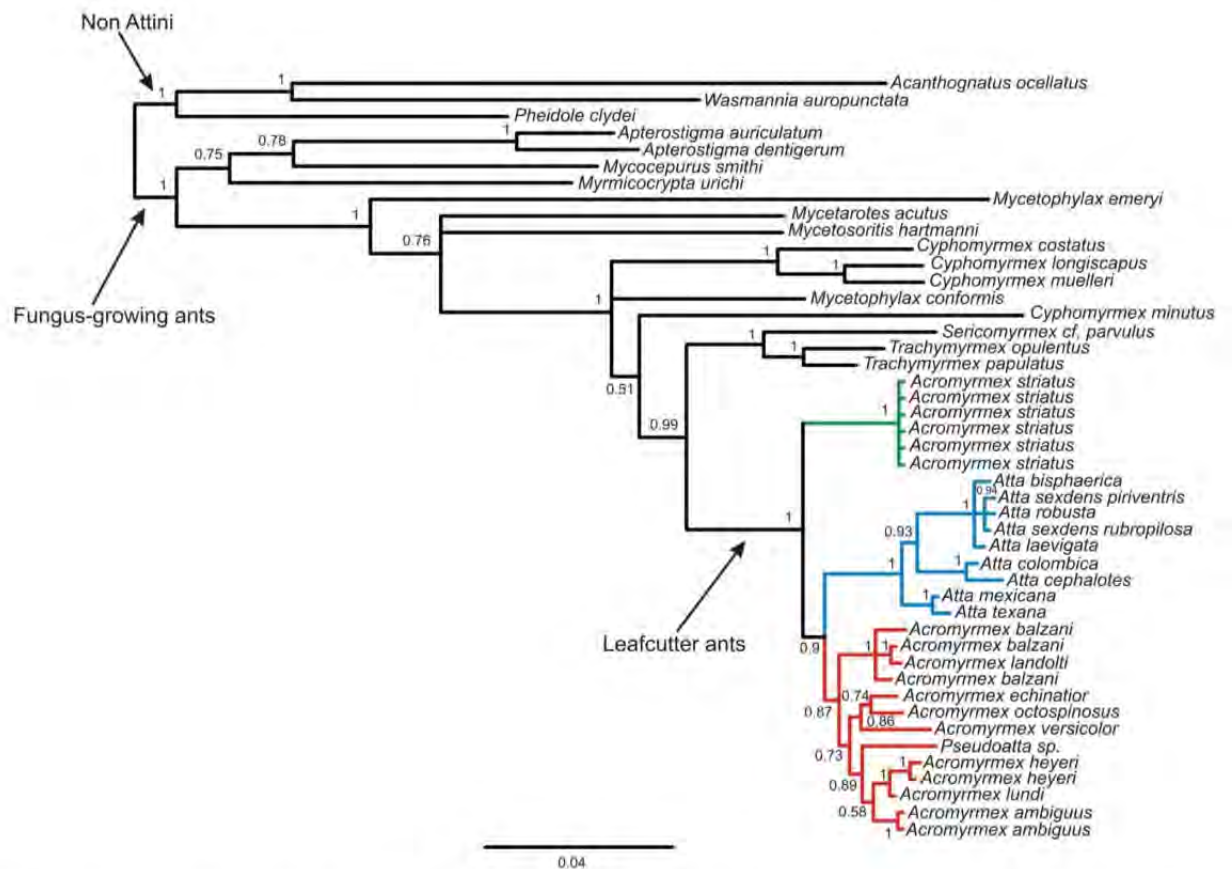


Figure 4. Bayesian inference phylogenetic tree based on the concatenated sequences of four nuclear genes (WG, LW, EF1αF1 and EF1αF2). Sequences are identified by organism name. Numbers above the nodes indicate the posterior probabilities from the Bayesian analysis. Clades of leafcutter ants and fungus-growing ants are indicated by arrows. The clustered groups of *Acromyrmex* species, *Atta*, and *Acromyrmex striatus* are represented as red, blue, and green, respectively. The topology was rooted using three species in the Myrmicinae subfamily.
doi:10.1371/journal.pone.0059784.g004

was 10.95 for loss, 2.34×10^{-10} for gain and 0.96 for duplication. Inferred chromosome loss events were 65.40, gain 6.65×10^{-5} , duplication 2.07. These results evidencing the occurrence of polyploidization events and suggest that whole karyotype duplication can occur along chromosome evolution in these species. The main events inferred, were loss that showed P.P.>0.5. The ancestral state reconstruction in both Bayesian and ML analyses strongly supports $n = 11$ at the node of leafcutter ants (Figure 5).

Discussion

The majority of *Acromyrmex* spp. have a diploid number of 38 chromosomes, with the exception of the social parasite *A. ameliae* with $2n = 36$ [18–20]. However, all of the *A. striatus* colonies analyzed in this study had a chromosome number of $2n = 22$. This result indicates that there is karyotypic variability in the *Acromyrmex*

genus, which was previously considered to have a constant or homogenous chromosome number [15], [20].

The chromosome morphology of *A. striatus* (majority of metacentric chromosomes) was highly divergent from that of other *Acromyrmex* spp. during cytogenetic analyses, where they were observed to have a higher number of submetacentric and subtelocentric chromosomes [14],[15],[18]. However, *A. striatus* had the same diploid chromosome number and a similar chromosome morphology as *Atta* spp., which also contained a majority of metacentric chromosomes [15–17].

The C-banding pattern of *A. striatus* was not similar to the pattern found in other previously analyzed *Acromyrmex* spp. [18]. However, *A. striatus* had a heterochromatin distribution pattern that was similar to *A. colombica* (so far, the only *Atta* species with a described C-banding pattern), with centromeric and interstitial positive blocks [17]. The CMA₃ banding pattern of the *A. striatus*

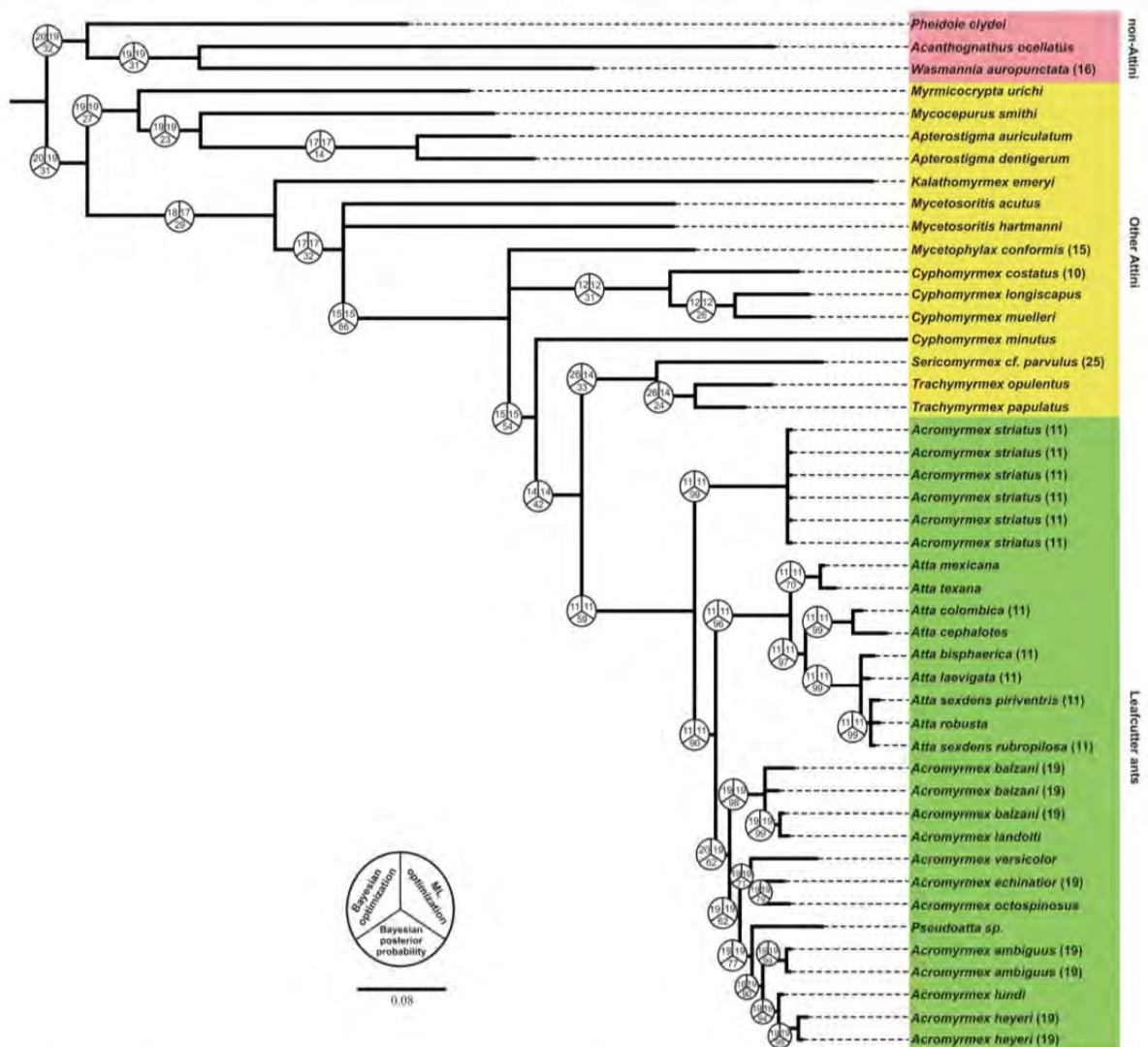


Figure 5. Ancestral haploid chromosome state reconstruction inferred under Bayesian and Maximum Likelihood optimizations, with out-groups (other Attini and non-Attini) included and known chromosome states (tips). Pie charts at nodes represent the inferred chromosome number in both approaches and its Bayesian posterior probabilities.
doi:10.1371/journal.pone.0059784.g005

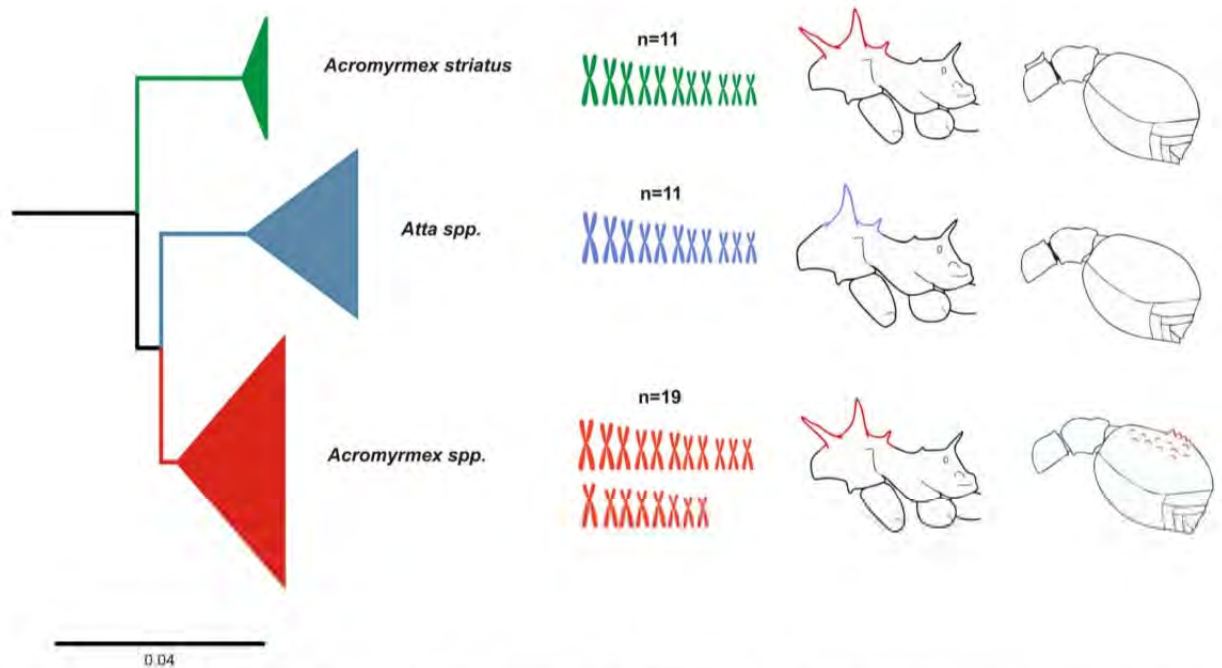


Figure 6. Summary of results in the present and previous studies. From the left to right: Phylogenetic relationship among *Acromyrmex striatus*, *Acromyrmex* spp. and *Atta* spp. showing *A. striatus* as a sister group of the remainder leafcutter ants. Ideograms representing the haploid chromosome complement known for each cluster, *Atta* spp. and *A. striatus* shared the haploid number of 11 chromosomes and the majority of metacentric chromosomes. Morphological characters (from description by Mayh -Nunes [7]) shared among *A. striatus*, *Atta* spp. and *Acromyrmex* spp., three pairs of spines on promesonotum are beard by *A. striatus* and *Acromyrmex* spp., while *Atta* spp. display two pairs of spines, on the other hand *A. striatus* and *Atta* spp. display smooth gastral tergum whereas *Acromyrmex* spp. has a tuberculate gaster. doi:10.1371/journal.pone.0059784.g006

matched the most obvious C-banded regions, suggesting that the heterochromatin was rich in GC base pairs. Moreover, *Acromyrmex* spp. [18] and *A. striatus* produced no positive marks with DAPI, indicating that none of these species had AT-rich specific regions. These fluorochrome staining patterns have also been reported in another ant from the tribe Attini, *Mycocepurus goeldii* [19], and other insects such as beetles, whereas the GC-rich blocks were concentrated in heterochromatin regions [38].

Centric fusions have been proposed as a rearrangement involved in the reduction of the diploid number of *A. aneliae* from $2n = 38$ to $2n = 36$ [18]. However, the reduced diploid chromosome number of *A. striatus* was unlikely to be attributable to centric fusion because this type of rearrangement results in a loss of the short arms [39] while a recurrent fusion process would result in a great amount of genomic loss [40]. Centric fission and other rearrangements are also considered to be more recurrent than centric fusion during ant karyotype evolution [40], [41]. Thus, the most parsimonious solution is that the chromosome number found in *A. striatus* is a character maintained from a common ancestor shared by *A. striatus* and *Atta* spp., rather than being attributable to sequential recurrent rearrangements. Our analysis of ancestral state reconstruction is in agreement with this hypothesis. The haploid chromosome number estimated by both Bayesian and ML methods was $n = 11$.

The phylogenetic reconstruction reported here provides an unexpected result, which was congruent with our cytogenetic findings and morphological features reported by Mayh -Nunes [7]. *A. striatus* clustered in a well-supported clade that was distinct from other *Acromyrmex* spp. These other *Acromyrmex* spp. fell into

another clade, with a high statistical support, which was distinct from *Atta* spp. Our phylogenetic reconstructions suggest that *A. striatus* is a sister group of the remainder leafcutter ants, that split before the divergence between *Acromyrmex* and *Atta* genus. The inclusion of *A. striatus* and other leafcutter ant species in the phylogeny did not affect the monophyletic state of leafcutter ants, which agreed with previous phylogenetic analyses [4], [10] where *Atta*, *Acromyrmex*, and *Pseudonatta* formed a well-supported clade (P.P. = 1). Sumner et al. [10] used mitochondrial sequences to show that the *Atta* genus does not comprise a distinct monophyletic cluster and that they arose from a South American *Acromyrmex*. In the Sumner et al. [10] phylogenetic analysis, the *Atta* species included in the study fell into a well-supported group (bootstrap = 100 and P.P. = 1), which clustered together with *A. balzani* without any statistical support. In contrast, our analysis supported the monophyly of the *Atta* genus as a likely sister group of *Acromyrmex* [4], [42] while this monophyly held even when *A. striatus* was included in the phylogeny.

Our phylogenetic analyses also provide some insights that two subgenera recognized by Emery [6] in the *Acromyrmex* genus (*Acromyrmex* and *Moellerius*) based on morphological traits could not be monophyletic. All species that were formerly placed into the subgenus *Moellerius* (*A. balzani*, *A. heyeri*, *A. landolti*, *A. striatus*, and *A. versicolor*) fell into distinct clusters with the exception of *A. balzani* and *A. landolti*, which were grouped together with high statistical support. Moreover, *A. heyeri* clustered with *A. lundii* from the *Acromyrmex* subgenus, with high statistical support. Similar results were reported by Sumner et al. [10] using mitochondrial markers. Thus, our results question the validity of the division of the

Acromyrmex genus into these two subgenera, suggesting that *Acromyrmex* and *Moellerius* are not natural groups.

The phylogenetic tree produced in this study contained statically well-supported groups that can clearly discriminate *Atta* spp., *A. striatus*, and *Acromyrmex* spp. The cytogenetic analysis in this study elucidated a further feature of the close relationship between the karyotype of *A. striatus* and *Atta* spp., in addition to the morphological traits reported in the literature [7] where a phylogeny constructed using 40 morphological characters from 25 *Acromyrmex* species and subspecies showed that *A. striatus* was most closely related to the *Atta* genus. Likewise, Grutzmacher et al. [8] used RAPD and AFLP markers to show that *A. striatus* was the least related species to five other *Acromyrmex* species.

Thus, taking the results found here and those from previous studies into account, all summarized in the Figure 6, we suggest that leafcutter ants derived from other Attini ants resulting in two separate lineages. One of these lineages evolved into *A. striatus*, and the other one diversified into the remainder leafcutter. Both, genera *Atta* and *Acromyrmex* share some distinct characters with *A. striatus*, e.g. chromosome number and morphology, the smooth gastral tergum from the former and three pairs of spines on the promesonotum and the colony size from the later. Based on our molecular data we recommend a new classification to accompany our findings, in which *A. striatus* should be placed into a new genus. Although, there are no criteria to higher-level classification, several studies suggest some guidelines for genus recognition as monophyly and practical compactness [43], [44]. As previous phylogenetic hypotheses in addition to our established assumptions point out that the genus *Acromyrmex* in the actual configuration is paraphyletic, a formal taxonomic revision seems warranted.

In the present study, our integrated cytogenetic and molecular analysis provided some interesting new insights into the relationship between *A. striatus* and other leafcutter ants. This study clearly demonstrates the value of using integrated methods of analysis. Additional studies are required that focus on the cytogenetic analysis of other populations from Argentina, Paraguay, and Uruguay to increase the cytogenetic data on *A. striatus*, as well as

further molecular phylogenetic analysis of other genes and more species of leafcutter ants.

Supporting Information

Table S1 Ant species used in this study for constructing the molecular phylogeny and their accession numbers in GenBank.

(DOCX)

Table S2 Models of evolution estimated for each gene and codon position with MrModeltest v3.7. The models listed below were employed for each data partition in a Bayesian analysis (see Material and Methods).

(DOCX)

Table S3 AIC scores and Maximum Likelihood (ML) estimates for the data set analyzed for each model implemented by ChromEvol software.

(DOCX)

Acknowledgments

We are indebted to the many people that made this study possible. We are grateful to Terezinha de Castro Della Lucia, Alci Loeck, Dionisio Link, Stela Quirán, Anayansi Valderrama, Hermogenes Fernandez and Jose Guillermo Sanchez for their help with field sampling and to Silvia G. Pompolo for the use of her laboratory during cytogenetic analysis. We thank Tathiana G. Sobrinho, Jorge A. Dergam and Mara G. Tavares for suggestion on previous version of the manuscript. We also thank Christoph Schubart and Nicole Rivera for their helpful comments and English revision.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MPC DCC TMFS. Performed the experiments: MPC DCC. Analyzed the data: MPC DCC TMFS. Contributed reagents/materials/analysis tools: MPC DCC TMFS. Wrote the paper: MPC DCC TMFS.

References

- Brener AGF, Ruggiero A (1994) Leaf-cutting ants (*Atta* and *Acromyrmex*) inhabiting Argentina: patterns in species richness and geographical range sizes. *J Biogeogr* 21: 391–399.
- Mueller UG, Rabeling C (2008) A breakthrough innovation in animal evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 5287–5288.
- Weber NA (1972) Gardening ants, the Attines. The American Philosophical Society, Philadelphia, PA.
- Schultz TR, Brady SG (2008) Major evolutionary transitions in ant agriculture. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 5435–5440.
- 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.
- Emery C (1913) Études sur les Myrmicines. *Ann Soc Entomol Bel* 57: 250–263.
- Mayhé-Nunes AJ (1991) Estudo de *Acromyrmex* (Hymenoptera, Formicidae) com ocorrência constatada no Brasil: subsídios para uma análise filogenética [Dissertation]. Programa de Pós-graduação em Entomologia. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa.
- Grutzmacher DD, Loeck AE, Oliveira AC, Zimmer PD, Malone G (2007) Variabilidade genética interespecífica em formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* que ocorrem no Estado do Rio Grande do Sul. *Ciênc Rural* 37: 921–927.
- Delabie JHC, Alves HSR, Reuss-Strenzel GM, Carmo AFR, Nascimento IC (2011) Distribuição das formigas cortadeiras dos gêneros *Acromyrmex* e *Atta* no Novo Mundo. In: Della-Lucia, T.M.C. (Org.). *Formigas Cortadeiras: da Biologia ao Manejo*. 1ª edição. Viçosa-MG, Editora da Universidade Federal de Viçosa, p.80–101.
- Sumner S, Aanen DK, Delabie J, Boomsma JJ (2004) The evolution of social parasitism in *Acromyrmex* leaf-cutting ants: a test of Emery's rule. *Insectes Soc* 51: 37–42.
- Goodisman MAD, Kovacs JL, Hunt BG (2008) Functional genetics and genomics in ants (Hymenoptera: Formicidae): The interplay of genes and social life. *Myrmecol News* 11: 107–117.
- Sumner AT (2003) *Chromosomes: Organization and Function*. Blackwell Publishing, North Berwick, United Kingdom.
- Lorite P, Palomeque T (2010) Karyotype evolution in ants (Hymenoptera: Formicidae), with a review of the known ant chromosome numbers. *Myrmecol News* 13: 89–102.
- Goñi B, Zolessi LC, Imai HT (1983) Karyotypes of thirteen ant species from Uruguay (Hymenoptera, Formicidae). *Caryologia* 36: 363–371.
- Fadini MAM, Pompolo SG (1996) Cytogenetics of some ant species of the tribe Attini (Hymenoptera, Formicidae) from the region of Viçosa, MG. *Rev Bras Genet* 19: 53–55.
- Santos-Colares MC, Viégas J, Roth MGM, Loeck AE (1997) Preparation of mitotic chromosomes of leaf-cutting ants from the genera *Atta* and *Acromyrmex*. *Braz J Genet* 20: 25–27.
- Murakami T, Fujiwara A, Yoshida MC (1998) Cytogenetics of ten ant species of the tribe Attini (Hymenoptera, Formicidae) in Barro Colorado Island, Panama. *Chromosome Science* 2: 135–139.
- Barros LAC (2010) Citogenética de espécies de Attini (Formicidae: Myrmicinae) [Dissertation]. Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa.
- Barros LAC, Aguiar HJAC, Mariano CSF, Delabie JHC, Pompolo SG (2010) Cytogenetic characterization of the lower-Attini *Mycocepurus goeldii* (Formicidae: Myrmicinae: Attini). *Sociobiology* 56: 57–66.
- Mariano CSF, Santos IDS, Grog S, Leroy C, Male PJ, et al. (2011) The karyotypes of *Gigantiops destructor* (Fabricius) and other ants from French Guiana (Formicidae). *Ann Soc Entomol Fr* 47: 140–146.
- Mayrose I, Barker MS, Otto SP (2010) Probabilistic models of chromosome number evolution and the inference of polyploidy. *Systematic Biology* 59: 132–144.
- Imai HT, Taylor RW, Crosland MWJ, Crozier RH (1988) Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. *Jpn J Genet* 63: 159–185.

23. Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res* 75: 304–306.
24. Pompolo SG, Takahashi CS (1990) Chromosome numbers and C-banding in two wasp species of the genus *Polistes* (Hymenoptera, Polistinae, Polistini). *Insectes Soc* 37: 251–257.
25. Schweizer D (1980) Simultaneous fluorescence staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human. *Cytogenet. Cell Genet* 27: 190–193.
26. Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201–220.
27. Fernandes-Salomão TM, Rocha RB, Campos LAO, Araujo EF (2005) The first internal transcribed spacer (ITS-1) of *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): characterization and phylogenetic analysis. *Insectes Soc* 52: 11–18.
28. Ward PS, Downie DA (2005) The ant subfamily Pseudomyrmecinae (Hymenoptera: Formicidae): phylogeny and evolution of big-eyed arboreal ants. *Syst Entomol* 30: 310–335.
29. Brady SG, Schultz TR, Fisher BL, Ward PS (2006) Evaluating alternative hypotheses for the early evolution and diversification of ants. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 18172–18177.
30. Gordon D, Abajian C, Green P (1998) Consed: A graphical tool for sequence finishing. *Genome Res* 8: 195–202.
31. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, et al. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731–2739.
32. Yang ZH, Rannala B (1997) Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: A Markov Chain Monte Carlo method. *Mol Biol Evol* 14: 717–724.
33. Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754–755.
34. Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572–1574.
35. Nylander JAA (2004) MrModeltest v2. Program distributed by the author. Uppsala University: Evolutionary Biology Center.
36. Rambaut A, Drummond AJ (2007) Tracer v1.4. Available in <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
37. Rambaut AJ (2009) Figtree v1.3.1. Available in <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
38. Cabral-de-Mello DC, Moura RC, Melo AS, Martins C (2011) Evolutionary dynamics of heterochromatin in the genome of *Dichotomius* beetles based on chromosomal analysis. *Genetica* 139: 315–325.
39. White MJD (1973) *Animal Cytology and Evolution*. Cambridge University Press.
40. Imai HT, Crozier RH, Taylor RW (1977) Karyotype evolution in Australian ants. *Chromosoma* 59: 341–393.
41. Imai HT, Satta Y, Takahata N (2001) Integrative study on chromosome evolution of mammals, ants and wasps based on the minimum interaction theory. *J Theor Biol* 210: 475–497.
42. Bacci MJr, Solomon SE, Mueller UG, Martins VG, Carvalho AOR, et al. (2009) Phylogeny of leafcutter ants in the genus *Atta* Fabricius (Formicidae: Attini) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol* 51: 427–437.
43. Gill FB, Slikas B, Sheldon FH (2005) Phylogeny of titmice (paridae): ii. Species relationships based on sequences of the mitochondrial Cytochrome-b gene. *The Auk* 122: 121–143.
44. Fouquet A, Recoder R, Teixeira MJr, Cassimiro J, Amaro RC, et al. (2012) Molecular phylogeny and morphometric analyses reveal deep divergence between Amazonia and Atlantic Forest species of *Dendrophryniscus*. *Mol Phylogenet Evol* 62: 826–838.

Supporting Information

Table S1 – Ant species used in this study for constructing the molecular phylogeny and their accession numbers in GenBank.

Species	GenBank Accession Numbers				
	LW exon 1	LW exon 2	Wingless	EF1 α -F1	EF1 α -F2
<i>Acanthognathus ocellatus</i>	EU204511	EU204268	EU204192	EU204436	EU204586
<i>Acromyrmex ambiguus</i>	JX198243	JX198243	JX198231	KC478110	KC478127
<i>Acromyrmex ambiguus</i>	JX198244	JX198244	JX198232	KC478109	KC478126
<i>Acromyrmex balzani</i>	JX198245	JX198245	JX198233	KC478111	KC478128
<i>Acromyrmex balzani</i>	JX198246	JX198246	JX198234	KC478112	KC478129
<i>Acromyrmex balzani</i>	EU204490	EU204247	EU204170	EU204414	EU204565
<i>Acromyrmex echinaior</i>	KC478104	KC478104	KC478095	KC478113	KC478130
<i>Acromyrmex heyeri</i>	JX198247	JX198247	JX198235	KC478114	KC478131
<i>Acromyrmex heyeri</i>	EU204529	EU204286	EU204210	EU204453	EU204604
<i>Acromyrmex landolti</i>	EU204530	EU204287	EU204211	EU204454	EU204605
<i>Acromyrmex lundii</i>	EU204497	EU204254	EU204178	EU204422	EU204573
<i>Acromyrmex octospinosus</i>	EU204465	EU204222	EU204145	EU204389	EU204541
<i>Acromyrmex striatus</i>	JX198248	JX198248	JX198236	KC478115	KC478132
<i>Acromyrmex striatus</i>	JX198249	JX198249	JX198237	KC478116	KC478133
<i>Acromyrmex striatus</i>	JX198250	JX198250	JX198238	KC478117	KC478134
<i>Acromyrmex striatus</i>	JX198251	JX198251	JX198239	KC478118	KC478135
<i>Acromyrmex striatus</i>	KC478107	KC478107	KC478096	KC478119	KC478136
<i>Acromyrmex striatus</i>	KC478108	KC478108	KC478097	KC478120	KC478137
<i>Acromyrmex versicolor</i>	EF013534	EF013534	EF013662	EF013211	EF013373
<i>Apterostigma auriculatum</i>	EF013549	EF013549	EF013677	EF013230	EF013392
<i>Apterostigma dentigerum</i>	EU204515	EU204272	EU204196	EU204440	EU204590
<i>Atta bisphaerica</i>	KC478102	KC478102	KC478098	KC478121	KC478138
<i>Atta cephalotes</i>	EU204516	EU204273	EU204197	EU204441	EU204591
<i>Atta colombica</i>	KC478103	KC478103	KC478099	KC478122	KC478139
<i>Atta laevigata</i>	EU204481	EU204238	EU204161	EU204405	EU204556
<i>Atta mexicana</i>	EU204491	EU204248	EU204171	EU204415	EU204566
<i>Atta robusta</i>	JX198254	JX198254	JX198242	KC478123	KC478140
<i>Atta sexdens piriventris</i>	KC478105	KC478105	KC478100	KC478124	KC478141
<i>Atta sexdens rubropilosa</i>	KC478106	KC478106	KC478101	KC478125	KC478142
<i>Atta texana</i>	EU204525	EU204282	EU204206	EU204449	EU204600
<i>Cyphomyrmex costatus</i>	EU204488	EU204245	EU204168	EU204412	EU204563
<i>Cyphomyrmex longiscapus</i>	EU204496	EU204253	EU204177	EU204421	EU204572
<i>Cyphomyrmex minutus</i>	EU204508	EU204265	EU204189	EU204433	EU204583
<i>Cyphomyrmex muelleri</i>	EU204535	EU204292	EU204216	EU204459	EU204610
<i>Mycetarotes acutus</i>	EU204517	EU204274	EU204198	EU204442	EU204592
<i>Mycetophylax conformis</i>	EU204486	EU204243	EU204166	EU204410	EU204561
<i>Mycetophylax emeryi</i>	EU204478	EU204235	EU204158	EU204402	EU204553
<i>Mycetosoritis bartmanni</i>	EU204479	EU204236	EU204159	EU204403	EU204554
<i>Mycocrepus smithi</i>	EU204477	EU204234	EU204157	EU204401	EU204552
<i>Myrmicocrypta urichi</i>	EU204471	EU204228	EU204151	EU204395	EU204546
<i>Pheidole clydei</i>	EF013615	EF013615	EF013743	EF013317	EF013479
<i>Pseudoatta</i> sp.	EU204493	EU204250	EU204174	EU204418	EU204569
<i>Sericomyrmex</i> cf. <i>parvulus</i>	EU204467	EU204224	EU204147	EU204391	EU204542
<i>Trachymyrmex opulentus</i>	EU204498	EU204255	EU204179	EU204423	EU204574
<i>Trachymyrmex papulatus</i>	EU204504	EU204261	EU204185	EU204429	EU204579
<i>Wasmannia auropunctata</i>	EU204483	EU204240	EU204163	EU204407	EU204558

GenBank accession numbers of the sequences obtained in this study is shown in bold.

Table S2 – Models of evolution estimated for each gene and codon position with MrModeltest v3.7. The models listed below were employed for each data partition in a Bayesian analysis (see Material and Methods).

Gene	Codon Position	Substitution Model
EF1 α F1	1 st base	GTR+I
	2 nd base	K80+G
	3 rd base	HKY+G
EF1 α F2	1 st base	GTR+I
	2 nd base	F81+I
	3 rd base	HKY+G
LW	1 st base	GTR+I+G
	2 nd base	GTR+G
	3 rd base	HKY+G
WG	1 st base	K80+G
	2 nd base	HKY+I
	3 rd base	GTR+G

Table S3 - AIC scores and Maximum Likelihood (ML) estimates for the data set analyzed for each model implemented by ChromEvol software.

Models	Log-likelihood	AIC scores
Gain, Loss and Duplication constant*	-31.06	68.12
Gain and Loss constant, no duplication	-40.05	84.1
Gain, Loss and duplication constant, Gain and Loss depend linearly on the current chromosome number	-30.99	71.97
Gain and Loss constant, Gain and Loss depend linearly on the current chromosome number, no duplication	-38.91	85.81

*Best fitting model

Capítulo 2



Estrutura genética e história demográfica de populações da formiga cortadeira *Acromyrmex striatus* (Roger, 1863) nas planícies do extremo sul da América do Sul: integrando filogeografia e modelos de distribuição

Resumo

As mudanças climáticas do passado influenciaram a distribuição atual dos organismos e deixaram sua marca sobre a diversidade genética intraespecífica. Estudos filogeográficos podem ajudar a elucidar a importância relativa das oscilações climáticas do passado sobre o perfil de estruturação genética das populações e padrões de distribuição das espécies. O objetivo do presente estudo foi investigar o padrão filogeográfico e a demografia histórica de populações de *Acromyrmex striatus* (Roger, 1863), espécie de formiga cortadeira restrita à planícies abertas da América do Sul. Adicionalmente, foi empregado uma abordagem de modelagem da distribuição da espécie para prever seu habitat contemporâneo e histórico. O gene mitocondrial citocromo oxidase I (COI) de 128 operárias amostradas em 38 localidades foi parcialmente sequenciado. As sequências foram utilizadas para estimar a diversidade genética e inferir sobre a demografia histórica, tempo de divergência e a estrutura de populações de *A. striatus*. Foram identificados um total de 58 haplótipos, divididos em cinco haplogrupos principais. A análise de variância molecular (AMOVA) revelou que a maior percentagem da variação genética está entre os grupos de populações. O padrão geral de estruturação observado foi compatível com o esperado em um modelo de isolamento por distância, sugerindo um equilíbrio entre fluxo gênico e deriva. A análise de demografia histórica evidenciou que as populações de *A. striatus* se mantiveram constantes ao longo de sua história evolutiva. Embora oscilações da área de seu habitat histórico potencial tenham ocorrido durante as mudanças climáticas do Quaternário, as populações de *A. striatus* estão fortemente estruturadas geograficamente. No entanto, barreiras explícitas ao fluxo gênico não foram identificadas. Esta estruturação pode ser explicada por fatores ecofisiológicos da espécie e pelo isolamento por distância que juntos podem ter contribuído para a configuração da estrutura genética das populações nesta espécie de formiga cortadeira.

Introdução

As várias oscilações climáticas ocorridas durante o Quaternário produziram grandes alterações na diversidade genética e distribuição das espécies atuais (Hewitt, 2000, 2004). Durante os períodos glaciais do Pleistoceno, as florestas tropicais se fragmentaram como consequência do aumento da aridez e diminuição da temperatura formando áreas úmidas estáveis, conhecidas como refúgios, onde as espécies florestais persistiram durante as glaciações (Haffer, 1969; Vanzolini & Williams, 1981; Carnaval & Moritz, 2008; Carnaval et al., 2009; Porto et al., 2013). Inversamente, os ecossistemas de gramíneas e ambientes de vegetação aberta expandiram devido às condições climáticas mais frias e secas durante as glaciações. No passado, estes diferentes ecossistemas de gramíneas cobriram grande parte da América do Sul durante os períodos glaciais do Quaternário (Behling, 2002). Evidências paleo-palinológicas sugerem que os campos de gramíneas subtropicais se expandiram do sul por no mínimo 750 km (até a latitude de 20°S) em direção ao Norte, durante o período glacial (Behling & Negrelle, 2001; Behling, 2002). Esse tipo de vegetação formada por gramíneas ocorre ainda hoje em manchas no planalto sul do Brasil (especialmente em Santa Catarina), e foram mantidas devido às condições climáticas da região, que apresenta longos períodos de seca e baixa precipitação (Behling, 2002). Campos subtropicais, conhecidos como campos sulinos, também podem ser encontrados na planície da região sul do estado do Rio Grande do Sul formando um contínuo com os Pampas da Argentina e Uruguai (Behling et al., 2009).

Identificar padrões filogeográficos e inferir sobre os processos de diversificação que ocorreram durante as mudanças climáticas do passado são ferramentas importantes para o entendimento da distribuição e da diversificação dos organismos atuais (Avice, 2000). O padrão nas genealogias das espécies que foram mantidas geneticamente separadas por alguma barreira física que impediu a dispersão dos indivíduos entre duas populações é influenciado pelo tempo de duração destas barreiras, bem como pela demografia histórica das populações isoladas (Avice, 2009). Assim, assinaturas genéticas da história populacional na distribuição da diversidade genética dentro de uma espécie podem ser observadas

nas populações atuais, decorrentes do isolamento com consequente interrupção do fluxo gênico e deriva (Morgan et al., 2011). Estudos filogeográficos sobre a fauna terrestre associada às florestas tropicais na América do Sul, especialmente nos Biomas Amazônico e Floresta Atlântica, foram realizados (Solomon et al., 2008; Carnaval et al., 2009; Resende et al., 2010). A maioria dos resultados desses estudos concorda com a hipótese dos refúgios florestais pleistocênicos e sugerem a persistência de fragmentos florestais durante os máximos glaciais ao norte da Floresta Atlântica e posterior colonização da região sul. Estes refúgios foram sugeridos com base na premissa de alta diversidade genética e endemismo de organismos mantidos em alopatria dentro dos fragmentos florestais bem como em modelos paleoclimáticos (Hewitt, 2000; Carnaval et al., 2009). No entanto, um número crescente de estudos tem apontado ambiguidades na previsibilidade destes modelos, principalmente na região sul do Brasil (Fitzpatrick et al., 2009; Thomé et al., 2010).

Divergentes padrões filogeográficos e de história demográfica têm sido observados em organismos associados a habitats não florestais como respostas às oscilações climáticas ocorridas no Quaternário (González et al., 1998; Gonzalez & Wink, 2010; Ojeda, 2010; Mapelli et al., 2012; Mora et al., 2013). Esses estudos destacam a importância de se avaliar organismos adaptados a ambientes com estresse hídrico, os quais mostram uma ampla variedade de respostas aos ciclos glaciais e interglaciais comparados com as espécies que habitam exclusivamente ecossistemas florestais. Apesar do potencial para o entendimento dos padrões de diversidade e distribuição, ainda são poucos os estudos conduzidos com organismos nestes ecossistemas (Sérsic et al., 2011; Fregonezi et al., 2013; Turchetto-Zolet et al., 2013).

Acromyrmex striatus (Roger, 1863), objeto de estudo deste trabalho, é uma espécie de formiga cortadeira associada a ambientes não florestais restrita as baixas latitudes da América do Sul. Tais características fazem desta espécie um excelente modelo para avaliar as influências das flutuações climáticas históricas, sobre a origem e a dinâmica evolutiva das planícies associadas à vegetação aberta do sul da América do Sul. *A. striatus* é uma formiga comum em ambientes costeiros de restinga e terrenos arenosos com área de distribuição abrangendo os Pampas (incluindo os campos sulinos), a costa sul brasileira nos estado de Santa Catarina e

Rio Grande do Sul, parte do Chaco na Argentina e extremo sul do Paraguai (Delabie et al., 2011). Seu ninho é peculiar, pois as operárias limpam a superfície do solo sobre as câmaras de cultivo do fungo removendo toda a vegetação bem como matéria vegetal morta (Gonçalves, 1961; Kusnezov, 1963). Além das características citadas, *A. striatus* é uma espécie intrigante do ponto de vista taxonômico, filogenético e citogenético. O recente estudo publicado por Cristiano et al. (2013) mostrou que *A. striatus* possui o mesmo número cromossômico identificado nas espécies do gênero *Atta* cariotipadas. No entanto, na inferência filogenética, esta espécie não agrupou nem com as suas congêneres nem com espécies do gênero *Atta*, relacionando-se como grupo irmão das demais formigas cortadeiras avaliadas.

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi estimar a diversidade genética e o perfil filogeográfico de *A. striatus* com o intuito de responder às seguintes questões: (i) de que forma as modificações ocorridas no ambiente de ocorrência desta espécie afetaram o habitat histórico e, conseqüentemente, a sua estrutura genética e demográfica? (ii) Existiram barreiras geográficas contribuindo para um fluxo gênico restrito ou ausente? (iii) A distribuição das populações associadas aos habitats costeiros e do interior continental foram influenciadas por diferentes fatores? (iv) As populações de *A. striatus* foram estáveis através do tempo evolutivo? Adicionalmente, para uma avaliação mais detalhada da história demográfica e do padrão filogeográfico observado para *A. striatus*, foi estimada a área potencial de distribuição atual e a área potencial histórica utilizando modelos paleoclimáticos disponíveis. Os resultados deste estudo contribuem para o melhor entendimento da influência das oscilações climáticas do passado sobre a origem e diversidade dos biomas de vegetação aberta, que ainda são pouco estudados e pobremente conhecidos.

Material e métodos

Coleta de amostras

Um total de 128 colônias de *Acromyrmex striatus* foram coletadas em 38 localidades no Brasil e na Argentina (Tabela 1 e Figura 1), abrangendo a maior parte da distribuição desta espécie. A permissão específica para as coletas no Brasil

(SISBio26441-1) foi autorizada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). As amostras provenientes da Argentina foram gentilmente cedidas pela Dra. Stela Quirán.

Extração de DNA, amplificação e sequenciamento

Amostras de *A. striatus* preservadas em álcool foram utilizadas para extração do DNA total de um indivíduo de cada colônia, utilizando o protocolo sugerido por Fernandes-Salomão et al. (2005). O DNA extraído foi utilizado para amplificação de parte do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade I (COI) e parte do gene nuclear wingless (*wg*). O par de *primer* CO11-3F e CO12-4R (Azuma et al., 2006) foi empregado para amplificação do gene COI e o par Wg578F (Ward & Downie, 2005) e WG1032R (Abouheif & Wray, 2002) para o gene Wg.

As reações de amplificação por PCR foram realizadas utilizando 1U de *Taq* polimerase (Promega), dNTPs (0,25 mM cada), MgCl₂ (2,5 mM), tampão da *Taq* 1X (Promega), primers (0,48 μM cada) e 1 μL de DNA (50 ng), em um volume final de 25 μL. As condições para a amplificação incluíram um passo de desnaturação inicial a 94°C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 1 min a 94°C para desnaturação do DNA, 1 min a 53,5°C (COI) ou 55°C (WG) para o pareamento dos primers e 72°C por 2 min (COI) ou 1 min (WG) para extensão do primer seguidos de um passo de extensão final a 72°C por 7 min.

Os amplificons foram enviados para a Macrogen Inc., Coréia do Sul (www.macrogen.com), purificados e sequenciados diretamente em ambas as direções (*forward* e *reverse*) utilizando os mesmos primers empregados nas reações de amplificação.

As fitas *forward* e *reverse* foram inspecionadas e reunidas utilizando o programa Consed (Gordon et al., 1998). As sequências foram previamente traduzidas para a sequências de aminoácidos com o propósito de garantir a homologia dos sítios, e verificar possível existência de códons de parada ou *indels*, e em seguida, os nucleotídeos foram alinhados usando o algoritmo ClustalW (Thompson et al., 1994) no programa MEGA5 (Tamura et al., 2011).

Diversidade genética e estrutura da população

A diversidade genética de cada população amostrada foi investigada utilizando o programa DNAsp 5.1 (Librado & Rozas, 2009) para avaliar o polimorfismo dos nucleotídeos, número de haplótipos (H), diversidade haplotípica (Hd) e diversidade nucleotídica (π).

A estrutura populacional foi avaliada por meio da análise espacial de variância molecular (SAMOVA - *spatial analysis of molecular variance*) implementada pelo programa SAMOVA 1.0 (Dupanloup et al., 2002). Esta análise permite definir grupos de populações sem qualquer informação *a priori* sobre a estrutura da população. O método baseia-se na estatística F e utiliza um procedimento de emparelhamento simulado para definir grupos de populações que são geograficamente homogêneos e geneticamente diferentes uns dos outros. A análise foi realizada separando as populações em grupos de dois até doze, e assim, examinar a proporção da variação genética e se esta seria devido às diferenças entre os grupos formados (Fct). Desta forma, foi identificado entre os diferentes grupos analisados o maior e estatisticamente significativo Fct para um determinado K .

A análise de variância molecular (AMOVA – *Analysis of Molecular Variance*) foi estimada pela variação genética e pelos índices de fixação implementados no programa Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010). A AMOVA foi calculada com três níveis hierárquicos de acordo com os grupos de populações definido pela SAMOVA.

Para avaliar se a variação genética poderia ser explicada pelo efeito de isolamento por distância, foi realizada uma correlação entre a o logaritmo da distância genética e distância geográfica por meio do teste de Mantel (Mantel, 1967) utilizando o programa *Alleles In Space* (AIS – Miller, 2005), com 10000 replicações.

Uma genealogia gênica foi reconstruída no programa Network 4.6.1.1. (www.fluxus-engineering.com) por meio do algoritmo *median-joining* para verificar a existência de relação entre a distribuição dos haplótipos e a distribuição geográfica das amostras de *A. striatus* analisadas.

Demografia histórica e divergência

Com o intuito de testar se as populações de *A. striatus* passaram por uma recente expansão populacional ou “*bottleneck*”, foram realizados os testes de neutralidades F_s de F_u (Fu, 1997) e D de Tajima (Tajima, 1989) implementados no programa ARLEQUIN 3.5 para cada população. A distribuição das diferenças genéticas entre pares de haplótipos (*mismatch distribution*) foi realizada na população que mostrou resultado significativo para os testes de neutralidade considerando a premissa de populações panmíticas. Foi comparada a distribuição observada e a esperada tanto para o modelo de expansão demográfica quando para o modelo de expansão espacial utilizando o programa ARLEQUIN 3.5. Em geral, distribuições multimodais são consistentes com estabilidade demográfica ou múltiplos eventos de expansão, enquanto que usualmente distribuições unimodais indicam que a população passou por uma expansão populacional ou espacial recente (Excoffier & Lischer, 2010). A adequabilidade dos modelos aos dados foi avaliada pela significância das somas dos quadrados dos desvios (SSD) e o índice *H_{ri}* (*Harpending's raggedness index*).

Para determinar quando ocorreu a divergência entre os maiores clados e se o período corresponde ao de datas conhecidas de eventos do Quaternário, os tempos de divergência entre os clados foram estimados. Para inferir o tempo desde o ancestral comum mais recente (TMRCA) e, assim, o tempo de divergência entre os grupos de *A. striatus*, foi utilizada uma metodologia que se assemelha a implementada por Seal et al., (2011). O TMRCA foi estimado por meio da abordagem Bayesiana em cadeias de MCMC utilizando o programa BEAST 1.6.1 (Drummond & Rambaut, 2007). A taxa de mutação de $1,455E-02 \pm 1,25E-03$ de substituições por sítio por milhões de anos, estimada especificamente para o gene COI de formigas (Resende et al., 2010), foi utilizada sob uma abordagem de relógio molecular relaxado não correlacionado (*relaxed molecular clock uncorrelated log-normal*). Esta abordagem foi escolhida com base na análise de evolução das sequências para o relógio molecular por meio do programa PAUP* (Swofford, 2003), a qual rejeitou o modelo de relógio molecular restrito ou fixo ($\chi^2 = 211,6$; d.f. = 56; $P < 0.001$). Tratando-se de uma análise intraespecífica, as sequências idênticas foram removidas e o modelo de coalescência de tamanho constante (*coalescence: constant size*) foi utilizado.

As análises foram conduzidas sob o modelo de substituição nucleotídica SRD06 (Shapiro et al., 2006), o qual permite que a terceira posição do códon tenha uma taxa de substituição diferente da primeira e da segunda base, por 30 milhões de gerações excluindo os 20% iniciais. Um total de cinco análises independentes foram conduzidas e, posteriormente, combinadas e analisadas no programa TRACER v 1.5 (Rambaut & Drummond, 2007), para verificar a consistência e repetitividade dos dados por meio do tamanho efetivo da amostra >200 (*effective sample size* - ESS).

Modelagem da distribuição potencial atual e histórica

Para identificar as áreas de distribuição potencial da espécie *A. striatus* para condições climáticas atuais e do Quaternário, foi implementado o algoritmo de máxima entropia no programa MAXENT (Phillips et al., 2006). Este modelo permite calcular a probabilidade de ocorrência da espécie no espaço geográfico com base nas variáveis ambientais de um determinado conjunto de locais. Foram utilizados os pontos de presença da espécie georeferenciados durante as coletas do presente trabalho, e para obter uma inferência mais robusta, pontos adicionais foram obtidos da literatura (Kusnezov, 1956; Varela & Perera, 2003; Milesi & Casenave, 2004; Armani & Quirán, 2007; Wild, 2007). As variáveis climáticas utilizadas nesta análise foram: temperatura anual média (BIO1), sazonalidade da temperatura (desvio padrão *100)(BIO4), temperatura média do trimestre mais seco (BIO9), precipitação anual (BIO12), sazonalidade da precipitação (coeficiente de variação *100)(BIO15) e precipitação do trimestre mais quente (BIO18), disponíveis na base de dados WORLDCLIM (<http://www.worldclim.org>) (Hijmans et al., 2005). Estas variáveis foram escolhidas considerando as características de nidificação e a capacidade de termoregulação de *A. striatus* com relação ao seu fungo simbionte (Bollazzi et al., 2008). Com o intuito de evitar predições espúrias, foi definido o limite de critério mínimo de presença que é igual à predição de um modelo com um valor mínimo de presença para qualquer ocorrência. Cada modelo gerado pelo MAXENT foi avaliado pela área sob a curva (AUC – *area under the curve*). Valores de AUC próximos a 1 indicam máxima acurácia do modelo gerado. Foram conduzidas análises para o modelo climático atual visando obter a área preditiva de ocorrência de *A. striatus* atualmente. Outros três modelos

paleoclimáticos disponíveis, sendo um para última interglaciação (LIG, 130 mil anos Antes do Presente – A.P.) e dois para o último máximo glacial (LGM – 21 mil anos A.P.) o MIROC (*Model of interdisciplinary research on climate*) e CCSM3 (*community climate system model*), foram utilizados para inferir a área preditiva adequada para ocorrência de *A. striatus* durante o Quaternário.

Resultados

Caracterização e diversidade das sequências

Um total de 922 pares de bases não ambíguas foram sequenciadas do gene mitocondrial COI de populações naturais da espécie *A. striatus*, e nenhum códon de parada ou *indel* foi observado. Para o gene nuclear *wingless*, 375 pares de bases foram sequenciadas, porém este gene não apresentou nenhum polimorfismo intraespecífico. Desta forma, as análises que seguirão neste estudo, foram realizadas com o gene mitocondrial COI. Foram observados nas sequências do COI 66 sítios variáveis, destes, 58 eram informativos para a parcimônia e oito eram *singletons*, e 58 haplótipos foram identificados. A diferença no número de nucleotídeos entre as sequências analisadas foi em média de 12,96 nucleotídeos (min - máx = 0 - 37) e a divergência máxima entre duas sequências foi de 4,01%. A diversidade haplotípica (Hd) foi de $0,908 \pm 0,021$ e a diversidade nucleotídica (π) total foi de $0,01406 \pm 0,00094$ considerando todas as populações de *A. striatus*. As populações que apresentaram a maior e a menor diversidade haplotípica foram ARGE e FLOR, respectivamente. A população FLOR também apresentou a menor diversidade nucleotídica enquanto a maior foi observada para a população MOST (Tabela 2).

Relações filogenéticas e estrutura geográfica

A Figura 2 mostra as relações filogenéticas entre os haplótipos de *A. striatus*, onde cinco haplogrupos geograficamente estruturados foram observados. As populações de *A. striatus* coletadas na região litorânea de Santa Catarina foram todas incluídas no mesmo haplogrupo, incluindo 12 haplótipos, sendo o haplótipo H1 (n = 36) o mais abundante (Figura 2). Da mesma forma, as amostras coletadas na

Argentina formam um único haplogrupo, que, no entanto, apresentaram alta diversidade haplotípica. As amostras referentes à população RIOG, no sul da costa litorânea do Rio Grande do Sul, formam um haplogrupo separado das demais amostras coletadas no interior e no litoral do Rio Grande do Sul. Três haplótipos exclusivos foram identificados (H13, H14 e H19) nas amostras provenientes da população NORT (ambas as localidades estão situadas ao norte do litoral do estado do Rio Grande do Sul) e formam um haplogrupo isolado das outras populações. As demais populações do interior e litoral do Rio Grande do Sul formam um haplogrupo distinto, onde o haplótipo mais abundante foi o H41 (n=14). A distribuição dos haplótipos evidencia alta estruturação regional das populações de *A. striatus* (Figura 3), onde os haplogrupos estão conectados por nove passos mutacionais ou mais.

A SAMOVA foi implementada para identificar o máximo de diferenciação genética entre grupos e assim estimar potenciais barreiras ao fluxo gênico. O grupo $K = 7$ foi o que apresentou o maior valor de Fct (Tabela 3 e Figura 4). Baseado nos grupos sugerido pela SAMOVA, a AMOVA mostrou que a maior parte da variação genética foi atribuída a diferenças entre grupos, ou seja, entre regiões amostradas (Tabela 4). Estes resultados indicam que os grupos de populações estão estruturados geograficamente. O modelo de estruturação genética estimado pelo SAMOVA ($K = 7$) apresentou significado geográfico uma vez que populações adjacentes foram agrupadas juntas. Os valores de Fst calculados para cada uma das populações variaram entre 0,9494 e 0,0000, sendo a maioria significativa ($p < 0,05$). Em geral, os menores valores de Fst foram observados entre populações vizinhas. No entanto, os valores de Fst entre as populações de Santa Catarina não foram significativos, sugerindo que não existe ausência significativa de fluxo gênico entre essas populações (Tabela 5).

O teste de Mantel mostrou uma correlação significativa entre o logaritmo da distância genética e a distância geográfica ($r = 0,5662$; $p < 0,01$), indicando que a diferenciação genética entre as populações de *A. striatus* pode, em parte, ser atribuída ao isolamento por distância. Para verificar se a população da Argentina estaria influenciando a significância do resultado, esta população foi removida da análise e, mesmo assim, o resultado foi significativo ($r = 0,5031$; $p < 0,01$).

Demografia histórica e datação molecular

Os testes de neutralidade foram conduzidos para cada uma das 13 populações de *A. striatus* (Tabela 2). Entre todas as populações, apenas a MOST apresentou valores negativos para o F_s de Fu ($p < 0,01$) e para o D de Tajima ($p < 0,05$). Estes resultados indicam que as frequências haplotípicas desta população diferem do esperado pela hipótese de evolução neutra, sugerindo expansão populacional recente. Estes resultados foram confirmados pela análise de *mismatch distribution* (Figura 5), onde foi observado um perfil unimodal na distribuição das diferenças haplotípicas par a par. Adicionalmente, o padrão de distribuição observado se ajusta tanto com o modelo de expansão espacial (SDD = 0,00758; $p = 0,70$; $H_{ri} = 0,06084$; $p = 0,62$) quando o de expansão demográfica (SDD = 0,00758; $p = 0,70$; $H_{ri} = 0,06084$; $p = 0,66$).

Na Tabela 6 são apresentadas as idades de divergências entre os clados estimadas por meio da abordagem Bayesiana. O tempo do ancestral comum mais recente entre as populações do Brasil e da Argentina foi de ~2,5 milhões de anos. No Brasil, o tempo do ancestral comum mais recente de todas as populações analisadas foi de ~1,531 milhões de anos, sendo que as populações do interior do estado do Rio Grande do Sul (incluindo MOST e parte de NORT) diversificaram a ~664 mil anos, enquanto as populações do litoral do estado de Santa Catarina e extremo sul do Rio Grande do Sul (população RIOG) são relativamente mais recentes com ~336,1 mil anos e ~324,5 mil anos, respectivamente (Tabela 6).

Distribuição potencial atual e histórica

O modelo de distribuição potencial atual mostrou alto desempenho em prever a ocorrência de *A. striatus* (AUC = 0,982). Este modelo foi compatível com a área de distribuição atual da espécie (Figura 6a), embora tenha superestimado algumas áreas conhecidas por não serem adequadas à ocorrência de *A. striatus* (e.g. áreas ao norte do estado de Santa Catarina cobertas por Floresta Atlântica). A projeção do modelo sobre os parâmetros paleoclimáticos do LGM e LIG sugeriu áreas comparativamente adequadas à ocorrência de *A. striatus*, e todos os modelos de distribuição histórica estimados apresentaram valores de AUC apropriados

(>0,95) (Figura 6b-d). No entanto, foram superestimados, tanto para o LIG quanto para o LGM, áreas de ocorrência potencial no nordeste do Brasil. Essas áreas não foram observadas na modelagem de distribuição atual, e possivelmente não possuem significado biológico. Os modelos de paleodistribuição sugerem que pode ter ocorrido uma redução no habitat histórico de *A. striatus* durante o LIG e uma expansão durante o LGM. Além disso, áreas de alta probabilidade de ocorrência foram estimadas até mesmo ultrapassando dos limites da costa atual durante o LGM, provavelmente devido à redução do nível do oceano (Figura 6c-d).

Discussão

Os resultados obtidos no presente estudo fornecem evidências que contribuem para a compreensão da história evolutiva e os padrões de variabilidade genética de *A. striatus*, espécie associada às planícies de vegetação aberta. As populações de *A. striatus* estão altamente estruturadas geneticamente como resultado de um longo período de tempo de isolamento dos grupos de populações ao longo de sua história evolutiva. As relações genealógicas observadas mostram que haplótipos ocorrendo dentro de uma região geográfica, são proximamente relacionados, sugerindo fluxo gênico restrito ou ausente entre os grupos de populações separados geograficamente.

As populações dentro de uma mesma região são geneticamente similares uma vez que a maior variação genética foi observada entre grupos de populações na AMOVA. Os cinco grupos previamente estabelecidos (ver tabela 3) foram confirmados pela AMOVA. Foram identificados pela SAMOVA sete potenciais barreiras ao fluxo gênico, separando as populações litorâneas. Distingue-se a população mais ao norte do litoral continental de Santa Catarina (CONT) das demais, e as populações do litoral do Rio Grande do Sul em três grupos, sendo um ao norte da distribuição (NORT), um central (MOST), e um ao sul da distribuição (RIOG) litorânea de *A. striatus*. Estes resultados demonstram que o corpo de água que separa as populações da Ilha de Santa Catarina (FLOR) das populações do continente, não representa uma barreira que impediria o fluxo gênico. De fato, corpos de águas como rios e oceanos, não representam uma barreira intransponível para insetos que voam (Azuma et al., 2006; Seal et al., 2011).

Uma vez que o percentual de variação molecular foi atribuído a variações entre regiões, pode-se sugerir que os grupos de populações de *A. striatus* estiveram isoladas de algum modo e com pouca possibilidade de dispersão entre uma região e outra, ocorrendo tempo suficiente para o acúmulo de diferentes mutações únicas entre os grupos de populações distantes geograficamente. Estes resultados concordam com a correlação positiva entre o logaritmo da distância genética e distância geográfica no teste de Mantel, sugerindo que o isolamento por distância contribui para o padrão de distribuição da diferenciação genética observada em *A. striatus*. De fato, isolamento por distância é esperado em espécies com baixa habilidade de dispersão e que tenham ocupado e colonizado sua área atual de ocorrência por um longo período de tempo (Mora et al., 2013)

Fatores ecofisiológicos da espécie e o isolamento por distância podem ter contribuído para a configuração da estrutura genética encontrada, visto que barreiras físicas explícitas ao fluxo gênico não foram identificadas. Mesmo sendo aptas ao voo, às fêmeas de *A. striatus* apresentam baixa capacidade de dispersão (Diehl et al., 2001). Além disso, apresentam alta especificidade de habitat, sendo restritas a solos arenosos, bem drenados, e pobres em matéria orgânica (Diehl-Fleig & Rocha, 1998). De fato, a seleção de solos adequados para o estabelecimento da colônia foi demonstrado ser de particular relevância para formigas cortadeiras (Bollazzi et al., 2008). Assim, eventos distintos associados à geomorfologia histórica das duas planícies (litorânea e do interior) onde *A. striatus* ocorre, parecem estar associados ao padrão filogeográfico observado. Fatores associados à idade geológica e à geomorfologia destas planícies devem ter influenciado a estruturação genética de *A. striatus*. Essas duas planícies são caracterizadas por apresentarem solos arenosos, permeáveis e sob forte influência eólica. As planícies costeiras são geologicamente mais recentes, formadas, principalmente, por solos quartzosos. Já os Pampas são ambientes mais antigos caracterizados por muitos tipos de solos e uma paisagem pedológica heterogênea, onde os solos arenosos ocorrem em pacotes rodeados por outros tipos de formações (Freitas et al., 2010; Fregonezi et al., 2013). Assim, dada a preferência de *A. striatus* sobre o tipo de solo para nidificação, os padrões de distribuição e extensão dos terrenos arenosos nas planícies, à distância e a matriz entre estes, podem ter influenciado a conectividade entre as populações, favorecendo o perfil filogeográfico observado neste estudo. Reforçando esta

hipótese, é conhecido que a distribuição heterogênea das áreas arenosas no interior das planícies da América do Sul parece estar associada com o padrão estruturado das populações dos roedores subterrâneos do gênero *Ctenomys* (Mapelli et al., 2012; Mora et al., 2013) bem como a distribuição e diversificação de espécies de plantas do gênero *Petunia* e *Calibrachoa* (Fregonezi et al., 2013).

Identificar padrões filogeográficos explícitos são, às vezes, difíceis, particularmente, para áreas historicamente dinâmicas, como para ambiente de vegetação aberta. Alguns estudos tem sugerido que, no Brasil, a diversificação dos organismos acompanhava a vegetação de campos abertos de altitude (Moraes et al., 2009; Franco & Manfrin, 2013). Estes ambientes expandiam durante os períodos glaciais favorecidos pelo clima mais frio e seco, e contraíam e eram isolados em ilhas devido ao avanço das florestas durante os períodos interglaciais, mais quentes e úmidos (Behling & Negrelle, 2001; Behling, 2002). Assim, foi sugerido que os padrões de diversificação das espécies presentes nestes ambientes foram influenciados pelo isolamento das populações e consequente interrompimento do fluxo gênico (Moraes et al., 2009). No entanto, estes processos, provavelmente não afetaram de maneira semelhante a diversificação e distribuição das espécies nos ambientes de vegetação aberta de terras baixas como, por exemplo, os Pampas. Este bioma persistiu durante os períodos glaciais e interglaciais, de modo que não foi diretamente afetado pela expansão das florestas úmidas (Ortiz-Jaureguizar & Cladera, 2006; Fregonezi et al., 2013). Grant & Bowen (1998) sugerem que a combinação de alta diversidade haplotípica e nucleotídica, como observado em *A. striatus*, está relacionada a populações historicamente grandes e estáveis. Do mesmo modo, os testes de neutralidade não identificaram desvios da hipótese de evolução neutra dos haplótipos, indicando que *A. striatus* não experimentou períodos de rápida expansão populacional ou “*bottlenecks*” (exceto para a população MOST), sugerindo que a espécie permaneceu demograficamente estável durante o tempo evolutivo. Assim, com base nos resultados do presente estudo, sugere-se que a colonização das planícies de vegetação aberta por *A. striatus* aconteceu de maneira gradativa e influenciada por diversos fatores, incluindo aqueles moldados pelos eventos climáticos que ocorreram no final do Plioceno e durante todo o Quaternário.

A reconstrução da área potencial de distribuição de *A. striatus* no tempo evolutivo sugere que os habitats adequados para o seu estabelecimento passaram por uma moderada expansão durante os períodos glaciais (Figura 7 – LGM, 21 mil anos A.P.) e reafirmam a ideia geral de expansão dos ambientes de vegetação em direção ao norte da América do Sul como sugerido por Behling (2002). Os modelos de paleodistribuição também indicam que durante o período interglacial (Figura 7b – LIG, 130 mil anos A.P.) houve uma redução das áreas potencialmente adequadas à ocorrência de *A. striatus*, possivelmente associada ao aumento da umidade e expansão dos ambientes florestais (Behling & Negrelle, 2001). No entanto, a área potencial de ocorrência de *A. striatus* nos períodos glaciais e interglaciais foram particularmente constantes em relação às áreas atuais de ocorrência da espécie. Assim, as populações atuais de *A. striatus* podem ser o resultado de uma grande população que se manteve demograficamente estável durante o tempo evolutivo. Possíveis eventos de expansão e redução das populações podem não ter eliminado o *imprint* genético de estabilidade demográfica das populações de *A. striatus*. Adicionalmente, a estabilidade demográfica histórica observada no presente estudo bem como a posição filogenética de *A. striatus* como grupo irmão das demais formigas cortadeiras (Cristiano et al., 2013), concordam com a hipótese inicialmente proposta por Fowler (1983) de que este grupo de formigas deve ter se originado e diversificado em ambientes áridos no sul da América do Sul.

Os efeitos das oscilações climáticas sobre a diversificação das espécies é um assunto controverso. Dados baseados em relógio molecular têm sugerido que os eventos antecedem o Pleistoceno (Fitzpatrick et al., 2009; Resende et al., 2010; Thomé et al., 2010), ao contrário do inicialmente pensado (Moritz et al., 2000). Os resultados obtidos neste estudo confirmam esta tendência, uma vez que a idade estimada para o tempo do ancestral comum mais recente de todos os haplótipos de *A. striatus* foi de aproximadamente 2,5 milhões de anos, o qual corresponde à época do Plioceno. O tempo de divergência entre as populações da Argentina e do Brasil foram estimados na transição entre o final do Plioceno e início do Pleistoceno, enquanto as outras populações do Brasil apresentaram tempos de diversificação relativamente mais recentes, datadas entre o meio e o final do Pleistoceno. Estes resultados sugerem que as populações presentes no interior do Brasil são historicamente mais antigas, e que as populações da Argentina são relativamente

mais recentes. Combinando os dados de datação molecular e as conectividades entre os haplótipos, a distribuição de *A. striatus* pode ser resultado de um processo de dispersão e colonização a partir das populações brasileiras. No entanto, estes resultados devem ser vistos com cautela, dado ao número limitado de amostras na Argentina.

Outro aspecto importante evidenciado pela datação dos maiores clados de *A. striatus* é a concordância entre as idades estimadas dos grupos litorâneos, com a idade de formação dos ambientes arenosos da região costeira do estado do Rio Grande do Sul. A evolução desta planície costeira ocorreu como resultado dos eventos de transgressão e regressão marinha do tipo laguna-barreira durante o Quaternário, e que se iniciaram há aproximadamente 400 mil A.P. (Tomazelli & Villwock, 2000). Segundo estes autores, o sistema se caracteriza pela deposição gradual de barreiras de depósitos arenosos ao longo da costa que apresentam idades diferentes de formação durante o Pleistoceno e Holoceno. A distribuição dos haplótipos de *A. striatus* evidencia a separação das populações litorâneas da região centro-norte (NORT; MOST) e região sul (RIOG). Esta evidência sugere que a população RIOG é derivada de uma linhagem independente das demais linhagens presentes no Rio Grande do Sul, e a estimativa do tempo do ancestral comum mais recente foi de ~324,5 mil anos que é correspondente à idade de formação do cordão arenoso (Barreira II, ver Tomazelli & Villwock, 2000) na região mais ao sul da costa. As demais populações litorâneas ocupam cordões arenosos formados em eventos transgressivo-regressivos secundários, e, portanto, mais recentes. Estas regiões constituem as barreiras denominadas III e IV, que são atualmente a costa do Rio Grande do Sul e datam de eventos do final do Pleistoceno e Holoceno (Tomazelli & Villwock, 2000). Além disso, parte da população NORT está conectada com as populações do interior do estado, enquanto a outra parte desta população forma um haplogrupo distinto, conectado aos outros grupos por haplótipos estimados ou não amostrados. É importante ressaltar a elevada diversidade genética observada nesta população (ver Tabela 2). Alta diversidade genética tem sido associada a barreiras pleistocênicas que serviram como refúgios durante as oscilações no nível dos oceanos (Pinheiro et al., 2011). Segundo estes autores, essas barreiras são depósitos de dunas que serviram como ambientes estáveis para as espécies de ambientes costeiros. Complexos de dunas e barreiras estáveis de longa duração (denominadas

Jardins do Éden) foram sugeridas para a região de ocorrência da população NORT (Dillenburg et al., 2009), o que explicaria a alta diversidade genética encontrada nesta localidade. Uma hipótese alternativa seria a possibilidade de esta região representar uma zona de contato secundário entre as populações que foram historicamente isoladas durante a elevação do nível do mar. Adicionalmente, esta região deve ter sido fonte para colonização das outras áreas do litoral, como a população MOST, a única que apresentou evidências significativas para expansão populacional nos testes de neutralidade.

De modo geral os resultados do presente estudo sugerem uma complexa relação entre os processos históricos e ecológicos que moldaram a atual estrutura das populações de *A. striatus* em sua distribuição geográfica. Pode-se propor, então, que o cenário da história demográfica de *A. striatus* foi influenciado de maneira diferente entre as populações que ocorrem nos Pampas e na planície costeira. Nesta última, geologicamente mais recente, as populações foram marcadamente influenciadas pelas oscilações oceânicas durante o Quaternário. As populações de *A. striatus* são significativamente estruturadas geograficamente como um resultado de uma demografia histórica estável durante o tempo evolutivo e baixa capacidade de dispersão. Isolamento por distância parece ter forte influência, e sugere um equilíbrio entre migração e deriva genética nesta espécie de formiga. Estes resultados são consistentes com a hipótese de que os Pampas e a região costeira do sul do Brasil não foram fortemente afetados com a expansão das florestas durante os períodos interglaciais. Devido à diversidade de respostas observada em espécies que habitam ambientes de vegetação aberta, é importante que mais estudos sejam desenvolvidos com espécies nestes ambientes para que os processos gerais que governaram a diversificação destes ecossistemas sejam completamente entendidos.

Referências

- Abouheif E., Wray G.A., 2002. Evolution of the gene network underlying wing polyphenism in ants. *Science*. 297, 249–252.
- Armani A., Quirán E., 2007. Evaluacion cualitativa y cuantitativa de la oferta y cosecha de biomasa herbacea por *Acromyrmex striatus* Roger (Hymenoptera Formicidae) en la Provincia de la Pampa, Argentina. *Gayana*. 71, 203–206.

- Avise J.C., 2000. Phylogeography: The history and formation of species. Harvard University Press, Massachusetts, Cambridge.
- Avise J.C., 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*. 36, 3–15.
- Azuma N., Ogata K., Kikuchi T., Higashi S., 2006. Phylogeography of Asian weaver ants, *Oecophylla smaragdina*. *Ecological Research*. 21, 126–136.
- Behling H., Jeske-Pieruschka V., Schüler L., Pillar V. de P., 2009. Dinâmica dos campos no sul do Brasil durante o Quaternário tardio. in: Pillar V.P., Müller S.C., Castilhos Z.M.S., Jacques A.V.Á.(Eds.), Campos sulinos - conservação e uso sustentável da biodiversidade, Instituto do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Brasília, Brasil - MMA, pp. 13–25.
- Behling H., Negrelle R.R.B., 2001. Tropical rain forest and climate dynamics of the Atlantic lowland, Southern Brazil, during the Late Quaternary. *Quaternary Research*. 56, 383–389.
- Behling H., 2002. South and southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: a synthesis. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*. 177, 19–27.
- Bollazzi M., Kronenbitter J., Roces F., 2008. Soil temperature, digging behaviour, and the adaptive value of nest depth in South American species of *Acromyrmex* leaf-cutting ants. *Oecologia*. 158, 165–175.
- Carnaval A.C., Hickerson M.J., Haddad C.F.B., Rodrigues M.T., Moritz C., 2009. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot. *Science*. 323, 785–789.
- Carnaval A.C., Moritz C., 2008. Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Biogeography*. 35, 1187–1201.
- Cristiano M.P., Cardoso D.C., Fernandes-Salomão T.M., 2013. Cytogenetic and molecular analyses reveal a divergence between *Acromyrmex striatus* (Roger, 1863) and other congeneric species: taxonomic implications. *PloS one*. 8, e59784.
- Delabie J.H., Alves H., Reuss-Strenzel G., Carmo A., Nascimento I., 2011. Distribuição das formigas cortadeiras dos gêneros *Acromyrmex* e *Atta* no Novo Mundo. in: Della-Lucia T.(Eds.), Formigas cortadeiras: da bioecologia ao manejo, Editora Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, pp. 80–101.
- Diehl E., De Araújo A.M., Cavalli-Molina S., 2001. Genetic variability and social structure of colonies in *Acromyrmex heyeri* and *A. striatus* (Hymenoptera: Formicidae). *Brazilian Journal of Biology*. 61, 667–678.

- Diehl-Fleig E., Rocha E.S. da, 1998. Escolha de solo por fêmeas de *Acromyrmex striatus* (Roger) (Hymenoptera: Formicidae) para construção do ninho . Anais da Sociedade Entomológica do Brasil. 27, 41–45.
- Dillenburg S., Barboza E., Tomazelli L., Ayup-Zouain R., Hesp P., Clerot L.P., 2009. The Holocene coastal barriers of Rio Grande do Sul. in: Dillenburg S.R., Hesp P.A.(Eds.), Geology and geomorphology of Holocene coastal barriers of Brazil, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, pp. 53–91.
- Drummond A., Rambaut A., 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. BMC Evolutionary Biology. 214, 1–8.
- Dupanloup I., Schneider S., Excoffier L., 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. Molecular Ecology. 11, 2571–2581.
- Excoffier L., Lischer H.E., 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Molecular ecology resources. 10, 564–567.
- Fernandes-Salomão T.M., Rocha R.B., Campos L.A.O., Araújo E.F., 2005. The first internal transcribed spacer (ITS-1) of *Melipona species* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): characterization and phylogenetic analysis. Insectes Sociaux. 52, 11–18.
- Fitzpatrick S.W., Brasileiro C.A., Haddad C.F.B., Zamudio K.R., 2009. Geographical variation in genetic structure of an Atlantic Coastal Forest frog reveals regional differences in habitat stability. Molecular Ecology. 18, 2877–2896.
- Fowler H.G., 1983. Latitudinal gradients and diversity of the leaf-cutting ants (*Atta* and *Acromyrmex*) (Hymenoptera: Formicidae). Revista de Biología Tropical. 31, 213-216.
- Franco F.F., Manfrin M.H., 2013. Recent demographic history of cactophilic *Drosophila* species can be related to Quaternary palaeoclimatic changes in South America. Journal of Biogeography. 40, 142–154.
- Fregonezi J.N., Turchetto C., Bonatto S.L., Freitas L.B., 2013. Biogeographical history and diversification of *Petunia* and *Calibrachoa* (Solanaceae) in the Neotropical Pampas grassland. Botanical Journal of the Linnean Society. 171, 140–153.
- Freitas E.M. de, Trevisan R., Schneider A.A., Boldrini I.I., 2010. Floristic diversity in areas of sandy soil grasslands in Southwestern Rio Grande do Sul, Brazil. Brazilian Journal of Biosciences. 8, 112–130.
- Fu Y.X., 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. Genetics. 147, 915–925.

- Gonçalves C.R., 1961. O gênero *Acromyrmex* no Brasil (Hym. Formicidae). *Studia Entomologica*. 4, 113–180.
- Gonzalez J., Wink M., 2010. Genetic differentiation of the Thorn-tailed Rayadito *Aphrastura spinicauda* (Furnariidae: Passeriformes) revealed by ISSR profiles suggests multiple palaeoreugia and high recurrent gene flow. *Ibis*. 152, 761–774.
- González S., Maldonado J.E., Leonard J.A., Vilá C., Barbanti Duarte J.M., Merino M., Brum-Zorrilla N., Wayne R.K., 1998. Conservation genetics of the endangered Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). *Molecular Ecology*. 7, 47–56.
- Gordon D., Abajian C., Green P., 1998. Consed: A graphical tool for sequence finishing. *Genome Research*. 8, 195–202.
- Grant W.A.S., Bowen B.W., 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity*. 89, 415–426.
- Haffer J., 1969. Speciation in Amazonian Forest Birds. *Science*. 165, 131–137.
- Hewitt G.M., 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*. 405, 907–913.
- Hewitt G.M., 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. 359, 183–195.
- Hijmans R.J., Cameron S.E., Parra J.L., Jones P.G., Jarvis A., 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*. 25, 1965–1978.
- Kusnezov N., 1956. Claves para la indentificación de las hormigas de la fauna Argentina. *Idia*. 1–56.
- Kusnezov N., 1963. Zoogeografía de las hormigas en sudamerica. *Acta zoológica Lilloana*. XIX, 25–186.
- Librado P., Rozas J., 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 25, 1451–1452.
- Mantel N., 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*. 27, 209–220.
- Mapelli F.J., Mora M.S., Mirol P.M., Kittlein M.J., 2012. Effects of Quaternary climatic changes on the phylogeography and historical demography of the subterranean rodent *Ctenomys porteusi*. *Journal of Zoology*. 286, 48–57.

- Milesi F.A., Casenave J.L., 2004. Unexpected relationships and valuable mistakes: non-myrmecochorous *Prosopis* dispersed by messy leafcutting ants in harvesting their seeds. *Austral Ecology*. 29, 558–567.
- Miller M.P., 2005. Alleles in space (AIS): computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. *The Journal of Heredity*. 96, 722–724.
- Mora M.S., Cutrera A.P., Lessa E.P., Vassallo A.I., D'Anatro A., Mapelli F.J., 2013. Phylogeography and population genetic structure of the Talas tuco-tuco (*Ctenomys talarum*): integrating demographic and habitat histories. *Journal of Mammalogy*. 94, 459–476.
- Moraes E., Yotoko K., Manfrin M., Solferini V., Sene F., 2009. Phylogeography of the cactophilic species *Drosophila gouveari*: demographic events and divergence timing in dry vegetation enclaves in eastern Brazil. *Journal of Biogeography*. 36, 2136–2147.
- Morgan K., O'Loughlin S.M., Chen B., Linton Y.M., Thongwat D., Somboon P., Fong M., Butlin R., Verity R., Prakash A., Htun P., Hlaing T., Nambanya S., Socheat D., Dinh T., Walton C., 2011. Comparative phylogeography reveals a shared impact of pleistocene environmental change in shaping genetic diversity within nine *Anopheles* mosquito species across the Indo-Burma biodiversity hotspot. *Molecular Ecology*. 20, 4533–4549.
- Moritz C., Patton J.L., Schneider C.J., Smith T.B., 2000. Diversification of rainforest faunas: an integrated molecular approach. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 31, 533–563.
- Ojeda A.A., 2010. Phylogeography and genetic variation in the South American rodent *Tympanoctomys barrerae* (Rodentia: Octodontidae). *Journal of Mammalogy*. 91, 302–313.
- Ortiz-Jaureguizar E., Cladera G.A., 2006. Paleoenvironmental evolution of southern South America during the Cenozoic. *Journal of Arid Environments*. 66, 498–532.
- Phillips S.J., Anderson R.P., Schapire R.E., 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling*. 190, 231–259.
- Pinheiro F., De Barros F., Palma-Silva C., Fay M.F., Lexer C., Cozzolino S., 2011. Phylogeography and genetic differentiation along the distributional range of the orchid *Epidendrum fulgens*: a Neotropical coastal species not restricted to glacial refugia. *Journal of Biogeography*. 38, 1923–1935.
- Porto T.J., Carnaval A.C., Da Rocha P.L.B., 2013. Evaluating forest refugial models using species distribution models, model filling and inclusion: a case study with 14 Brazilian species. *Diversity and Distributions*. 19, 330–340.

- Rambaut A., Drummond A.J., 2007. Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Resende H.C., Yotoko K.S.C., Delabie J.H.C., Costa M.A., Campiolo S., Tavares M.G., Campos L.A.O., Fernandes-Salomão T.M., 2010. Pliocene and Pleistocene events shaping the genetic diversity within the central corridor of the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Journal of the Linnean Society*. 101, 949–960.
- Seal J.N., Kellner K., Trindl A., Heinze J., 2011. Phylogeography of the parthenogenic ant *Platythyrea punctata*: highly successful colonization of the West Indies by a poor disperser. *Journal of Biogeography*. 38, 868–882.
- Sérsic A.N., Cosacov A., Cocucci A.A., Johnson L.A., Pozner R., Avila L.J., Sites Jr. J.W., Morando M., 2011. Emerging phylogeographical patterns of plants and terrestrial vertebrates from Patagonia. *Biological Journal of the Linnean Society*. 103, 475–494.
- Shapiro B., Rambaut A., Drummond A.J., 2006. Choosing appropriate substitution models for the phylogenetic analysis of protein-coding sequences. *Molecular Biology and Evolution*. 23, 7–9.
- Solomon S.E., Bacci M., Martins J., Vinha G.G., Mueller U.G., 2008. Paleodistributions and comparative molecular phylogeography of leafcutter ants (*Atta* spp.) provide new insight into the origins of Amazonian diversity. *PloS one*. 3, e2738.
- Swofford D.L., 2003. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods).
- Tajima F., 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 123, 585–595.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28, 2731–2739.
- Thomé M.T.C., Zamudio K.R., Giovanelli J.G.R., Haddad C.F.B., Jr. F.A.B., Alexandrino J., 2010. Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 55, 1018–1031.
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22, 4673–4680.

- Tomazelli L., Villwock J., 2000. O Cenozóico no Rio Grande do Sul: Geologia da planície costeira., in: Holz M., De Ros L.(Eds.), Geologia do Rio Grande do Sul, pp. 375–406.
- Turchetto-Zolet A.C., Pinheiro F., Salgueiro F., Palma-Silva C., 2013. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Molecular Ecology*. 22, 1193–1213.
- Vanzolini P., Williams E., 1981. The vanishing refuge: a mechanism for ecogeographic speciation. *Papéis Avulsos de Zoologia*. 34, 251–255.
- Varela R.O., Perera T.C., 2003. Dispersal of *Schinus fasciculatus* seeds by the leaf-cutting ant *Acromyrmex striatus* in a shrubland of the dry Chaco, Argentina. *Journal of Tropical Ecology*. 19, 91–94.
- Ward P.S., Downie D.A., 2005. The ant subfamily Pseudomyrmecinae (Hymenoptera: Formicidae): phylogeny and evolution of big-eyed arboreal ants. *Systematic Entomology*. 30, 310–335.
- Wild A.L., 2007. A catalogue of the ants of Paraguay (Hymenoptera: Formicidae). *Zootaxa*. 1622, 1–55.

Tabela 1 – Espécimes de *Acromyrmex striatus* amostradas para a análise filogeográfica. Locais de amostragens, coordenadas geográficas (S = Sul, W = Oeste), número de indivíduos e haplótipos estimados a partir do gene COI seguido do número de indivíduos (n). Amostras coletadas nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina estão apresentados por RS e SC, respectivamente.

País	População	Localidades	Coordenadas		Haplótipos (n)
			S	W	
Brasil	FLOR	Moçambique (SC)	27.48	48.38	1(4)
		Joaquina (SC)	27.63	48.45	1(1)
		Pantano do Sul (SC)	27.78	48.52	1(4)
	CONT	Pinheira (SC)	27.87	48.60	1(2)
		Sonho (SC)	27.84	48.59	1(2), 12(2)
	CABO	Garopaba (SC)	27.99	48.63	1(2), 11(2), 12(1)
		Ibiraquera (SC)	28.16	48.65	1(5)
	LAGU	Laguna (SC)	28.60	48.83	1(3), 4(1), 5(1)
		Itapirubá (SC)	28.31	48.70	1(3), 9(1), 10(1)
	SOUT	Rincão (SC)	28.81	49.20	6(1), 7(1), 8(1)
		Ilhas (SC)	28.90	49.32	1(2)
		Araranguá (SC)	28.93	49.35	1(3), 2(1)
	EXTR	Arroio do Silva (SC)	29.02	49.44	1(3), 2(1), 3(1),
		Gaivota (SC)	29.18	49.60	1(2), 3(1)
	NORT	Torres (RS)	29.36	49.74	13(1), 14(1)
		Curumim (RS)	29.62	49.93	15(1)
		Xangrilá (RS)	29.82	50.04	16(2), 17(1), 18(1)
		Cidreira (RS)	30.13	50.18	15(1), 19(1)
	MOST	Mostardas (RS)	31.13	50.83	20(1), 21(2), 22(1), 23(1)
		Tavares (RS)	31.32	51.11	21(2), 23(1), 26(1), 27(1)
		São Simão (RS)	30.93	50.76	24(1), 25(1)
	RIOG	São José do Norte (RS)	32.02	52.03	28(2)
		Estreito (RS)	31.85	51.79	29(1), 30(1), 31(2)
		Cassino (RS)	32.11	52.17	32(1), 33(2), 34(1)
		Pedro Osório (RS)	32.02	52.83	47(2), 48(1), 49(1)
	INTE	Bagé (RS)	31.36	54.11	35(1), 50(2)
		Cachoeira do Sul (RS)	29.84	52.96	41(1), 44(1), 45(1)
		Caçapava do Sul (RS)	30.61	53.36	32(1), 33(2), 34(1)
		Tapes (RS)	30.65	51.56	51(1), 52(1)
	SAMA	Santa Maria	29.65	54.05	35(1), 36(1), 37(3)
		Restinga Seca (RS)	29.76	53.49	37(1), 38(1), 39(1), 40(1)
	WEST	Unistalda (RS)	29.03	55.21	35(1), 41(2), 42(1)
		Cruz Alta (RS)	28.95	53.64	41(3), 43(1)
Santiago (RS)		29.18	54.85	41(5)	
Argentina	ARGE	Santa Rosa	36.61	64.32	53(1)
		Ataliba Roca	37.05	64.28	54(2), 55(1)
		Entre Lihuel Calel	37.53	65.15	56(1)
		Winifreda	35.22	64.26	57(1), 58(1)

Tabela 2 – Diversidade genética e testes de neutralidade para cada população de *Acromyrmex striatus*. Os valores significativos são apresentados em negrito.

População	N	H	Hd	π	Testes de neutralidade			
					D de Tajima	valor- <i>p</i>	Fs de Fu	valor- <i>p</i>
FLOR	09	01	0,000 ± 0,000	0,00000 ± 0,000	0,00000	1,00000	0,00000	n.a
CONT	06	02	0,533 ± 0,172	0,00058 ± 0,000	0,85057	0,88170	0,62543	0,37000
CABO	10	03	0,511 ± 0,164	0,00137 ± 0,000	-0,39990	0,36850	0,94880	0,69820
LAGU	10	05	0,667 ± 0,163	0,00207 ± 0,001	-1,39868	0,09030	-0,70594	0,25180
SOUT	09	05	0,722 ± 0,159	0,00193 ± 0,001	-1,79752	0,01130	-1,11299	0,13920
EXTR	08	06	0,607 ± 0,164	0,00221 ± 0,001	-0,56068	0,31290	1,61176	0,81340
NORT	09	07	0,944 ± 0,070	0,01344 ± 0,004	1,72582	0,98130	0,72790	0,60250
MOST	12	08	0,894 ± 0,078	0,00251 ± 0,002	-1,75016	0,02680	-3,45722	0,00970
RIOG	14	10	0,956 ± 0,038	0,00365 ± 0,002	-0,95645	0,17710	-4,07787	0,01190
INTE	12	08	0,894 ± 0,078	0,00526 ± 0,002	-0,81319	0,22000	-1,13556	0,25360
SAMA	09	06	0,833 ± 0,127	0,00368 ± 0,001	0,10765	0,56430	-0,87706	0,24990
WEST	13	04	0,423 ± 0,164	0,00139 ± 0,001	-1,24415	0,11130	0,02744	0,47760
ARGE	07	06	0,952 ± 0,096	0,00424 ± 0,002	0,33464	0,64290	-1,64228	0,10910

N: número de amostras; H: número de haplótipos; Hd: diversidade haplotípica; π : diversidade nucleotídica; \pm : desvio padrão.

Tabela 3 – Modelos de estruturação genética. Os índices de fixação foram testados ao nível de 10.000 permutações. As populações estão agrupadas de acordo com o resultado obtido a partir da SAMOVA. As populações pertencentes a cada grupo estão representadas dentro de cada colchete.

Fonte de variação	Nível de subdivisão das populações de <i>A. striatus</i>	Índices de fixação		
		Fst	Fct	Fsc
Grupos estabelecidos pela SAMOVA	[FLOR, CABO, LAGU, SOUT, EXTR] [CONT] [NORT] [MOST] [RIOG] [INTE, SAMA, WEST] [ARGE]	0,80	0,80	0,03

Todos os valores foram significativos ($p < 0,001$).

Tabela 4 – Análise de variância molecular (AMOVA) para a espécie *Acromyrmex striatus*, realizada com três níveis hierárquicos, considerando os grupos formados pela SAMOVA.

Fonte de variação	g.l.	Porcentagem de variação
Entre grupos	6	80,28
Entre populações dentro de grupos	6	0,63
Dentro de populações	115	19,09

g.l.: graus de liberdade. Todos os valores foram significativos ($p < 0,01$).

Tabela 5 – Valores de Fst das comparações par a par entre as populações de *Acromyrmex striatus*, estimados a partir do gene mitocondrial COI. Os valores apresentados em negrito são significativos ($p < 0,05$).

	FLOR	CONT	CABO	LAGU	SOUT	EXTR	NORT	MOST	RIOG	INTE	SAMA	WEST	ARGE
FLOR	0,0000												
CONT	0,2871	0,0000											
CABO	0,1140	0,0903	0,0000										
LAGU	0,0000	0,0222	0,0134	0,0000									
SOUT	0,0318	0,0418	-0,0112	-0,0251	0,0000								
EXTR	0,0811	0,0387	0,1030	0,0165	0,0192	0,0000							
NORT	0,5808	0,5145	0,5160	0,5369	0,5370	0,5652	0,0000						
MOST	0,9023	0,8758	0,8460	0,8513	0,8473	0,8712	0,3625	0,0000					
RIOG	0,8703	0,8442	0,8244	0,8306	0,8284	0,8451	0,6427	0,8475	0,0000				
INTE	0,7765	0,7349	0,7189	0,7270	0,7264	0,7458	0,3622	0,5283	0,7930	0,0000			
SAMA	0,8790	0,8429	0,8133	0,8221	0,8177	0,8400	0,3989	0,6719	0,8301	0,1276	0,0000		
WEST	0,9376	0,9163	0,8815	0,8833	0,8769	0,8977	0,4999	0,7271	0,8702	0,0405	0,2810	0,0000	
ARGE	0,9494	0,9297	0,9128	0,9195	0,9179	0,9296	0,7090	0,9103	0,8805	0,8585	0,8872	0,9289	0,000

Tabela 6 – Estimativas em milhões de anos do tempo de divergência do ancestral comum mais recente entre os haplogrupos de *Acromyrmex striatus*. As estimativas foram baseadas sobre uma taxa de mutação para o gene mitocondrial COI de formiga (0,01455 pb por milhões de anos).

Haplogrupo	TMRCA	95% CI	ESS
Argentina	0,3016	(0,085 – 0,593)	23850
Brasil	1,5310	(0,794 – 2,583)	5769
Cassino	0,3245	(0,011 – 0,615)	18845
Litoral SC	0,3361	(0,127 – 0,611)	18370
Rio Grande do Sul	0,6644	(0,345 – 1,054)	25659
Torres	0,1578	(0,017 – 0,368)	26175
Todos	2,5913	(1,189 – 4,704)	16432

TMRCA: tempo desde o ancestral comum mais recente; CI: intervalo de confiança; ESS: tamanho efetivo da amostra.

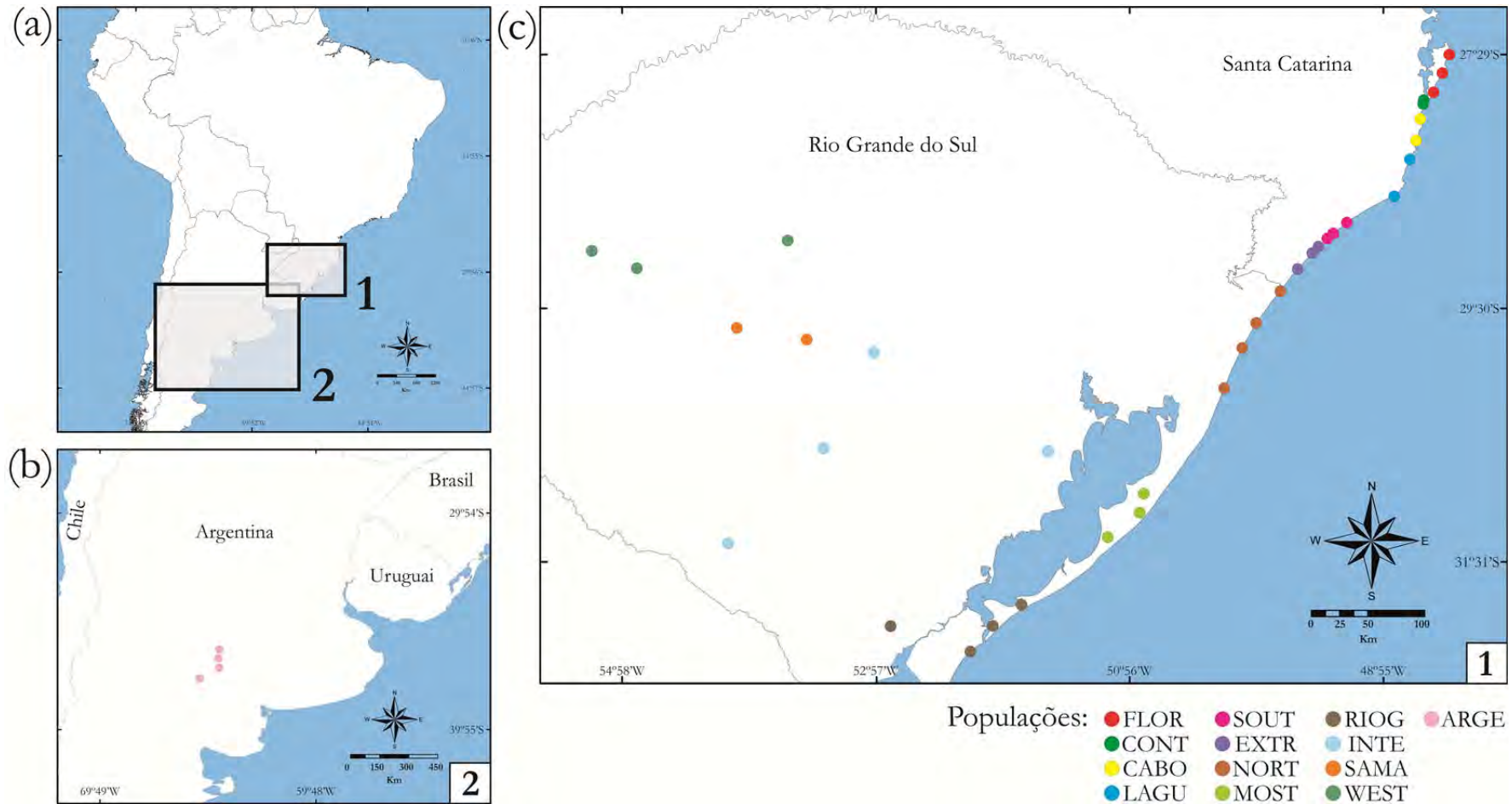


Figura 1 – Mapa da América do Sul com a distribuição geográfica das populações amostradas de *Acromyrmex striatus*. (a) Mapa do continente Sul Americano (b) população coletada na Argentina e (c) populações coletadas no Brasil. Cada local de coleta é representado por um ponto, e as cores dos pontos indicam cada população. Estas mesmas cores utilizadas para representar cada população, também foram empregadas na rede de haplótipos.

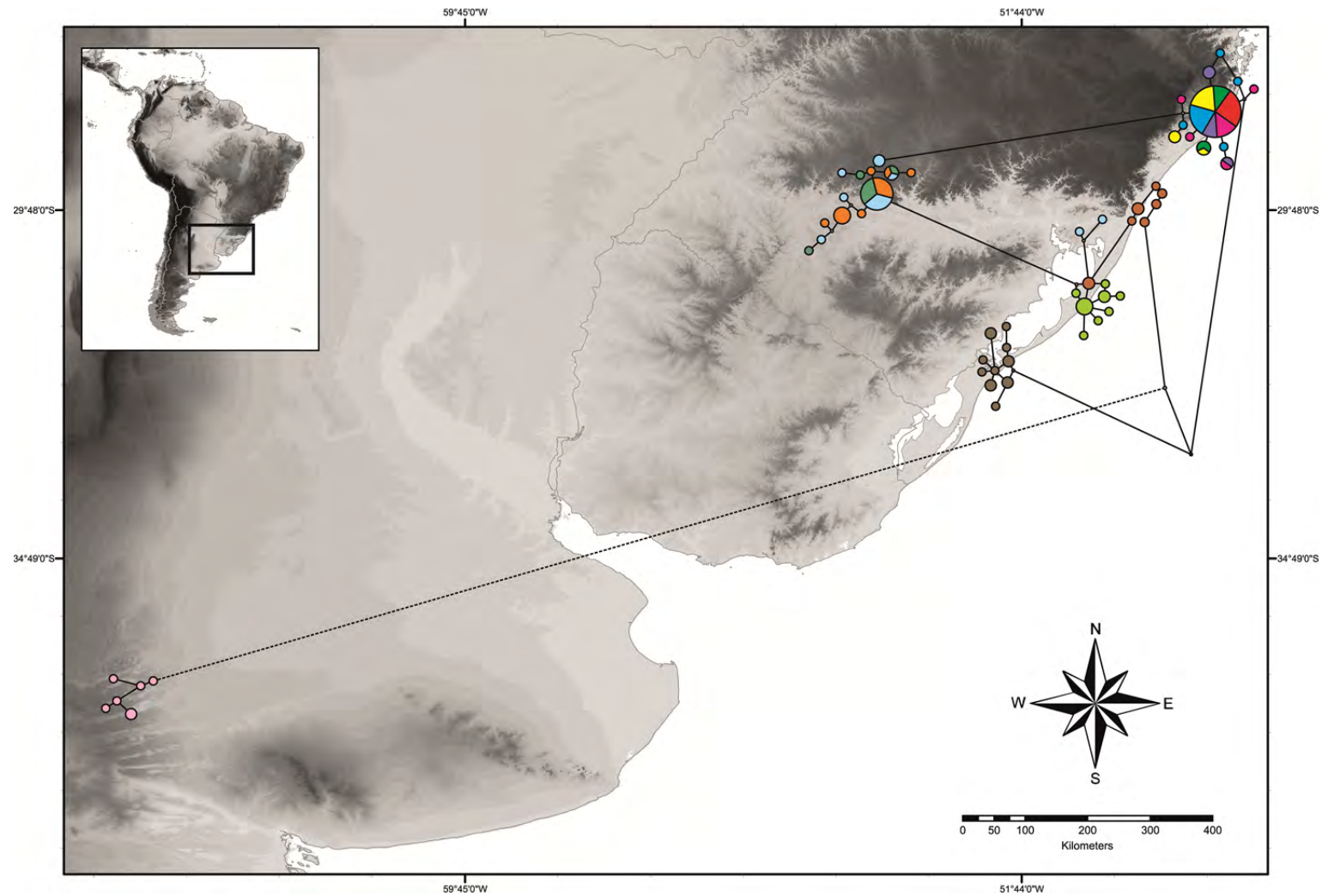


Figura 3 – Distribuição geográfica e relação genealógica de *Acromyrmex striatus*. A rede de haplótipos (Figura 2) do gene mitocondrial COI de *A. striatus* está sobreposta no mapa (Figura 1) aproximadamente nos pontos de amostragem.

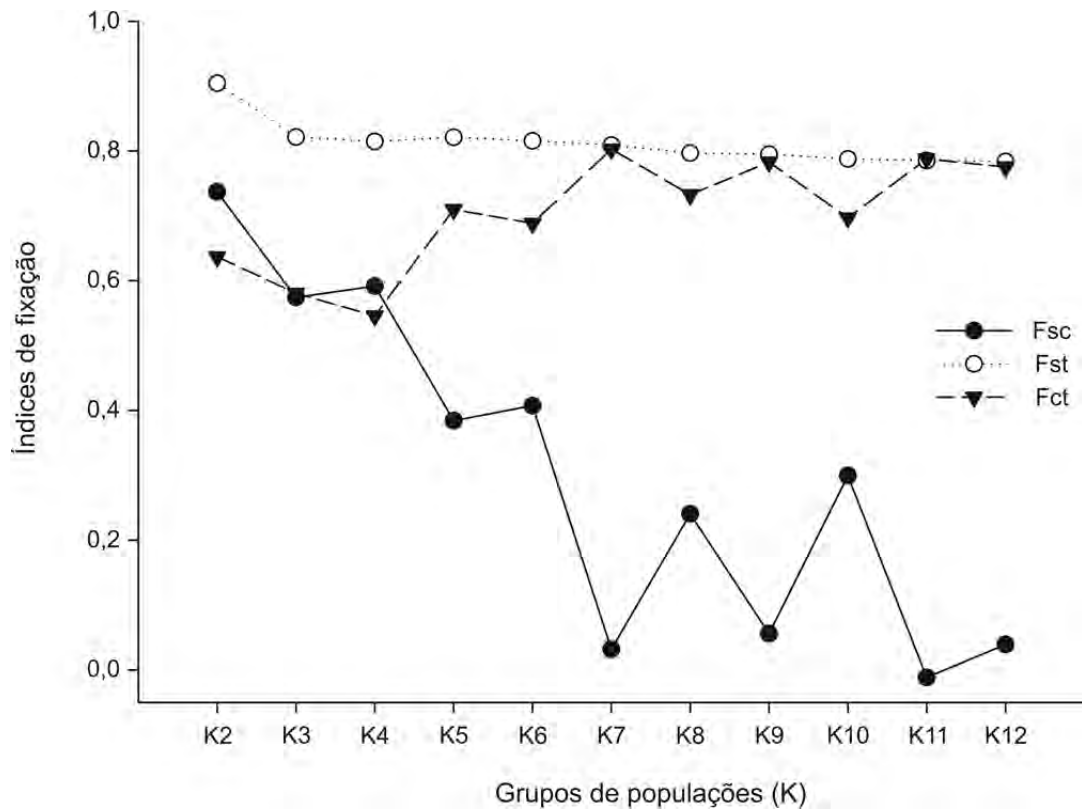


Figura 4 – Análise espacial da variância molecular (SAMOVA) das 13 populações de *Acromyrmex striatus*. Os índices de fixação foram calculados independentemente para cada grupo *K*. O maior e significativo valor do índice de fixação *Fct* para um dado valor de *K* reporta o melhor agrupamento das populações de *A. striatus*.

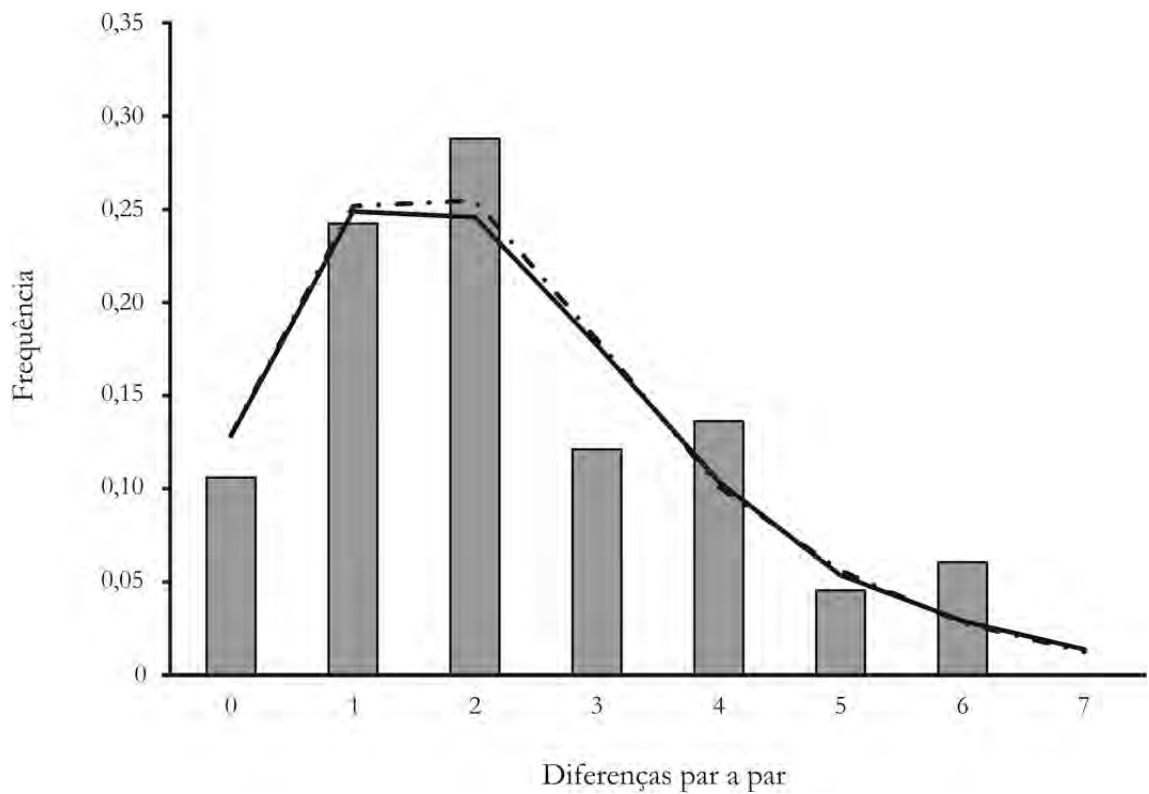


Figura 5 – *Mismatch distributions* para a população MOST de *Acromyrmex striatus*. Os histogramas representam as frequências observadas das diferenças par-a-par entre os haplótipos e as linhas representam a curva simulada para a população MOST sob o modelo de expansão demográfica (linha contínua) e expansão espacial (linha tracejada).

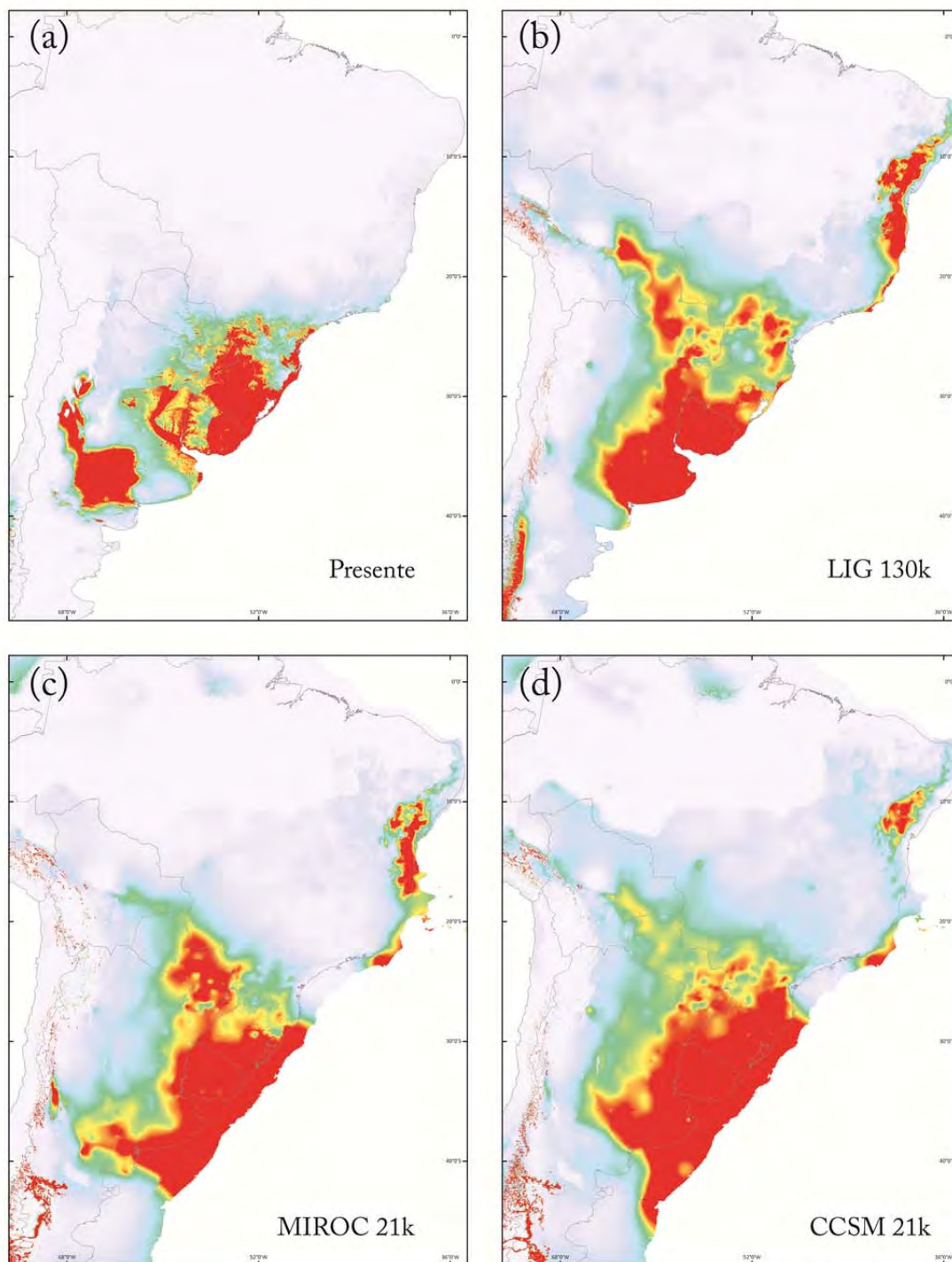


Figura 6 – Distribuição geográfica para áreas preditas climaticamente para a ocorrência de *Acromyrmex striatus* utilizando variáveis bioclimáticas atuais e do passado. (a) Distribuição potencial nas condições atuais, (b) LIG 130K: última interglaciação (130 mil anos antes do presente), (c) MIROC 21k e (d) CCSM 21k: último máximo glacial (21 mil anos antes do presente). As cores quentes (vermelho/amarelo) representam áreas com alta probabilidade de ocorrência de *A. striatus*.

Capítulo 3



Could pseudogenes be widespread in ants? Evidence of *numts* in a leafcutter ant *Acromyrmex striatus* (Roger, 1863) (Formicidae: Attini)

Abstract

The incorporation of fragments of mitochondrial DNA (mtDNA) in the nuclear genome, known as *numts* (nuclear mitochondrial pseudogenes), undermines general assumptions concerning the use of mtDNA in phylogenetic and phylogeographic studies. Accidental amplifications of these nuclear copies instead of the mitochondrial target can lead to crucial misinterpretations, thus the correct identification of *numts* and their differentiation from true mitochondrial sequences are important to prevent this kind of error. Our goal was to describe the existence of cytochrome b (*cytb*) *numts* in the leafcutter ant *Acromyrmex striatus* (Roger, 1863). PCR products were directly sequenced using a pair of universal primers designed to amplify the *cytb* gene of these insects. Other species of leafcutter ants were also sequenced. The sequences were analyzed and the *numts* were identified by the presence of double peaks, indels and premature stop codons. Only *A. striatus* clearly showed the presence of *numts*, while the other species displayed the expected amplification of the mtDNA *cytb* gene target using the same primer pair. We hope that our report will highlight the benefits and challenges of using mtDNA in molecular phylogenetic reconstruction and phylogeographic studies of ants, while establishing the importance of *numts* reports for future studies.

Introduction

Molecular biology tools have become prominent in studies of systematics and phylogenetic relationships of species. In recent decades, these tools have contributed to species delimitation and improved our knowledge concerning the evolutionary history of several taxa. DNA sequencing is the leading method selected in molecular based research and mitochondrial DNA (mtDNA) is the most widely used genetic marker for accessing molecular diversity (Galtier et al., 2009). The abundant presence of mtDNA in molecular biology studies can be explained by the peculiar properties of this genome (for review see Avise, 2009). Moreover,

nuclear markers present certain difficulties, such as multiple copies (paralogs), requiring extensive effort to identify a marker with a reasonable evolutionary rate and the identification of alleles from heterozygous individuals via cloning prior to sequencing (Hurst & Jiggins, 2005).

Despite the confirmed usefulness of mtDNA as a genetic marker, an increasing number of studies have shown that its reliability is subject to compromise (Buhay, 2009; Bertheau et al., 2011; Cristiano et al., 2012). There are several molecular processes that undermine certain general assumptions based on mtDNA unique characteristics. A frequent issue is the incorporation of mitochondrial DNA fragments into the nuclear genome, the so-called *numts* or nuclear mitochondrial pseudogenes (Lopez et al., 1994; Hazkani-Covo et al., 2010). These are nontranscribed and untranslated regions in the nuclear genome that occur due to the natural transfer of DNA from the mitochondrial to the nuclear genome during the evolutionary period (Gaziev & Shaikhaev, 2010; Hazkani-Covo et al., 2010). Due to their lack of function in the nuclear genome and the presence complex machinery to monitor and repair damaged DNA in the nucleus, *numts* evolve under molecular evolutionary processes that are distinct from the original mitochondrial copy. This could lead to erroneous interpretations and misperceptions while conducting phylogenetic, phylogeographic and population genetic studies (Bensasson et al., 2001; Buhay, 2009; Hazkani-Covo et al., 2010). Moreover, the basic underlying assumption of homology between sequences is overlooked when both nuclear and mitochondrial gene copies are used in molecular analysis.

Numts have been detected in several eukaryote taxa from plants to higher vertebrates (Bensasson et al., 2001; Hazkani-Covo et al., 2010), though the frequency and abundance of *numts* varies enormously across taxa (Richly & Leister, 2004; Hazkani-Covo et al., 2010). Mitochondrial pseudogenes is a recurrent issue in insects and a growing number of studies have reported the occurrence of *numts* in a wide range of taxa (Bensasson et al., 2000; Richly & Leister, 2004; Pamilo et al., 2007; Black IV & Bernhardt, 2009; Hazkani-Covo et al., 2010; Viljakainen et al., 2010; Cai et al., 2011), and in an increasing number of reports involving social insects (Behura, 2007; Martins et al., 2007; Pamilo et al., 2007; Cristiano et al., 2012; Ruiz et al., 2013). Despite this trend, *numts* in ants have been poorly described and likely underreported in this eusocial insect group (Beckenbach, 2009).

In the course of developing a phylogeographic and phylogenetic study of leafcutter ants (genera *Acromyrmex* and *Atta*), we encountered several difficulties while generating sequences of mtDNA. In general, primers used to amplify mtDNA for phylogenetics and phylogeographic studies in ants resulted in non-amplification by polymerase chain reaction in our selected species. During our screening for a mtDNA marker, we used CB-J-10933 and a modified TS1-N-11683 primer designated by Simon et al. (1994), in order to amplify partial sequences of cytochrome b (*cytb*) of the *Acromyrmex* and *Atta* species. In this study, we aimed to describe the inferred *numts* retrieved from *A. striatus* while studying the molecular systematics of this ant genus, considering the recent interest in mitochondrial pseudogenes and their importance in molecular evolution.

Material and Methods

DNA isolation, amplification and sequencing

Total genomic DNA was extracted by grinding an entire ant specimen using a modified phenol-chloroform protocol (Fernandes-Salomão et al., 2005). DNA was extracted from the following ants: *Acromyrmex striatus* (Roger, 1863), *Acromyrmex balzanii* (Emery, 1890), *Atta colombica* Guérin-Méneville 1844, *Atta laevigata* (Smith, 1858), *Atta robusta* Borgmeier 1939, and *Atta sexdens rubropilosa* Forel 1908 (Table 1). Specific permission (SISBio26441-1) for collections was authorized by the Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation (*Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade*, ICMBio). *A. colombica* was kindly provided by Dr. Anayansi Valderrama. In order to improve the amplification conditions, we modified two base pairs from the original TS1-N-11683 primer designed by Simon et al. (1994), relying on *Solenopsis invicta* complete mitochondrial genome (Wurm et al., 2011) (Figure 1). This modified primer was used in combination with the CB-J-10933 primer to amplify partial fragments of the mitochondrial gene cytochrome b (*cytb*) (Figure 1). Amplification was performed in a total volume of 25µL using the following components: 1X Master mix GoTaq® Hot Start Colorless (12.5µl), 0.4µM of each primer (1µL), 0.5µL of DNA (approximately 50ng). The PCR reaction was performed with an initial denaturation step at 94°C for 2 min, followed by 35 cycles of 1 min at 94°C to achieve denaturation, 1 min at 49°C for annealing, 1

min 15 s at 72°C for extension, and a final extension step at 72°C for 5 min. The amplicons were purified and directly sequenced in both directions (forward and reverse) with the same primers used during PCR amplification (Macrogen Inc., South Korea; www.macrogen.com).

DNA sequence analyses and comparisons

With the purpose of searching for ambiguities among the sequences (quality, noise and double peaks), the chromatograms were inspected visually using the Consed program (Gordon et al., 1998). Double peaks can be attributed to polymorphic sequences due to heterozygous nucleotide sites in nuclear sequences, while regarding mtDNA haplotypes, double peaks represent the amplification of distinct genomes, either between mitochondria (heteroplasmy) or *numts* (nuclear genome vs. organelle genome) (Song et al., 2008). We classified sequences as polymorphic when at least one double peak was observed, as described by Miraldo et al. (2012). Further, the analyzed chromatograms of the two DNA strands (forward and reverse) were assembled and exported from Consed. The edited sequences were aligned using the ClustalW algorithm (Thompson et al., 1994) in MEGA5 (Tamura et al., 2011). The sequences were translated into amino acids to perform additional searches for stop codons, indels and comparison with other sequences, as suggested by Cristiano et al (2012).

Based on the alignment of sequences obtained from *Acromyrmex* and *Atta* species, we examined these for sites that could highlight differences between species and *numts*. We compared the partial mitochondrial *cytb* sequences observed in this study with the *Solenopsis invicta cytb* gene (GenBank access number NC014672), obtained from its complete mitochondrial genome, and the partial *cytb* sequence of *Myrmica rubra* (GenBank access number JF779626), obtained using a similar primer set (Leppänen et al., 2011). *Numts* should display premature stop codons within their putative amino acid sequences and indels that do not follow differences among the sequences by multiples of three base pairs.

Results

Sequences amplified with the CB-J-10933 and TS1-N-11683-modified primers produced good sequence reads for all species, ranging from 630 to 642 base

pairs. During the examination of the chromatograms in *A. striatus*, the amplified region resulted in well-defined sequence reads, although a few nucleotide sites with poor Phred quality (<20) were observed at the same location in both the forward and reverse sequences. At these sites, double peaks were clearly observed in both directions (Figure 2). These results were not observed in any other leafcutter ant species analyzed in this work, which seems to suggest the co-amplification of DNA fragments of a similar size in *A. striatus*.

Comparisons between the sequences obtained here with the complete *cytb* gene of *S. invicta* showed that we amplified the final portion of the gene, as expected. During the translation into amino acids, we observed that *A. striatus* sequences did not show the same reading frame as the other leafcutter species in relation to *S. invicta*. Besides this discrepancy, in order to achieve the reading frame, the clustalW algorithm used to determine nucleotide alignment inserted innumerable indels across the *A. striatus* sequences that were not multiples of three base pairs. Where the *cytb* sequence of *A. striatus* was shorter than the other species, we observed six premature stop codons (Figure 3). Based on these findings, we assumed that the *cytb* sequences from *A. striatus* were *numts*. No evidence of *numts* was observed in any of the other leafcutter ant sequences analyzed herein. Thus, the sequences from the other leafcutter ants were likely amplified from the mtDNA target.

We also observed that there were three recurrent *numts* in *A. striatus* that varied in length (Figure 3). The first *numts* (*A. striatus* 01, *A. striatus* 142, *A. striatus* 162, *A. striatus* 169, *A. striatus* 171, *A. striatus* 183, *A. striatus* 187 and *A. striatus* 237) showed similar length compared to the other ants, while the second *numt* (*A. striatus* 163, *A. striatus* 225, *A. striatus* 258, *A. striatus* 269) showed a deletion of 12 base pairs and the third (*A. striatus* 294, *A. striatus* 334) showed a deletion of eight base pairs.

Concerning the *cytb* sequences of the other leafcutter ants, all four species of *Atta* displayed insertions of two amino acids (six nucleotides) at position 904 compared with the *S. invicta cytb* gene. In addition, *A. balzani* showed one amino acid insertion (three nucleotides) at the same position. The six-nucleotide insertion patterns of the *Atta* species was also observed among *A. striatus numts* (Figure 3). Despite the insertion of two amino acids in all the *Atta* species, the length of the mtDNA sequences of these species seemed to present very similar overall sizes. This is because *A. colombica* showed one amino acid less (three nucleotides) and the

other *Atta* species showed three amino acids less (nine nucleotides) precisely at the end of the gene (Figure 3).

Discussion

High quality sequences were obtained from the primers used to amplify the *cytb* gene in this study; however, co-amplification was suggested by apparent polymorphism in the chromatograms that showed innumerable double peaks in recurrent nucleotide positions. These polymorphisms, the high quality sequence reads and amplifications from different individuals sampled at distinct sites indicated that *A. striatus* presents multiple copies of the *cytb* gene. Typically, it is expected that individuals harbor a unique copy of mtDNA due to uniparental inheritance (homoplasmy). However, it is currently known that exceptions to this general rule can occur through several processes, such as bi-parental inheritance, mitochondrial genome mutation within organisms and mitochondrial genome recombination (White et al., 2008), resulting in multiple copies within an organism (heteroplasmy). However, the heteroplasmic signal detected in *A. striatus* (double peaks) is not likely due to true heteroplasmy because in the same fragment reading frame shift and various premature stop codons were observed.

Besides premature stop codons, indels were also observed in *A. striatus numts*, as previously reported to other *numts* in Hymenoptera (Cristiano et al., 2012). The deletions were located in two distinct regions in the *numts* of *A. striatus*. These deletions were flanked by AT-rich regions, which are frequently associated with polymerase slippage during DNA replication (Lovett, 2004). An AT-rich base pair was also described flanking indels in *numts* of other social species *Melipona colimana* and *Melipona fasciata* (Ruiz et al., 2013).

All the *A. striatus numts* were invariable, except at a polymorphic double peak site. In contrast to mtDNA, *numts* are presumed to present lower mutation rates of sequence evolution. It has been thought that once the fragments of mtDNA are integrated into the nucleus, they diverge from the selective constraints imposed in the mitochondrial genome and are under no pressure, given their lack of function in the nucleus (Bensasson et al., 2001). Consequently, they can preserve close homology with the original mtDNA gene and for this reason are considered to be “fossil copies” of an ancient mitochondrial lineage (Perna & Kocher, 1996; Zhang

& Hewitt, 1996; Bensasson et al., 2001). These *numts* characteristics could have important consequences when primers are flanking regions that are better preserved in *numts* than in the actual mtDNA target that should be preferentially amplified. This problem is likely to be maximized by the use of so-called universal primers that target a large number of taxa and that are designed relying on highly cross-preserved regions of the genome (Folmer et al., 1994; Simon et al., 2006). Although universal primers are supposedly more prone to amplify *numts* (Bensasson et al., 2001), primers designed to be restricted to a genus or specific to a species also amplified *numts* (Calvignac et al., 2011; Cristiano et al., 2012; Wolff et al., 2012).

Numts have become an issue in molecular biology based studies in the past two decades (Zhang & Hewitt, 1996; Bertheau et al., 2011), and there are a growing number of studies reporting the occurrence of *numts* in insects (Bensasson et al., 2000; Pamilo et al., 2007; Behura et al., 2011; Bertheau et al., 2011; Berthier et al., 2011; Cristiano et al., 2012; Ruiz et al., 2013). It seems to be relevant for social insects, in which *numts* appear to comprise a significant fraction of their nuclear genome. Among metazoans, the eusocial bee *Apis mellifera* displayed the highest density of mitochondrial copies in its nuclear genome. It has been suggested that this high level of *numts* abundance is related to a high recombination rate and low effective population size (Pamilo et al., 2007). Sirvö et al. (2006) inferred that the species *Acromyrmex echinator* has a high recombination rate, thus whether or not this is linked to *numts* dispersal, a high density of *numts* would be expected in ants. Studies reporting the occurrence of *numts* in ants are rare; however this low frequency of *numts* is likely underestimated.

We found only one study that specifically investigated *numts* in ants (Martins et al., 2007). The authors identified and described two *numts* from the leafcutter ant *Atta cephalotes*, on the cytochrome oxidase I (COI) gene. Both *numts* showed a low mutation rate likewise the *numts* reported here. However *Atta cephalotes numts* showed no typical evidence of *numts* sequences, such as double peaks, indels, frameshift and premature stop codons (Martins et al., 2007). Further evidence of *numts* in ants was reported by Kronauer et al., (2007), who suggested the occurrence of COI *numts* and COII in the genus *Dorylus*, because of various frameshift changes. All these putative *numts* showed low mutation rates and identical sequences across the species analyzed. These findings and the evidence reported here indicate that *numts* in ants

have been overlooked. The study of ants involves substantial use of molecular techniques and it is possible that *numts*, which are not always easily identifiable (Bertheau et al., 2011; Berthier et al., 2011), could be responsible for some of the results reported in molecular phylogeny, population genetics and evolution of this group.

Here, we reported for the first time the occurrence of *numts* in the genus *Acromyrmex*. We believe it is worth emphasizing that the only other *numts* reported were observed in an ant from the same tribe (Attini) as *A. striatus*. It is our hope that this report will highlight the benefits and challenges of using mtDNA in molecular phylogenetic reconstruction and phylogeographic studies of ants, while establishing the importance of *numts* reports in the planning and management of future studies.

Acknowledgements

We thank Anayansi Valderrama for kindly provide samples of *Atta colombica*. MPC acknowledges FAPEMIG for doctoral fellowship. Funding for this project was provided by grant from FAPEMIG (Process number: CRA-APQ-00935-11).

References

- Avise J.C., 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*. 36, 3–15.
- Beckenbach A.T., 2009. Numts and mitochondrial pseudogenes. *Myrmecological News*. 12, 217–218.
- Behura S.K., Lobo N.F., Haas B., DeBruyn B., Lovin D.D., Shumway M.F., Puiu D., Romero-Severson J., Nene V., Severson D.W., 2011. Complete sequences of mitochondria genomes of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* and comparative analysis of mitochondrial DNA fragments inserted in the nuclear genomes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 41, 770–777.
- Behura S.K., 2007. Analysis of Nuclear Copies of mitochondrial sequences in honeybee (*Apis mellifera*) genome. *Molecular Biology and Evolution*. 24, 1492–1505.
- Bensasson D., Zhang D.-X., Hartl D.L., Hewitt G.M., 2001. Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. *Trends in Ecology & Evolution*. 16, 314–321.

- Bensasson D., Zhang D.X., Hewitt G.M., 2000. Frequent assimilation of mitochondrial DNA by grasshopper nuclear genomes. *Molecular Biology and Evolution*. 17, 406–415.
- Bertheau C., Schuler H., Krumböck S., Arthofer W., Stauffer C., 2011. Hit or miss in phylogeographic analyses: the case of the cryptic NUMTs. *Molecular Ecology Resources*. 11, 1056–1059.
- Berthier K., Chapuis M.P., Moosavi S.M., Tohidi-Esfahani D., Sword G.A., 2011. Nuclear insertions and heteroplasmy of mitochondrial DNA as two sources of intra-individual genomic variation in grasshoppers. *Systematic Entomology*. 36, 285–299.
- Black IV W.C., Bernhardt S.A., 2009. Abundant nuclear copies of mitochondrial origin (NUMTs) in the *Aedes aegypti* genome. *Insect Molecular Biology*. 18, 705–713.
- Buhay J.E., 2009. “COI-like” Sequences are becoming problematic in molecular systematic and DNA barcoding studies. *Journal of Crustacean Biology*. 29, 96–110.
- Cai Y., Cheng X.Y., Duan D., Xu R., 2011. Mitochondrial COI gene transfers to the nuclear genome of *Dendroctonus valens* and its implications. *Journal of Applied Entomology*. 135, 302–310.
- Calvignac S., Konecny L., Malard F., Douady C.J., 2011. Preventing the pollution of mitochondrial datasets with nuclear mitochondrial paralogs (numts). *Mitochondrion*. 11, 246–254.
- Cristiano M., Fernandes-Salomão T., Yotoko K.C., 2012. Nuclear mitochondrial DNA: an Achilles’ heel of molecular systematics, phylogenetics, and phylogeographic studies of stingless bees. *Apidologie*. 43, 527–538.
- Fernandes-Salomão T.M., Rocha R.B., Campos L.A.O., Araújo E.F., 2005. The first internal transcribed spacer (ITS-1) of *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): characterization and phylogenetic analysis. *Insectes Sociaux*. 52, 11–18.
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 3, 294–299.
- Galtier N., Nabholz B., Glémin S., Hurst G.D.D., 2009. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology*. 18, 4541–4550.
- Gaziev A.I., Shaikhaev G.O., 2010. Nuclear mitochondrial pseudogenes. *Molecular Biology*. 44, 358–368.

- Gordon D., Abajian C., Green P., 1998. Consed: A graphical tool for sequence finishing. *Genome Research*. 8, 195–202.
- Hazkani-Covo E., Zeller R.M., Martin W., 2010. Molecular poltergeists: mitochondrial DNA copies (numts) in sequenced nuclear genomes. *PLoS Genetics*. 6, e1000834.
- Hurst G.D.D., Jiggins F.M., 2005. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 272, 1525–1534.
- Kronauer D.J., Schöning C., Vilhelmsen L.B., Boomsma J.J., 2007. A molecular phylogeny of *Dorylus* army ants provides evidence for multiple evolutionary transitions in foraging niche. *BMC Evolutionary Biology*. 7, 56.
- Leppänen J., Vepsäläinen K., Savolainen R., 2011. Phylogeography of the ant *Myrmica rubra* and its inquiline social parasite. *Ecology and Evolution*. 1, 46–62.
- Lopez J. V., Yuhki N., Masuda R., Modi W., O'Brien S.J., 1994. Numt, a recent transfer and tandem amplification of mitochondrial DNA to the nuclear genome of the domestic cat. *Journal of Molecular Evolution*. 39, 174–190.
- Lovett S.T., 2004. Encoded errors: mutations and rearrangements mediated by misalignment at repetitive DNA sequences. *Molecular Microbiology*. 52, 1243–1253.
- Martins J., Solomon S.E., Mikheyev A.S., Mueller U.G., Ortiz A., Bacci M., 2007. Nuclear mitochondrial-like sequences in ants: evidence from *Atta cephalotes* (Formicidae: Attini). *Insect Molecular Biology*. 16, 777–784.
- Miraldo A., Hewitt G.M., Dear P.H., Paulo O.S., Emerson B.C., 2012. Numts help to reconstruct the demographic history of the ocellated lizard (*Lacerta lepida*) in a secondary contact zone. *Molecular Ecology*. 21, 1005–1018.
- Pamilo P., Viljakainen L., Vihavainen A., 2007. Exceptionally high density of NUMTs in the honeybee genome. *Molecular Biology and Evolution*. 24, 1340–1346.
- Perna N.T., Kocher T.D., 1996. Mitochondrial DNA: Molecular fossils in the nucleus. *Current Biology*. 6, 128–129.
- Richly E., Leister D., 2004. NUMTs in Sequenced Eukaryotic Genomes. *Molecular Biology and Evolution*. 21, 1081–1084.
- Ruiz C., J. May-Itzá W., Quezada-Euán J.J.G., De la Rúa P., 2013. Presence of nuclear copies of mitochondrial origin (NUMTs) in two related species of stingless bee genus *Melipona* (Hymenoptera: Meliponini). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. 51, 107–113.

- Simon C., Buckley T.R., Frati F., Stewart J.B., Beckenbach A.T., 2006. Incorporating molecular evolution into phylogenetic analysis, and a new compilation of conserved polymerase chain reaction primers for animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 37, 545–579.
- Simon C., Frati F., Beckenbach A., Crespi B., Liu H., Flook P., 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*. 87, 651–701.
- Sirviö A., Gadau J., Rueppell O., Lamatsch D., Boomsma J.J., Pamilo P., Page R.E., 2006. High recombination frequency creates genotypic diversity in colonies of the leaf-cutting ant *Acromyrmex echinator*. *Journal of Evolutionary Biology*. 19, 1475–1485.
- Song H., Buhay J.E., Whiting M.F., Crandall K.A., 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*. 105, 13486–13491.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S., 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28, 2731 - 2739.
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22, 4673–4680.
- Viljakainen L., Oliveira D.C.S.G., Werren J.H., Behura S.K., 2010. Transfers of mitochondrial DNA to the nuclear genome in the wasp *Nasonia vitripennis*. *Insect Molecular Biology*. 19, 27–35.
- White D.J., Wolff J.N., Pierson M., Gemmell N.J., 2008. Revealing the hidden complexities of mtDNA inheritance. *Molecular Ecology*. 17, 4925-4942.
- Wolff J.N., Shearman D.C.A., Brooks R.C., Ballard J.W.O., 2012. Selective enrichment and sequencing of whole mitochondrial genomes in the presence of nuclear encoded mitochondrial pseudogenes (Numts). *PLoS ONE*. 7, e37142.
- Wurm Y., Wang J., Riba-Grognuz O., Corona M., Nygaard S., Hunt B.G., Ingram K.K., Falquet L., Nipitwattanaphon M., Gotzek D., Dijkstra M.B., Oettler J., Comtesse F., Shih C.-J., Wu W.J., Yang C.C., Thomas J., Beaudoin E., Pradervand S., Flegel V., Cook E.D., Fabbretti R., Stockinger H., Long L., Farmerie W.G., Oakey J., Boomsma J.J., Pamilo P., Yi S. V., Heinze J., Goodisman M.A.D., Farinelli L., Harshman K., Hulo N., Cerutti L., Xenarios I., Shoemaker D., Keller L., 2011. The genome of the fire ant *Solenopsis invicta*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108, 5679 - 5684.

Zhang D.X., Hewitt G.M., 1996. Highly conserved nuclear copies of the mitochondrial control region in the desert locust *Schistocerca gregaria*: some implications for population studies. *Molecular Ecology*. 5, 295–300.

Table 1 – Sampling sites, species, coordinates of the *numts* and *cytb* gene sequences.

Specimens	Localities	Coordinates	
		Latitude	Longitude
<i>Numts</i>			
<i>A. striatus</i> 01	Araranguá, SC – Brazil	28°57'11.3"S	49° 22' 29.6"W
<i>A. striatus</i> 142	Garopaba, SC - Brazil	27°59'42.4"S	48° 37' 55.5"W
<i>A. striatus</i> 162	Pinheira, SC – Brazil	27°52'31.3"S	48° 36' 02.4"W
<i>A. striatus</i> 163	Pinheira, SC – Brazil	27°52'27.2"S	48° 36' 03.4"W
<i>A. striatus</i> 169	Sonho, SC – Brazil	27°50'24.0"S	48° 35' 15.6"W
<i>A. striatus</i> 171	Sonho, SC – Brazil	27°50'19.9"S	48° 35'15.8"W
<i>A. striatus</i> 183	Joaquina, SC – Brazil	27°37'53.0"S	48°27'08.1"W
<i>A. striatus</i> 187	Joaquina, SC – Brazil	27°38'10.3"S	48°27'23.9"W
<i>A. striatus</i> 225	Quintão, RS – Brazil	30°23'34.9"S	50°17'57.3"W
<i>A. striatus</i> 237	Mostardas, RS – Brazil	31°06'37.2"S	50°52'12.4"W
<i>A. striatus</i> 258	São José do Norte, RS – Brazil	32°01'33.9"S	52°01'57.6"W
<i>A. striatus</i> 269	Cassino, RS – Brazil	32°13'19.8"S	52°12'03.4"W
<i>A. striatus</i> 294	Santiago, RS – Brazil	29°10'48.4"S	54°50'59.3"W
<i>A. striatus</i> 334	Tapes, RS – Brazil	30°39'08.6"S	51°33'54.1"W
<i>mtDNA</i>			
<i>A. balzani</i>	Araranguá, SC – Brazil	29°00'54.2"S	49°26'24.6"W
<i>A. colombica</i>	Gamboá – Panama	9°7'6.75"N	79°41'54.24"W
<i>A. laevigata</i>	Viçosa, MG – Brazil	20°45'14.0"S	42°52'55.0"W
<i>A. robusta</i>	São Francisco de Itabapoana, RJ – Brazil	21°27'00.0"S	41°02'01.0"W
<i>A. sexdens rubropilosa</i>	Viçosa, MG – Brazil	20°45'14.0"S	42°52'55.0"W

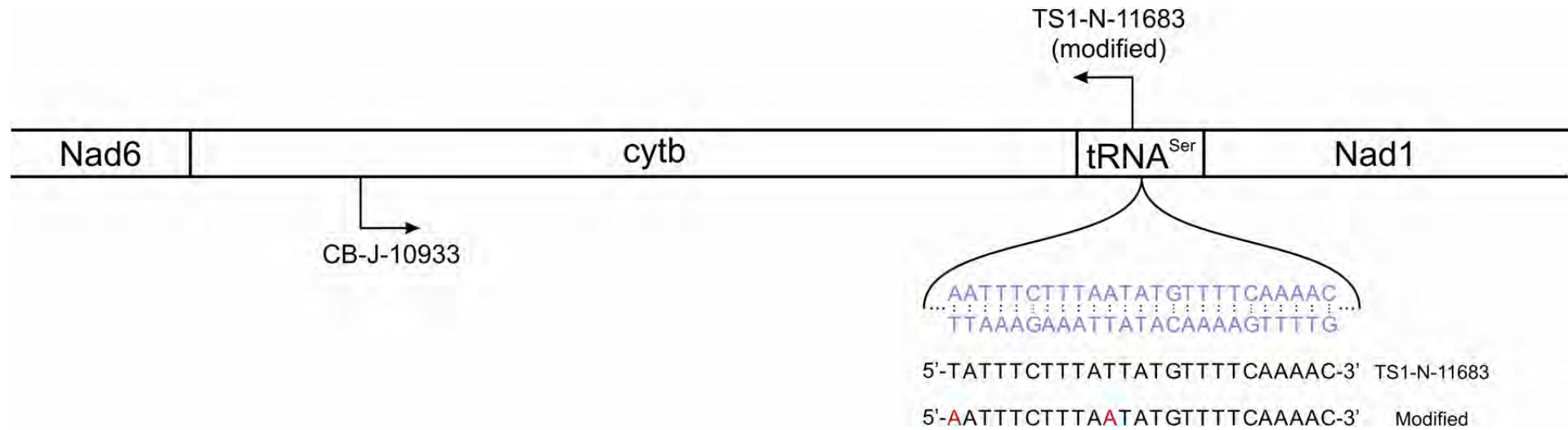


Figure 1 – Representation of the primers position for partial amplification of the cytochrome B gene (*cytb*). The arrows illustrate the direction of amplification of each primer. The detail is shown in the sequence of the tRNA^{Ser} based on the *Solenopsis invicta* genome (blue sequence), the original sequence primer (TS1-N-11683) and two adenines (red letters) modified from the primer (Modified).

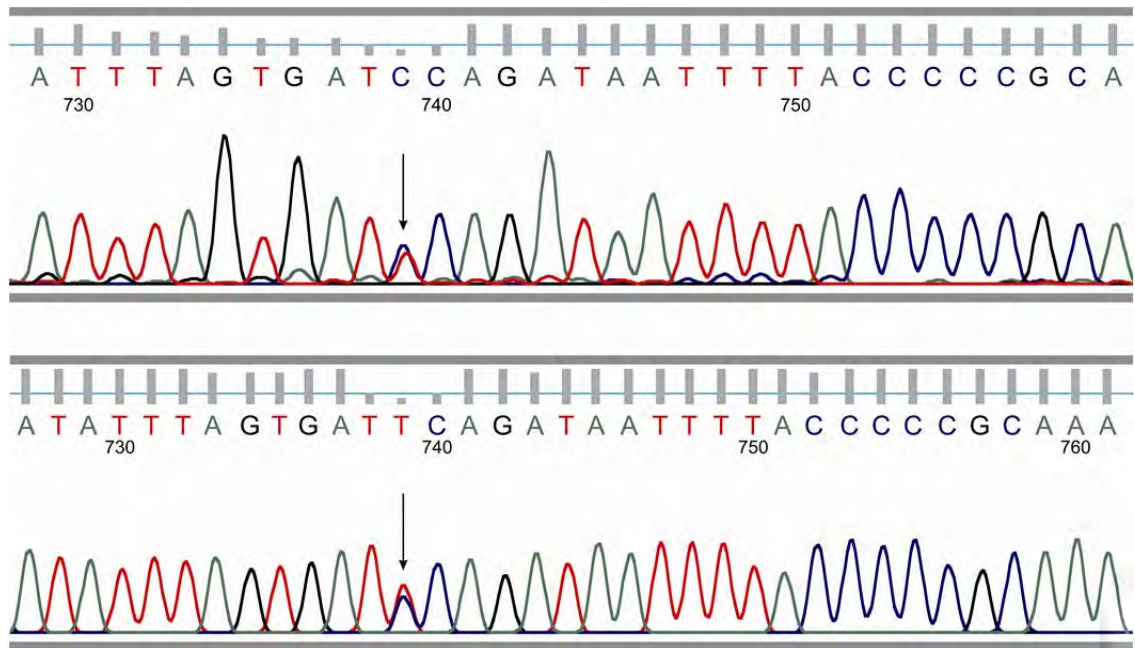


Figure 2 – Chromatograms resulting from sequencing using the primer CB-J-10933 (above) and TS1-N-11683-modified (below) from *Acromyrmex striatus* (Genbank access – AS142). The primer TS1-N-11683-modified was visualized in reverse complement. The arrows show a double peak in the two primers used for sequencing these fragments, revealing co-amplification.

	490	500	510	520	530	540	550	560
<i>Solenopsis invicta</i>	TCAATTAATAACGCAACTCTTAACCGATT	TTTTCTCTTTTCACCTTTATCTACCA	TATTATATCCTATTTATAGTAATT					
<i>Myrmica rubra</i>T..T..CT.A..T.....T.....T..C..T..T..T..C.....TT..A.A.....							
<i>Ac. balzani</i>TT.T..T.A..T.....T..C..C.....C.....C.....TA.T..AT.TA.T..A							
<i>A. colombica</i>C.....T..T..C..A..T.....C.....C..T.....TA.G.....TT..A.AT.TA.T..A							
<i>A. laevigatta</i>T.....TT.T..T.A..T.....T.....C.....T..C.....T..A.AT.TA.T...							
<i>A. robusta</i>T..T..A..C..T.....C.....C..T.....C..C.....TT..C.AT.TA.T...							
<i>A. rubropilosa</i>TT.T..A.....C..T.....C.....T..C.....T..C.AT.CA.T...							
<i>Ac. striatus 01</i>TT.....A..T.....T.....C..T.....TT.....T..C..AT.TA.CC.C							
<i>Ac. striatus 142</i>TT.....A..T.....T.....C..T.....TT.....T..C..AT.TA.CC.C							
<i>Ac. striatus 162PIN</i>TT.....A..T.....T.....C..T.....TT.....T..C..AT.TA.CC.C							
<i>Ac. striatus 169SON</i>TT.....A..T.....T.....C..T.....TT.....T..C..AT.TA.CC.C							
<i>Ac. striatus 171SON</i>TT.....A..T.....T.....C..T.....TT.....T..C..AT.TA.CC.C							
<i>Ac. striatus 183JOA</i>TT.....A..T.....T.....C..T.....TT.....T..C..AT.TA.CC.C							
<i>Ac. striatus 187JOA</i>TT.....A..T.....T.....C..T.....TT.....T..C..AT.TA.CC.C							
<i>Ac. striatus 237MOS</i>TT.....A..T.....T.....C..T.....TT.....T..C..AT.TA.CC.C							
<i>Ac. striatus 163PIN</i>TT.....A..T.....T.....C..T.....TT.....T..C..AT.TA.CC.C							
<i>Ac. striatus 225QUI</i>TT.....A..T.....T.....C..T.....TT.....T..C..AT.TA.CC.C							
<i>Ac. striatus 258SUN</i>TT.....A..T.....T.....C..T.....TT.....T..C..AT.TA.CC.C							
<i>Ac. striatus 269SUN</i>TT.....A..T.....T.....C..T.....TT.....T..C..AT.TA.CC.C							
<i>Ac. striatus 294SAT</i>TT.....A..T.....T.....C..T.....TT.....T..C..AT.TA.CC.C							
<i>Ac. striatus 334TAP</i>TT.....A..T.....T.....C..T.....TT.....T..C..AT.TA.CC.C							

	570	580	590	600	610	620	630	640
<i>Solenopsis invicta</i>	ATACATCTTTTTTTCTACACGAAACTGGATCCTCTAACCCCTAGGAACTAATAGAAATTTATATAAAATCCCATTT							
<i>Myrmica rubra</i>A..CT...TC.T.A.....A.TA..T.....C.....A..C.....C.TA.....C.A..C..C							
<i>Ac. balzani</i>T.A.....T.....A.T..A.....T..A..T..AC.....TA.....TG..C.....C..C							
<i>A. colombica</i>T..CT.A.....T.....TTT..A..T..T..A..T..AACT...TTA.....C.....C							
<i>A. laevigatta</i>	C.C...T.A.....T.....CTT..A.....AC...TTA..C.....C.T.....T..T..C							
<i>A. robusta</i>	C.T...T.A.....T.....CTT..A.....TACC...TTA.....C.T.....C							
<i>A. rubropilosa</i>	C.T...T.A.....T..CTT..A.....TACC...TTA..C.....C.T.....C							
<i>Ac. striatus 01</i>T..CT.A.....TCC..A.....A..T..TA.....TA.....TG.....							
<i>Ac. striatus 142</i>T..CT.A.....TCC..A.....A..T..TA.....TA.....TG.....							
<i>Ac. striatus 162PIN</i>T..CT.A.....TCC..A.....A..T..TA.....TA.....TG.....							
<i>Ac. striatus 169SON</i>T..CT.A.....TCC..A.....A..T..TA.....TA.....TG.....							
<i>Ac. striatus 171SON</i>T..CT.A.....TCC..A.....A..T..TA.....TA.....TG.....							
<i>Ac. striatus 183JOA</i>T..CT.A.....TCC..A.....A..T..TA.....TA.....TG.....							
<i>Ac. striatus 187JOA</i>T..CT.A.....TCC..A.....A..T..TA.....TA.....TG.....							
<i>Ac. striatus 237MOS</i>T..CT.A.....TCC..A.....A..T..TA.....TA.....TG.....							
<i>Ac. striatus 163PIN</i>T..CT.A.....TCC..A.....A..T..TA.....TA.....TG.....							
<i>Ac. striatus 225QUI</i>T..CT.A.....TCC..A.....A..T..TA.....TA.....TG.....							
<i>Ac. striatus 258SUN</i>T..CT.A.....TCC..A.....A..T..TA.....TA.....TG.....							
<i>Ac. striatus 269SUN</i>T..CT.A.....TCC..A.....A..T..TA.....TA.....TG.....							
<i>Ac. striatus 294SAT</i>T..CT.A.....TCC..A.....A..T..TA.....TA.....TG.....							
<i>Ac. striatus 334TAP</i>T..CT.A.....TCC..A.....A..T..TA.....TA.....TG.....							

	650	660	670	680	690	700	710	720
<i>Solenopsis invicta</i>	CATATTTACTTCTCCTTTAAAGATCTTTTAGGATTTATTATATATCTTATTATTTTACACTTATTATCTTACAATAC							
<i>Myrmica rubra</i>T..T..T.....T.A.....T.....T..T..AT.....T..A.....AC.T.....T							
<i>Ac. balzani</i>CCA..T..TA.T.....A.....CTC...TAT..ACC...T.A.....T.....A.T							
<i>A. colombica</i>CCA..T..TA.T..C.....T.A.....T..C.A.....AT.T.AC..C...CCT.A.C.....TC.C.....T							
<i>A. laevigatta</i>CCCA..T..A.T.....G..CT.A.....ACC.TATAT.AT.CC.A..CCTTA.....TC.T.....C.T							
<i>A. robusta</i>CCC..T..TA.T.....CT.A.....T..C..CC..ATAT.AT.AT.....TTTA.....TC.T.....T							
<i>A. rubropilosa</i>CCCA..T..TA.....T.GC.....CT.TATAT.AC.AC.....TTTA.....TC.T.....T							
<i>Ac. striatus 01</i>CCC..T..TA.....A.....T.....CTCA..CAT.A.....AC.C.C.TTA.....T..T.....T							
<i>Ac. striatus 142</i>CCC..T..TA.....A.....T.....CTCA..CAT.A.....AC.C.C.TTA.....T..T.....T							
<i>Ac. striatus 162PIN</i>CCC..T..TA.....A.....T.....CTCA..CAT.A.....AC.C.C.TTA.....T..T.....T							
<i>Ac. striatus 169SON</i>CCC..T..TA.....A.....T.....CTCA..CAT.A.....AC.C.C.TTA.....T..T.....T							
<i>Ac. striatus 171SON</i>CCC..T..TA.....A.....T.....CTCA..CAT.A.....AC.C.C.TTA.....T..T.....T							
<i>Ac. striatus 183JOA</i>CCC..T..TA.....A.....T.....CTCA..CAT.A.....AC.C.C.TTA.....T..T.....T							
<i>Ac. striatus 187JOA</i>CCC..T..TA.....A.....T.....CTCA..CAT.A.....AC.C.C.TTA.....T..T.....T							
<i>Ac. striatus 237MOS</i>CCC..T..TA.....A.....T.....CTCA..CAT.A.....AC.C.C.TTA.....T..T.....T							
<i>Ac. striatus 163PIN</i>CCC..T..TA.....A.....T.....CTCA..CAT.A.....AC.C.C.TTA.....T..T.....T							
<i>Ac. striatus 225QUI</i>CCC..T..TA.....A.....T.....CTCA..CAT.A.....AC.C.C.TTA.....T..T.....T							
<i>Ac. striatus 258SUN</i>CCC..T..TA.....A.....T.....CTCA..CAT.A.....AC.C.C.TTA.....T..T.....T							
<i>Ac. striatus 269SUN</i>CCC..T..TA.....A.....T.....CTCA..CAT.A.....AC.C.C.TTA.....T..T.....T							
<i>Ac. striatus 294SAT</i>CTC..T..TA.....A.....T.....CTCA..CAT.A.....AC.C.C.TTA.....T..T.....T							
<i>Ac. striatus 334TAP</i>CTC..T..TA.....A.....T.....CTCA..CAT.A.....AC.C.C.TTA.....T..T.....T							

	730	740	750	760	770	780	790
<i>Solenopsis invicta</i>	CCCTATATATTTAGAGACCTTGATAATTTTATTCCTGCTAATCCAATAATCACCCCAATTCACATCCAACGAGAATGA						
<i>Myrmica rubra</i>A.....T.....A.....C.....CC..A.....C..T..G.A.....T.C.....T.....C.G...						
<i>Ac. balzani</i>A.....A.....T.....C.....CA..A..C..C.....T..A.....CA.....T.....C.....						
<i>A. colombica</i>T..C.....C.....T..C.....C..A..A.....TT..G.T..T..C.CC..T..T.....C.....						
<i>A. laevigatta</i>A.....T.....C.....C.....A.....T.....A..T.CC..T..T.....T.....						
<i>A. robusta</i>A.....G.....CC.....A.....C.....T..T.....C.....T..T.....						
<i>A. rubropilosa</i>A.....T.....C..C.....C.....A.....T..G.....C..T..T.....						
<i>Ac. striatus 01</i>AT..C.....T..TT.A.....CC..C..A.....GT..G.A.....T..CC..T.....T.....G						
<i>Ac. striatus 142</i>AT..C.....T..TT.A.....CC..C..A.....GT..G.A.....T..CC..T.....T.....G						
<i>Ac. striatus 162PIN</i>AT..C.....T..TT.A.....CC..C..A.....GT..G.A.....T..CC..T.....T.....G						
<i>Ac. striatus 169SON</i>AT..C.....T..TT.A.....CC..C..A.....GT..G.A.....T..CC..T.....T.....G						
<i>Ac. striatus 171SON</i>AT..C.....T..TT.A.....CC..C..A.....GT..G.A.....T..CC..T.....T.....G						
<i>Ac. striatus 183JOA</i>AT..C.....T..TT.A.....CC..C..A.....GT..G.A.....T..CC..T.....T.....G						
<i>Ac. striatus 187JOA</i>AT..C.....T..TT.A.....CC..C..A.....GT..G.A.....T..CC..T.....T.....G						
<i>Ac. striatus 237MOS</i>AT..C.....T..TT.A.....CC..C..A.....GT..G.A.....T..CC..T.....T.....G						
<i>Ac. striatus 163PIN</i>AT..C.....T..TT.A.....CC..C..A.....GT..G.A.....T..CC..T.....T.....G						
<i>Ac. striatus 225QUI</i>AT..C.....T..TT.A.....CC..C..A.....GT..G.A.....T..CC..T.....T.....G						

Ac. striatus 258SUN .AT..C.....T..TT.A.....CC..C.A.....GT..G.A...T..CC..T.....T.....G
 Ac. striatus 269SUN .AT..C.....T..T.A.....CC..C.A.....GT..G.A...T..CC..T.....T.....G
 Ac. striatus 294SAT .AT..C.....T..T.A.....CC..C.A.....GT..G.A...T..CC..T.....T.....G
 Ac. striatus 334TAP .AT..C.....T..T.A.....CC..C.A.....GT..G.A...T..CC..T.....T.....G

800 810 820 830 840 850 860 870
 Solenopsis invicta TACTTTCTATTTGCATATGCCATCCTTCGATCTATCCCTAAATAAATAGGGGGAGTAATGCTCTATTAGCCCTCAATT
 Myrmica rubra .T...T.....T.....T.....T.A.....A..T.A.....C.....C.A...T.....TTT..T...
 Ac. balzani .T...T.....C..T.....T..T.....A..T.....C.....A.....C.....A.TATA.....
 A. colombica .T...T.....C.....C.....T.....T.....C.G.....T.....C.....ACTATA..T...
 A. laevigatta .T...T.....T.....A.....A.....C.T.....C.....ACTATA.....C
 A. robusta .T...T.....C..C..T..T.....C.....A.....C.....CTATA.....
 A. rubropilosa .T...C.....C.....T..T..C.....C.....C.....AT..AC.ATA.....
 Ac. striatus 01 .T..C.....A.....TCCATT.TACGATT.A.CC..AAT.A.CTCGGA..T.TTATTGCT..TATAATAT..ATTA
 Ac. striatus 142 .T..C.....A.....TCCATT.TACGATT.A.CC..AAT.A.CTCGGA..T.TTATTGCT..TATAATAT..ATTA
 Ac. striatus 162PIN .T..C.....A.....TCCATT.TACGATT.A.CC..AAT.A.CTCGGA..T.TTATTGCT..TATAATAT..ATTA
 Ac. striatus 169SON .T..C.....A.....TCCATT.TACGATT.A.CC..AAT.A.CTCGGA..T.TTATTGCT..TATAATAT..ATTA
 Ac. striatus 171SON .T..C.....A.....TCCATT.TACGATT.A.CC..AAT.A.CTCGGA..T.TTATTGCT..TATAATAT..ATTA
 Ac. striatus 183JOA .T..C.....A.....TCCATT.TACGATT.A.CC..AAT.A.CTCGGA..T.TTATTGCT..TATAATAT..ATTA
 Ac. striatus 187JOA .T..C.....A.....TCCATT.TACGATT.A.CC..AAT.A.CTCGGA..T.TTATTGCT..TATAATAT..ATTA
 Ac. striatus 237MOS .T..C.....A.....TCCATT.TACGATT.A.CC..AAT.A.CTCGGA..T.TTATTGCT..TATAATAT..ATTA
 Ac. striatus 163PIN .T..C.....A.....TCCATT.TACGATT.A.CC..AAT.A.CTCGGA..T.TTATTGCT..TATAATAT..ATTA
 Ac. striatus 225QUI .T..C.....A.....TCCATT.TACGATT.A.CC..AAT.A.CTCGGA..T.TTATTGCT..TATAATAT..ATTA
 Ac. striatus 258SUN .T..C.....A.....TCCATT.TACGATT.A.CC..AAT.A.CTCGGA..T.TTATTGCT..TATAATAT..ATTA
 Ac. striatus 269SUN .T..C.....A.....TCCATT.TACGATT.A.CC..AAT.A.CTCGGA..T.TTATTGCT..TATAATAT..ATTA
 Ac. striatus 294SAT .T..C.....A.....TCCATT.TACGATT.A.CC..AAT.A.CTCGGA..T.TTATTGCT..TATAATAT..ATTA
 Ac. striatus 334TAP .T..C.....A.....TCCATT.TACGATT.A.CC..AAT.A.CTCGGA..T.TTATTGCT..TATAATAT..ATTA

880 890 900 910 920 930 940
 Solenopsis invicta TTAATTCTATACACCCTGCCCTTCAA-----AAAATTCACATACCATCTTTCTCTTTTCCCTTAACCAATTA
 Myrmica rubraT..T.T..CA...T.ATT-----TCT..AA.A.G.A.C..AC.AATA..C.A...T..A..T.....T
 Ac. balzani A.....T.....T..A..A..A..ATT--AAATCT.AAT.TCTA.CC.A.C...T..CAA..TA..C..T...A.C
 A. colombicaT.....T..T..T..ATCTCTAAATCT...T.TTC.AATC...CA..AA.AACC.TATC...T.....
 A. laevigattaT.....A..C..TT.CAT.TCCAATCT..AT.TTCC.A.C.A.C...T..AA...TTTC...T..A..
 A. robusta .T...T.....A..C...T..AT.TCTAAATCT..AT...CTAACC.C.C...T..AA...TTATC...T..A..
 A. rubropilosa .T..CT...T..A..C..TT..AC.TCTAAATCT...T..C.AATC.C.C...T..AA...TTATC...T..A..
 Ac. striatus 01 AATTC.T..C..TTATTCC..TTA.T..ATCTAA.T.C..T.ACCT.A...A.AT.AT.CAA.CAATT.AT.TTT...G
 Ac. striatus 142 AATTC.T..C..TTATTCC..TTA.T..ATCTAA.T.C..T.ACCT.A...A.AT.AT.CAA.CAATT.AT.TTT...G
 Ac. striatus 162PIN AATTC.T..C..TTATTCC..TTA.T..ATCTAA.T.C..T.ACCT.A...A.AT.AT.CAA.CAATT.AT.TTT...G
 Ac. striatus 169SON AATTC.T..C..TTATTCC..TTA.T..ATCTAA.T.C..T.ACCT.A...A.AT.AT.CAA.CAATT.AT.TTT...G
 Ac. striatus 171SON AATTC.T..C..TTATTCC..TTA.T..ATCTAA.T.C..T.ACCT.A...A.AT.AT.CAA.CAATT.AT.TTT...G
 Ac. striatus 183JOA AATTC.T..C..TTATTCC..TTA.T..ATCTAA.T.C..T.ACCT.A...A.AT.AT.CAA.CAATT.AT.TTT...G
 Ac. striatus 187JOA AATTC.T..C..TTATTCC..TTA.T..ATCTAA.T.C..T.ACCT.A...A.AT.AT.CAA.CAATT.AT.TTT...G
 Ac. striatus 237MOS AATTC.T..C..TTATTCC..TTA.T..ATCTAA.T.C..T.ACCT.A...A.AT.AT.CAA.CAATT.AT.TTT...G
 Ac. striatus 163PIN AATTC.T..C..TTATTCC..TTA.T..ATCTAA.T.C..T.ACCT.A...A.AT.AT.CAA.CAATT.AT.TTT...G
 Ac. striatus 225QUI AATTC.T..C..TTATTCC..TTA.T..ATCTAA.T.C..T.ACCT.A...A.AT.AT.CAA.CAATT.AT.TTT...G
 Ac. striatus 258SUN AATTC.T..C..TTATTCC..TTA.T..ATCTAA.T.C..T.ACCT.A...A.AT.AT.CAA.CAATT.AT.TTT...G
 Ac. striatus 269SUN AATTC.T..C..TTATTCC..TTA.T..ATCTAA.T.C..T.ACCT.A...A.AT.AT.CAA.CAATT.AT.TTT...G
 Ac. striatus 294SAT AATTC.T..C..TTATTCC..TTA.T..ATCTAA.T.C..T.ACCT.A...A.AT.AT.CAA.CAATT.AT.TTT...G
 Ac. striatus 334TAP AATTC.T..C..TTATTCC..TTA.T..ATCTAA.T.C..T.ACCT.A...A.AT.AT.CAA.CAATT.AT.TTT...G

950 960 970 980 990 1000 1010 1020
 Solenopsis invicta TTATTTGAAATATTCATCAATACCTTTATTCTATTAACCTGAGCGGGGCCCAACCTATTGAGCCCCCTTTGTTTCT
 Myrmica rubra ...A.....C.....T.....AT.....C.....T.....A..AAGA...TTA...A..A.....A..AT.
 Ac. balzaniT.C..T..CT.....T.....TC.....T.....T.....T.....T.....T.....A.A.A..TA
 A. colombica AC.....T.....T..A.....A..T.....T.....T.....A..A..T..AT.....AGAT.....ACA.CAT.
 A. laevigatta AC.....T.....T..T.....A.....C.....T.....T.....T.....A..T..T..AT.....AAAT...A..A..CT.
 A. robusta A.....T.....T.....C.....CC..T.....A.....T.....AT.....AGA...A..A..A..CTC
 A. rubropilosa AC.....T.....T..C.....C.....TC..T..T.....C..A..T..T..AT.....AGA...A..A..A..CCT.
 Ac. striatus 01 AACAA..CATTA..CA...TC..TTTA..GAC..GAGCTGGA.CA.AATTAATTG.AGATC.TTATAT...AA.CAGC.A
 Ac. striatus 142 AACAA..CATTA..CA...TC..TTTA..GAC..GAGCTGGA.CA.AATTAATTG.AGATC.TTATAT...AA.CAGC.A
 Ac. striatus 162PIN AACAA..CATTA..CA...TC..TTTA..GAC..GAGCTGGA.CA.AATTAATTG.AGATC.TTATAT...AA.CAGC.A
 Ac. striatus 169SON AACAA..CATTA..CA...TC..TTTA..GAC..GAGCTGGA.CA.AATTAATTG.AGATC.TTATAT...AA.CAGC.A
 Ac. striatus 171SON AACAA..CATTA..CA...TC..TTTA..GAC..GAGCTGGA.CA.AATTAATTG.AGATC.TTATAT...AA.CAGC.A
 Ac. striatus 183JOA AACAA..CATTA..CA...TC..TTTA..GAC..GAGCTGGA.CA.AATTAATTG.AGATC.TTATAT...AA.CAGC.A
 Ac. striatus 187JOA AACAA..CATTA..CA...TC..TTTA..GAC..GAGCTGGA.CA.AATTAATTG.AGATC.TTATAT...AA.CAGC.A
 Ac. striatus 237MOS AACAA..CATTA..CA...TC..TTTA..GAC..GAGCTGGA.CA.AATTAATTG.AGATC.TTATAT...AA.CAGC.A
 Ac. striatus 163PIN AACAA..CATTT-----TTA..GAC..GAGCTGGA.CA.AATTAATTG.AGATC.TTATAT...AA.CAGC.A
 Ac. striatus 225QUI AACAA..CATT-----TTA..GAC..GAGCTGGA.CA.AATTAATTG.AGATC.TTATAT...AA.CAGC.A
 Ac. striatus 258SUN AACAA..CATT-----TTA..GAC..GAGCTGGA.CA.AATTAATTG.AGATC.TTATAT...AA.CAGC.A
 Ac. striatus 269SUN AACAA..CATT-----TTA..GAC..GAGCTGGA.CA.AATTAATTG.AGATC.TTATAT...AA.CAGC.A
 Ac. striatus 294SAT AACAA..CATTA..CA...TC..TTTA..GAC..GAGCTGGA.CA.AATTAATTG.AGATC.TTATAT...AA.CAGC.A
 Ac. striatus 334TAP AACAA..CATTA..CA...TC..TTTA..GAC..GAGCTGGA.CA.AATTAATTG.AGATC.TTATAT...AA.CAGC.A

1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
 Solenopsis invicta ATCAGACAATTTTATCTATTACATACTTCTATATTTTATTATAATACCATTATTAAACAAAATTTGATTTAATCTC
 Myrmica rubra ..T.....C.A.....
 Ac. balzani ..T..C...C.C.CA.C...G.T....TAC..T.....TGTC...T..TAATTTA...T.A...AAA.T.T.T
 A. colombica ..T..C...ACCC.TA...CTT...T...TA...T...T...CCC...TA..AACTTT...T.A...AAATT.A.A
 A. laevigatta ..T.....A.C...A...CTT...T...TA...T...T...AACTT...T...A...AAATT.A.T
 A. robusta ..T..T...A...A...TT...T...TA...T...T...TC..T...AATT...G.A...AAATT.A.T
 A. rubropilosa ..T.....A...A...CT...T...TA...T...C...TT.T...AACTTT...A...AAATT.A.T
 Ac. striatus 01 .ATCCTA.C...AT.TAT..TATATTC.TTAT.GCCC...CCCTCAC...CA.ACT.TG...C..AT.A.CTATAA
 Ac. striatus 142 .ATCCTA.C...AT.TAT..TATATTC.TTAT.GCCC...CCCTCAC...CA.ACT.TG...C..AT.A.CTATAA
 Ac. striatus 162PIN .ATCCTA.C...AT.TAT..TATATTC.TTAT.GCCC...CCCTCAC...CA.ACT.TG...C..AT.A.CTATAA
 Ac. striatus 169SON .ATCCTA.C...AT.TAT..TATATTC.TTAT.GCCC...CCCTCAC...CA.ACT.TG...C..AT.A.CTATAA
 Ac. striatus 171SON .ATCCTA.C...AT.TAT..TATATTC.TTAT.GCCC...CCCTCAC...CA.ACT.TG...C..AT.A.CTATAA

```

Ac. striatus 183JOA .ATCCTA.C...AT.TAT..TATATTC.TTAT.GCCC...CCCTCAC...CA.ACT.TG...C..AT.A.CTATAA
Ac. striatus 187JOA .ATCCTA.C...AT.TAT..TATATTC.TTAT.GCCC...CCCTCAC...CA.ACT.TG...C..AT.A.CTATAA
Ac. striatus 237MOS .ATCCTA.C...AT.TAT..TATATTC.TTAT.GCCC...CCCTCAC...CA.ACT.TG...C..AT.A.CTATAA
Ac. striatus 163PIN .ATCCTA.C...AT.TAT..TATATTC.TTAT.GCCC...CCCTCAC...CA.ACT.TG...C..AT.A.CTATAA
Ac. striatus 225SQUI .ATCCTA.C...AT.TAT..TATATTC.TTAT.GCCC...CCCTCAC...CA.ACT.TG...C..AT.A.CTATAA
Ac. striatus 258SUN .ATCCTA.C...AT.TAT..TATATTC.TTAT.GCCC...CCCTCAC...CA.ACT.TG...C..AT.A.CTATAA
Ac. striatus 269SUN .ATCCTA.C...AT.TAT..TATATTC.TTAT.GCCC...CCCTCAC...CA.ACT.TG...C..AT.A.CTATAA
Ac. striatus 294SAT .ATCCTA.C...AT.TAT..TATATTC.TTAT.GCCC...CCCTCAC...CA.ACT.TG...C..AT.A.CTATAA
Ac. striatus 334TAP .ATCCTA.C...AT.TAT..TATATTC.TTAT.GCCC...CCCTCAC...CA.ACT.TG...C..AT.A.CTATAA

```

```

1110
|
Solenopsis invicta CTCTCCCATAATCATTAA
Myrmica rubra -----
Ac. balzani A.T.A.TCA..AA.A...
A. colombica A..ATTCA.CA---...
A. laevigatta A.T.A.-----...
A. robusta A..AT-----...
A. rubropilosa A..A.-----...
Ac. striatus 01 T.A.TAA.GTT.ATA.T.
Ac. striatus 142 T.A.TAA.GTT.ATA.T.
Ac. striatus 162PIN T.A.TAA.GTT.ATA.T.
Ac. striatus 169SON T.A.TAA.GTT.ATA.T.
Ac. striatus 171SON T.A.TAA.GTT.ATA.T.
Ac. striatus 183JOA T.A.TAA.GTT.ATA.T.
Ac. striatus 187JOA T.A.TAA.GTT.ATA.T.
Ac. striatus 237MOS T.A.TAA.GTT.ATA.T.
Ac. striatus 163PIN T.A.TAA.GTT.ATA.T.
Ac. striatus 225SQUI T.A.TAA.GTT.ATA.T.
Ac. striatus 258SUN T.A.TAA.GTT.ATA.T.
Ac. striatus 269SUN T.A.TAA.GTT.ATA.T.
Ac. striatus 294SAT T.A.TAA.GTT.ATA.T.
Ac. striatus 334TAP T.A.TAA.GTT.ATA.T.

```

Figure 3 - Sequence alignments for 642 base pairs of *Acromyrmex striatus numts* and the *cytb* gene from other ants species. The alignment is based on the *cytb* gene of *Solenopsis invicta* (NC014672), and the numbers correspond to the position of this nucleotide sequence. Dots indicate no change in the nucleotide compared with the *cytb* of *S. invicta*. The sequences that encoded premature stop codons in the *numts* sequences are highlighted in yellow and deletion of part of the sequences is highlighted in blue. The *cytb* gene showed an insertion of two codons (six nucleotides) in the *Atta* species and one codon (three nucleotides) in *A. balzani*, which are in bold at position 904. The dash represents a gap.

Considerações Finais

- ✓ *A. striatus* apresentou a mesma morfologia e número cromossômico que as espécies do gênero *Atta* cariotipadas até o momento ($2n = 22$);
- ✓ Na reconstrução filogenética estimada a partir de quatro genes nucleares, *A. striatus* agrupou em um clado separado das demais formigas cortadeiras, ou seja, não agrupando com as espécies do gênero *Acromyrmex* e *Atta*;
- ✓ Baseado nos resultados reportados no capítulo 1 sugere-se que *A. striatus* seja transferida para um novo gênero de Attini;
- ✓ Considerando a relação filogenética entre *A. striatus* e as demais formigas cortadeiras, bem como, as características ecológicas destes organismos, pode-se sugerir que a diversificação deste grupo possivelmente ocorreu em ambientes abertos da América do Sul, e não em ambientes úmidos;
- ✓ As populações de *A. striatus* estão fortemente estruturadas em sua distribuição geográfica, resultado de uma demografia histórica estável durante o tempo evolutivo desta espécie;
- ✓ O isolamento por distância contribui significativamente para o perfil filogeográfico reportado para esta espécie;
- ✓ Os resultados filogeográficos mostrados evidenciam que os pampas e a região costeira do sul do Brasil não foram diretamente afetados com a expansão das florestas úmidas, durante os ciclos interglaciais;
- ✓ Os resultados apresentados no capítulo 3 evidenciam a ocorrência de pseudogenes mitocondriais (*numts*) em mais uma espécie de formiga da tribo Attini.