

HELDER CANTO RESENDE

Filogeografia de *Dinoponera lucida* Emery (Hymenoptera:
Formicidae) com base em DNA mitocondrial

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

HELDER CANTO RESENDE

Filogeografia de *Dinoponera lucida* Emery (Hymenoptera:
Formicidae) com base em DNA mitocondrial

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

Aprovada em 25 de fevereiro de 2008.

Prof. Jacques Hubert C. Delabie

Prof. Jorge Abdala Dergam

Prof^a. Karla Suemy C. Yotoko

Prof. Luiz Orlando de Oliveira
(co-orientador)

Prof.^a Tânia Maria Fernandes Salomão
(orientadora)

Dedico à minha esposa, em gratidão ao seu amor incondicional. Depois de um dia bom ou ruim no laboratório sempre tenho um motivo especial para voltar para casa.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, pela formação;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela concessão de bolsa de pesquisa;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG, pelo financiamento da pesquisa através do projeto “Filogeografia de *Dinoponera lucida* Emery: contribuição para a elucidação do padrão de distribuição geográfico e preservação” – proc. 1330/06.

À Prof^a. Tânia Maria Fernandes Salomão pela amizade, orientação e treinamento nas técnicas moleculares;

Aos Prof. Lúcio Antônio de Oliveira Campos, Prof. Luiz Orlando de Oliveira, Prof. Jorge Dergam e Prof. Jacques Delabie pelos conselhos e sugestões;

À Prof^a. Dr^a. Karla Yotoko pela amizade, orientação e treinamento em bioinformática e nas análises filogenéticas;

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento pelos ensinamentos preciosos.

Aos amigos que enviaram amostras e auxiliaram nas coletas: Dr^a Cléa S. F. Mariano, Dr^a Riviane R. Hora, Dr. Marco Antônio Costa, Dr. Marcos C. Teixeira, Dr^a Sílvia das Graças Pompolo, Luisa Barros e Flávia Assunção Santana e aos amigos do laboratório, em especial: Camila, Henrique, Ana Maria, Aline, Marcília, Margarete, Monteiro, Íris e Bhering.

BIOGRAFIA

HELDER CANTO RESENDE, filho de Heber Resende da Silva e Cássia Eufrásio do Canto Resende, nasceu em 06 de outubro de 1977, na cidade de Divinópolis, Minas Gerais. Casou-se em 2006 com Paula Beatriz Pires da Cunha.

Graduou-se em Ciências Biológicas - Bacharelado e Licenciatura pelo Centro Universitário do Cerrado-Patrocínio, Patrocínio/MG, em dezembro de 2005.

Em fevereiro de 2006 iniciou o curso de mestrado em Genética e Melhoramento pela Universidade Federal de Viçosa, sob orientação da Prof^a. Tânia Maria Fernandes Salomão, como bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, concluindo em fevereiro de 2008. Em março de 2008 iniciou o doutorado no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Federal de Viçosa, sob orientação do Prof. Lúcio Antônio de Oliveira Campos, como bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

Desenvolve pesquisa na área de genética molecular com especial interesse em evolução, diversidade genética, filogenia molecular, filogeografia e genética na conservação.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| RESUMO | vi |
| ABSTRACT | vii |
| INTRODUÇÃO | 1 |
| OBJETIVO GERAL | 6 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 6 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 7 |
| RESULTADOS | 13 |
| VARIAÇÃO MITOCONDRIAL | 13 |
| ANÁLISES FILOGENÉTICAS | 14 |
| ESTIMATIVAS DE DIVERSIDADE | 19 |
| TESTE DE MANTEL | 20 |
| ESTIMATIVA DO TEMPO DE COALESCÊNCIA | 21 |
| REDE DE HAPLÓTIPOS | 22 |
| DISCUSSÃO | 24 |
| DEFINIÇÃO DO MELHOR CONJUNTO DE DADOS | 24 |
| RELAÇÕES FILOGENÉTICAS | 25 |
| REDE DE HAPLÓTIPOS | 26 |
| HIPÓTESE SOBRE OS FATORES EVOLUTIVOS RELACIONADOS À DIVERSIFICAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE <i>D. lucida</i> | 33 |
| PERDA DE HAPLÓTIPOS E ISOLAMENTO DAS POPULAÇÕES EM REFÚGIOS FLORESTAIS MODERNOS: CONSEQÜÊNCIAS PARA A CONSEVAÇÃO DE <i>D. lucida</i> | 37 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS | 38 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 39 |
| ANEXO 1 | 46 |
| ANEXO 2 | 47 |

RESUMO

RESENDE, Helder Canto, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2008. **Filogeografia de *Dinoponera lucida* Emery (Hymenoptera: Formicidae) com base em DNA mitocondrial.** Orientador: Tânia Maria Fernandes Salomão. Co-orientadores: Lúcio Antônio de Oliveira Campos, Luiz Orlando de Oliveira.

Dinoponera lucida (Formicidae: Ponerinae) é uma formiga de coloração preta e grande porte, até 4 cm, com fêmeas ápteras e machos alados e menores. Não há castas morfologicamente diferenciadas e a reprodução é feita por operárias fertilizadas conhecidas como “*gamergates*”. A espécie consta na lista brasileira da fauna ameaçada de extinção. Sua distribuição está restrita ao sul da Bahia e ao Espírito Santo no Corredor Central da Mata Atlântica. Como contribuição para a elucidação do padrão de distribuição geográfica e estruturação populacional da espécie, a filogeografia de *D. lucida* foi estudada a partir de seqüências do DNA mitocondrial. Foram seqüenciados 1149 pb dos genes *COI*, *COII* e *Cytb*. Árvores filogenéticas foram construídas por Inferência Bayesiana. Variância molecular, índices de fixação, índices de diversidade nucleotídica e haplotípica foram estimados. Redes de haplótipos foram reconstruídas por *median-joining network*. Os índices de diversidade e fixação indicaram a estruturação das populações. O padrão filogeográfico observado foi a estruturação filogeográfica com padrão descontínuo de divergência genética e perda de haplótipos intermediários em populações com limitado fluxo gênico. A área de ocorrência da espécie tem sido intensamente impactada com perda de habitat e conseqüente isolamento das populações remanescentes em fragmentos florestais preservados que representam refúgios ecológicos modernos para a espécie. A perda de habitat representa também a perda haplótipos intermediários e as populações remanescentes apresentaram haplótipos exclusivos. A perda de qualquer uma delas não pode ser substituída ou compensada pela conservação de nenhuma outra. Isto implica a necessidade de esforços conservacionistas que visem preservar o máximo possível das áreas remanescentes que ainda abrigam populações de *D. lucida*.

ABSTRACT

RESENDE, Helder Canto. M. Sc, Universidade Federal de Viçosa, February, 2008. **Phylogeography of *Dinoponera lucida* Emery (Hymenoptera: Formicidae) with base at mitochondrial DNA.** Adviser: Tânia Maria Fernandes Salomão. Co-advisers: Lúcio Antônio de Oliveira Campos, Luiz Orlando de Oliveira.

Dinoponera lucida (Formicidae: Ponerinae) is a ant of black color and large size, up to four cm, with apterous females and smaller, winged males. There are no morphologically differentiated castes and the reproduction is carried out by fertilized workers known as “*gamergates*”. The species is on the Brazilian list of fauna threatened with extinction. Its distribution is restricted to the south of Bahia and to Espírito Santo in the Central Corridor of the Mata Atlântica. As a contribution to the elucidation of the type of geographic distribution and population structure of the species, the phylogeography of *D. lucida* was studied from mitochondrial DNA. 1149 bp of the COI, COII and *Cytb* genes were sequenced. Phylogenetic trees were constructed by Bayesian Inference. Molecular variation, fixation indices, nucleotide and haplotype diversity indices were estimated. Haplotype networks were reconstructed by *median-joining network*. The type of phylogeography observed was phylogeographic structure with discontinuous genetic divergence and loss of intermediate haplotypes and populations with limited gene flow. The area of occurrence of the species has been intensely impacted by habitat loss and consequently isolation of remaining populations and preserved forests that represent modern ecological refuges for the species. The loss of the habitat also represents loss of intermediate haplotypes and the remaining populations presented exclusive haplotypes. The loss of any of these can not be replaced or compensated for by the conservation of any other. This implies the necessity of conservation efforts aiming to preserve as many as possible of the remaining areas that still harbour population of the *D. lucida*.

INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica brasileira foi considerada por Myers *et al.* (2000) como um dos 25 *hot spots* de diversidade do mundo em prioridade de conservação devido à concentração de espécies endêmicas e à perda de habitats naturais. É considerada um dos ecossistemas mais ameaçados do planeta, onde o ritmo da perda de biodiversidade está entre os mais rápidos. Estima-se que tenham restado apenas sete ou oito por cento da área original, estimada entre 1 e 1,5 milhão de km² (Galindo-Leal & Câmara, 2003). As florestas remanescentes foram reduzidas a vários arquipélagos de fragmentos florestais muito pequenos, bastante separados entre si. Além disso, fatores como a incidência de fogo e a introdução de espécies exóticas ameaçam a sustentabilidade desses fragmentos (Gascon *et al.*, 2000).

Em 1997, Ayres propôs ao governo federal o projeto “Corredores Ecológicos das Florestas Tropicais do Brasil” com o objetivo de estimular políticas públicas que considerassem grandes extensões de áreas ecologicamente relevantes, incluindo as unidades de conservação e suas comunidades, com ações conservacionistas integradas. O manejo integrado dos corredores ecológicos visa facilitar o fluxo de indivíduos e genes entre populações. Dois corredores biológicos foram considerados prioritários nessa proposta: o Corredor da Serra do Mar e o Corredor Central da Mata Atlântica. O projeto corredores ecológicos foi publicado na íntegra em Ayres *et al.* (2005).

O Corredor Central da Mata Atlântica tem mais de 8,5 milhões de hectares estendendo-se por todo o estado do Espírito Santo e sul da Bahia, possuindo 83 unidades de conservação (Brasil-MMA, 2006). Este corredor destaca-se por apresentar extrema riqueza biológica e abrigar espécies de distribuição restrita e ameaçadas de extinção (Prado *et al.*, 2003; Aguiar *et al.*, 2005; Ayres *et al.*, 2005; IPEMA, 2005).

Em termos de abundância numérica, tamanho e riqueza de espécies, as formigas destacam-se em muitos ambientes terrestres. Associado ao fato

delas ocuparem altos níveis tróficos e freqüentemente nichos especializados, as formigas podem ser usadas como bioindicadores de vários parâmetros ambientais (Majer, 1983).

As formigas do gênero *Dinoponera* (Formicidae: Ponerinae) estão entre as maiores formigas da família Formicidae, com operárias que atingem até 4 cm de comprimento. Morfologicamente e fisiologicamente, todas as espécies do gênero são bastante similares, com operárias de coloração preta e de grande porte, com diferenças morfológicas discretas, porém nítidas. As seis espécies conhecidas do gênero (*D. australis*, *D. gigantea*, *D. longipes*, *D. lucida*, *D. mutica* e *D. quadriceps*) ocorrem na América do Sul, abrangendo o sudeste da Colômbia, leste do Peru, todo o Brasil, leste da Bolívia, Paraguai e nordeste da Argentina (Kempf, 1971; Paiva & Brandão, 1995). Neste grupo não existem castas morfológicamente diferenciadas e a reprodução é feita por operárias fertilizadas conhecidas como “*gamergates*” (Peeters, 1993). As fêmeas são ápteras e diplóides enquanto os machos são alados, haplóides, e de menor tamanho que as fêmeas (Hanskin & Zahl, 1971; Kempf, 1971). O comportamento de *D. quadriceps* durante o acasalamento sugere que fêmeas desta espécie, e possivelmente de outras espécies do gênero, se acasalam com um único macho (Monnin & Peeters, 1998).

D. lucida Emery 1901 (Figura 1) foi incluída na lista oficial brasileira da fauna ameaçada de extinção em 2003 devido à intensa fragmentação e perda de seu habitat natural. Sua distribuição atual é considerada restrita ao sul da Bahia e ao Espírito Santo no Corredor Central da Mata Atlântica (Delabie, 2004).

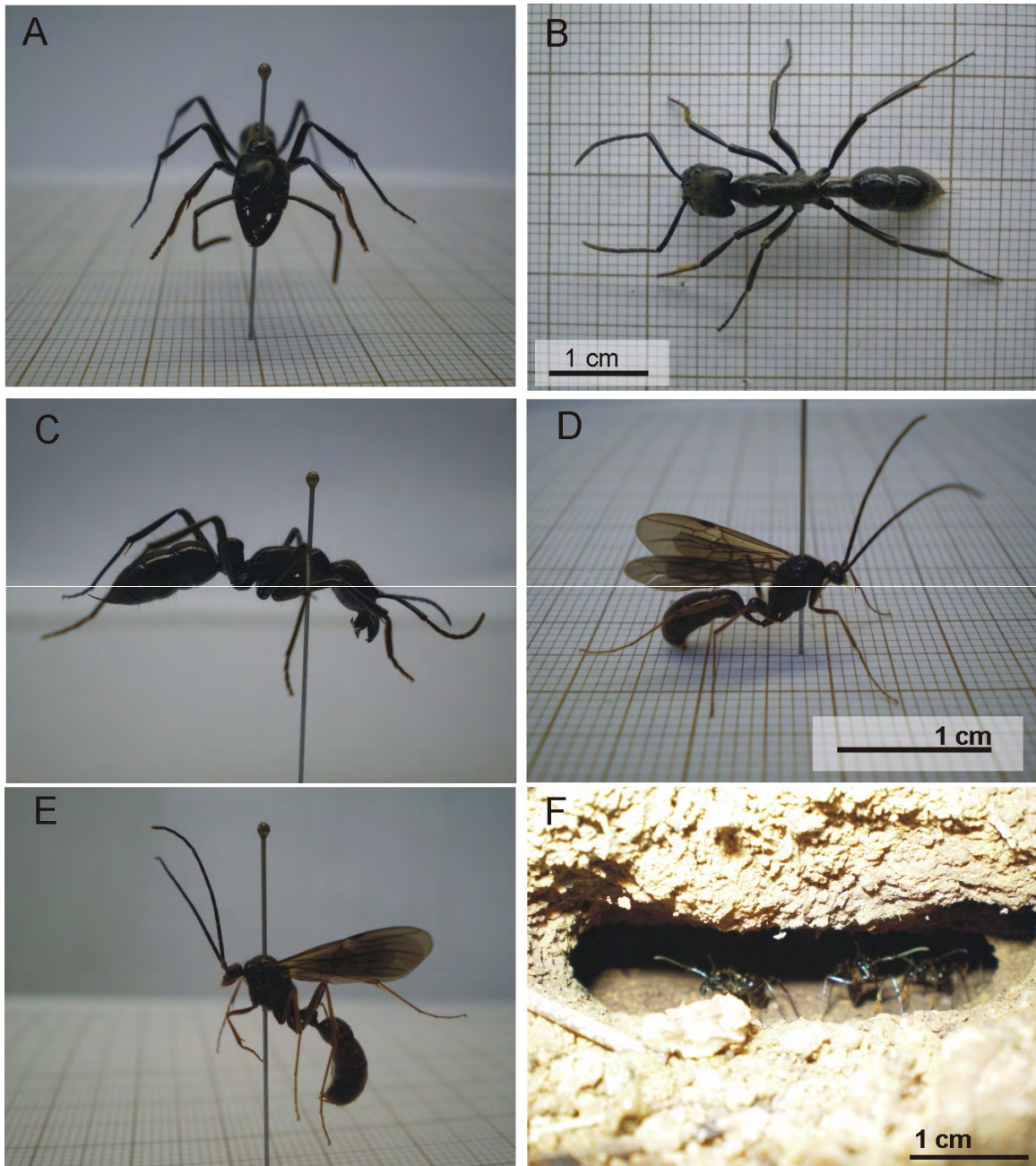


Figura 1. *Dinoponera lucida* Emery 1901. A, B, C: fêmea; D e E: macho; F abertura de um ninho.

Estudos recentes resultaram em conhecimentos importantes da biologia e genética de *D. lucida*. Peixoto (2006) estudou a bioecologia e o comportamento desta espécie. Estas formigas constroem ninhos subterrâneos relativamente rasos, em média 35,1 cm de profundidade, que podem chegar a 65 cm. Nestes ninhos convivem a fêmea reprodutora, fêmeas operárias e os estágios imaturos (ovos, larvas e pupas). Foi observada apenas uma fêmea reprodutora (*gamergate*) em cada colônia estudada, sugerindo que a espécie é monogínica. A presença de machos foi observada durante todo o período de estudo das colônias. O estudo demonstrou um padrão agregado de distribuição espacial dos ninhos como reflexo do modo de instalação de novos ninhos que se dá por fissão de colônias. A fissão de uma colônia ocorre quando uma fêmea reprodutiva abandona a colônia de origem para fundar uma nova, acompanhada por operárias estéreis que colaboram neste processo (Peeters & Ito, 2001)

Analisando *D. lucida* em nível citológico, Mariano *et al.* (2004) detectaram nesta espécie o maior número conhecido de cromossomos em Hymenoptera. Expressiva variação cariotípica: $2n=106, 116, 118$ e 120 foi relatada também por Mariano *et al.* (2005), Barros *et al.* (2006) e Mariano *et al.* (2007, *em preparação*). Quando se compara a distribuição geográfica dos cariótipos, os resultados destes estudos sugerem a estruturação das populações em pelo menos dois demes distintos, um representando as populações do Espírito Santo e outro as populações da Bahia (Barros *et al.*, 2006). Inferência similar foi feita por Costa *et al.* (2006) em estudos com PCR-RFLP da região COI/COII do mtDNA de *D. lucida*, que sugerem a separação das populações em duas regiões: (1) Bahia-Norte do Espírito Santo e (2) Centro-sul do Espírito Santo.

Nas duas últimas décadas, estudos filogeográficos têm buscado auxiliar o entendimento dos processos e fatores evolutivos que levaram à atual diversificação e distribuição espacial das espécies. O termo filogeografia foi definido por Avise (2000) como um campo de estudos que abrange os princípios e os processos que governam a distribuição geográfica das linhagens genealógicas, especialmente aquelas entre espécies proximamente relacionadas e dentro delas.

Dentre os marcadores moleculares que podem ser utilizados em estudos filogenéticos dentro de espécies ou entre espécies próximas, merece destaque o DNA mitocondrial (mtDNA), em virtude do padrão de herança uniparental, ausência de recombinação, alta taxa de substituição e considerável polimorfismo (Avise *et al.*, 1987). Devido à sua herança materna, o mtDNA pode ser usado para identificar matrilineagens e estimar dispersão por fêmeas em insetos sociais (Pamilo *et al.*, 1997). Isso se torna particularmente importante para estudos filogeográficos das espécies cuja dispersão dos ninhos é feita exclusivamente pelas fêmeas, como é o caso de *D. lucida*.

Em estudos de sistemática molecular, os genes mitocondriais mais freqüentemente utilizados são os que codificam para Citocromo c oxidase subunidade I (COI), Citocromo c oxidase subunidade II (COII); 18S, 16S e 12S rDNA; Citocromo b (*Cytb*) e Região Controle (Caterino *et al.*, 2000; Meyer & Zardoya, 2003). Estudos filogeográficos e de genética de populações de formigas têm utilizado principalmente os genes mitocondriais COI, COII e *Cytb*.

Utilizando seqüências de COI e COII, Quek *et al.* (2007) investigaram a história geográfica e o contexto de diversificação de formigas do gênero *Crematogaster* das florestas equatoriais do sudeste da Ásia. As análises permitiram aos autores reconstruir o tempo de diversificação e expansão demográfica, e identificar áreas que podem ter sido refúgios ou centros de diversificação para estas formigas. Seqüências de *Cytb* e COI foram utilizadas por Azuma *et al.* (2006) para estudar a filogeografia da formiga *Oecophylla smaragdina* na Ásia, permitindo aos autores inferir as relações entre a estrutura filogeográfica destas formigas com evidências geológicas da distribuição de continentes, ilhas e mares durante os períodos glaciais. Para estudar a estrutura filogeográfica da formiga *Solenopsis invicta*, nativa da América do Sul, Ahrens *et al.* (2005) também utilizaram seqüências mitocôndrias COI e COII e puderam constatar altos níveis de estruturação genética e isolamento por distância nestas formigas.

Considerando a importância de estudos que possam contribuir para o entendimento dos padrões evolutivos que geraram a riqueza da biodiversidade da Mata Atlântica e o fato de *Dinoponera lucida* ser uma

formiga ameaçada de extinção, endêmica deste bioma, este estudo propõe estudar a filogeografia de *D. lucida* analisando seqüências do DNA mitocondrial.

OBJETIVO GERAL

Estudar a filogeografia de *Dinoponera lucida*, com base em genes mitocondriais, como contribuição para a elucidação do padrão de distribuição geográfica e estruturação populacional.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a estruturação geográfica populacional de *D. lucida*.
- Inferir sobre os processos demográficos e evolutivos que contribuíram para a atual distribuição das populações de *D. lucida*.

MATERIAL E MÉTODOS

Um total de 69 indivíduos de *D. lucida* foi analisado. Os espécimes são provenientes de 24 localidades dos estados do Espírito Santo e Bahia, sendo uma localidade na divisa de Bahia com Minas Gerais (Figura 2; Tabela 1) e abrangem toda a área de ocorrência da espécie. A localização de cada ninho amostrado foi obtida com GPS. Para os ninhos onde não foi possível a exata marcação do ponto de georeferência, utilizaram-se as localizações geográficas dos municípios como estimativas aproximadas.

Um indivíduo por colônia foi genotipado para evitar haplótipos idênticos atribuídos à estrutura familiar da colônia. Indivíduos de outras seis espécies foram utilizados como grupo externo nas análises filogenéticas (Tabela 1).

O DNA total de 54 indivíduos de *D. lucida* e do indivíduo de *D. gigantea* foram obtidos no banco de DNA do Laboratório de Biologia Celular e Biofísica da Universidade Federal de Viçosa, montado durante a execução do projeto “Plano de Manejo de *Dinoponera lucida* Emery, a Formiga Gigante do Corredor Central da Mata Atlântica”, uma parceria entre o Instituto Dríades de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade (Ilhéus, BA), Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC/CEPLAC), Universidade Estadual de Santa Cruz e Universidade Federal de Viçosa. Os demais indivíduos analisados foram coletados ou recebidos como colaboração de outros pesquisadores. Neste caso, o DNA total foi extraído conforme protocolo descrito em Waldschmidt *et al.* (1997) com algumas modificações, e adicionado ao banco de DNA.

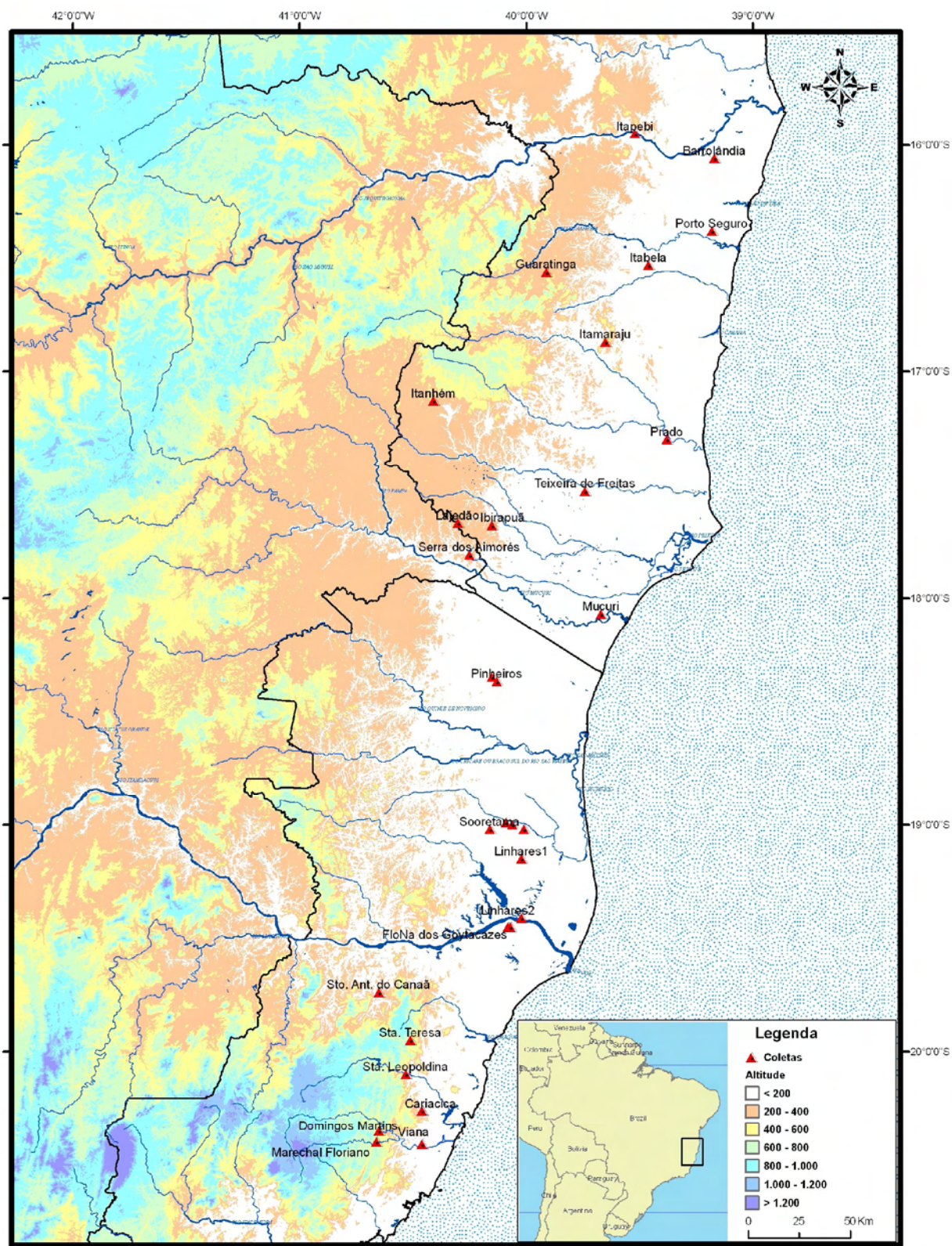


Figura 2 – Mapa exibindo as localidades e os pontos de coleta de indivíduos de *D. lucida*. As localidades estão representadas por triângulos vermelhos.

Tabela 1 – Indivíduos analisados, locais de coleta e referências geográficas.

| Espécie | Sigla | Localidade | Estado | Longitude | Latitude |
|--------------------------------|-----------------------------|----------------------|------------|-----------|----------|
| <i>Dinoponera lucida</i> | itp | Itapebi | BA | -39.52 | -15.95 |
| | bar | Barrolândia | BA | -39.17 | -16.06 |
| | pos | Porto Seguro | BA | -39.18 | -16.38 |
| | itb | Itabela | BA | -39.46 | -16.53 |
| | gua | Guaratinga | BA | -39.91 | -16.56 |
| | itm | Itamaraju | BA | -39.65 | -16.87 |
| | pra | Prado | BA | -39.38 | -17.30 |
| | ith | Itanhém | BA | -40.41 | -17.13 |
| | lag | Lagedão | BA | -40.30 | -17.67 |
| | tex | Teixeiras de Freitas | BA | -39.74 | -17.53 |
| | sea | Serra dos Aimorés | MG/BA | -40.25 | -17.81 |
| | ibi | Ibirapuã | BA | -40.15 | -17.68 |
| | muc | Mucuri | BA | -39.67 | -18.07 |
| | pin | Pinheiros | ES | -40,13 | -18,37 |
| | soo | Sooretama | ES | -40.16 | -19.02 |
| | lin | Linhares | ES | -40.02 | -19.15 |
| | flo | FloNa dos Goytacazes | ES | -40.08 | -19.41 |
| | sac | São Ant. do Canaã | ES | -40,65 | -19,84 |
| | stt | Santa Teresa | ES | -41.51 | -19.95 |
| | stl | Sta Leopoldina | ES | -40,53 | -20,10 |
| | car | Cariacica | ES | -40.46 | -20.26 |
| | dom | Domingos Martins | ES | -40.65 | -20.35 |
| | mar | Marechal Floriano | ES | -40.66 | -20.40 |
| | via | Viana | ES | -40.46 | -20.41 |
| | <i>Dinoponera australis</i> | | Uberlândia | MG | -48,27 |
| <i>Dinoponera gigantea</i> | | Belém | PA | -48,50 | -01,45 |
| <i>Dinoponera quadriceps</i> | | Manoel Vitorino | BA | -40,24 | -14,14 |
| <i>Pachycondyla crassinoda</i> | | Ilhéus | BA | -39,04 | -14,78 |
| <i>Pachycondyla verena</i> | | Iitororó | BA | -40,07 | -15,11 |

As seqüências mitocondriais *COI*, *COII* e *Cytb* foram parcialmente amplificadas por meio da técnica da reação de polimerase em cadeia (PCR), utilizando os oligonucleotídeos descritos na Tabela 2. A mistura de reação continha 1U de GoTaq® Flexi DNA Polymerase (PROMEGA), 10 µL (1X) de seu respectivo tampão, 1 µL (0.2 mM) de dNTP, 1 µL (5 mM/µL) de cada oligonucleotídeo, 2.5 µL (1.25 mM) de MgCl₂, 1 µL (50ng) de DNA total e água ultra-pura para um volume final de 25 µL. A amplificação foi conduzida com um passo de desnaturação inicial por 5 minutos a 94°C, 35 repetições do ciclo (50 s a 94°C; 1 min 20 s na temperatura de pareamento do

oligonucleotídeo; 1 min 20s a 72°C) e um passo final de extensão por 10 min a 72°C. As temperaturas de pareamento dos oligonucleotídeos podem ser verificadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Oligonucleotídeos utilizados para amplificação parcial dos genes COI/COII e *Cytb* em *D. lucida* e suas respectivas temperaturas de pareamento.

| Código | gene | Seqüência do oligonucleotídeo- 5'→ 3' | Temperatura |
|--------------------------|---------------------------|--|-------------|
| COICOIIF ^(a) | COI | TCTATACCACGACGTTATTC | 44°C |
| COICOII-R ^(a) | COII | GATCAATATCATTGATGACC | 44°C |
| COIaF ^(b) | COI | (C/T)ATACC(A/T)CGACG(A/T)TATTC(T/A)(G/A)AA(T/C)T | 50°C |
| COII-R ^(b) | COII | (C/G)(A/T)TCA(G/A)TATCATTGATGACCAAT(G/A/T)GA | 50°C |
| CB1 ^(c) | <i>Cytb</i> | TATGTACTACCATGAGGACAAATATC | 51°C |
| TRS ^(c) | <i>tRNA^{ser}</i> | TATTTCTTTATTATGTTTTCAAAC | 51°C |

(a) Hall & Smith, 1991

(b) Com base em seqüências de *Dinoponera lucida* deste trabalho.

(c) Jermiin & Crozier, 1994

Os produtos da amplificação de COI/COII foram purificados diretamente do gel de agarose (1,5%) utilizando-se o Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA) e ligados em Vetor pGEM®-T Easy Vector System (PROMEGA) conforme recomendações dos fabricantes. Os vetores foram utilizados para transformar células ultra-competentes de *E. coli* DH5a. Os clones transformantes foram selecionados por a-complementação, e os transformantes recombinantes por extração de plasmídeo por lise rápida de colônia. Os clones transformantes recombinantes foram selecionados, multiplicados e os plasmídeos recombinantes foram extraídos e purificado usando o Kit S.N.A.P Miniprep da INVITROGEN, conforme as instruções do fabricante. Os plasmídeos purificados foram utilizados para o seqüenciamento dos insertos utilizando seqüenciador automático modelo MegaBACE (GE-Healthcare) com oligonucleotídeos M13 específicos para o vetor de clonagem utilizado. Os produtos da amplificação parcial do *Cytb* foram purificados com a mistura de enzimas ExoSap-IT® (USB corporation) e diretamente seqüenciados com os mesmos oligonucleotídeos da amplificação.

As seqüências de DNA obtidas foram confirmadas por comparação com outras seqüências constantes no GenBank por meio da ferramenta BLAST (*Basic local alignment search tool*, Altschul *et al.*, 1990) disponível no endereço (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). A edição das seqüências foi feita visualmente com o auxílio do pacote de software PhredPhrap/Consed (Ewing *et al.*, 1998; Ewing & Green, 1998) e alinhadas utilizando o aplicativo Clustal_W (Higgins *et al.* 1994) através do programa MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007), que permite que os alinhamentos sejam feitos a partir das seqüências protéicas. Com isso, as seqüências codificadoras foram traduzidas, utilizando-se o código genético específico do DNA mitocondrial de invertebrados, alinhadas, e o programa retornou à seqüência de nucleotídeos, aumentando a confiabilidade dos alinhamentos. Os conjuntos de seqüências foram concatenados utilizando o programa PhyCon (Yotoko *et al.*, *em preparação*).

Árvores filogenéticas foram construídas por Inferência Bayesiana (BI) utilizando o programa MRBAYES 3.0b4 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). Para agilizar a construção das árvores, um modelo básico de substituição de nucleotídeos foi estimado com o auxílio do programa MrModeltest (Nylander, 2004) que fornece ao MrBayes os parâmetros que deverão ser estimados, de modo a evitar o excesso de parametrização dos modelos a serem utilizados na estimativa das topologias e tamanhos de ramos.

O programa ARLEQUIN 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005) foi utilizado para as análises de variância molecular – AMOVA - e índices de fixação F_{ST} , F_{CT} , F_{SC} (Excoffier *et al.*, 1992). A AMOVA foi realizada com três níveis hierárquicos, excluindo as localidades com apenas uma colônia amostrada. Foram consideradas como populações as colônias de uma mesma localidade e como grupos a formação proposta pelas análises filogenéticas.

Os índices de diversidade nucleotídica (p) e haplotípica (Hd) (Nei, 1987) foram estimados utilizando o programa DNASP (Rozas *et al.*, 2003). O índice de diversidade haplotípica (Hd) indica a probabilidade de dois haplótipos escolhidos ao acaso no conjunto de amostras serem diferentes. O índice de diversidade nucleotídica (p) indica o número médio de diferenças nucleotídicas entre os haplótipos calculados par a par (Nei, 1987).

O teste de Mantel, realizado com o auxílio do programa AIS - *Alleles in Space* (Miller, 2005) foi utilizado para estimar a correlação entre as distâncias genéticas e geográficas das colônias.

Na tentativa de estimar o tempo de coalescência das linhagens mitocondriais, foi feito um teste de razão de Verossimilhança (*Likelihood ratio test* - Felsenstein, 2004) entre a árvore construída sob o relógio e sem esta restrição. A verossimilhança da árvore sem a restrição do relógio molecular certamente é maior que a restrita, e o teste serve para verificar se a diferença é significativa. Caso a diferença não seja significativa, é possível considerar taxas evolutivas semelhantes entre os táxons analisados e calibrar o tempo de coalescência das linhagens a partir de dados da literatura para Ponerinae.

Uma rede de haplótipos foi construída por análise de median-joining (Bandelt *et al.*, 1999) utilizando o programa NETWORK 4.5 (www.fluxus-engineering.com).

RESULTADOS

VARIAÇÃO MITOCONDRIAL

A região *COI/COII* de *D. lucida* foi amplificada e os produtos PCR seqüenciados. O tamanho das seqüências obtidas foi de 575 pb. Destes, 210 pb correspondem à porção final do gene que codifica para *COI*, incluindo o códon de parada, 65 pb correspondem ao tRNA^{Leu} e 300 pb correspondem a uma parte inicial do gene que codifica para *COII*. Os 65 sítios resultantes do alinhamento entre as seqüências correspondentes ao tRNA^{Leu} mostraram-se muito conservados. Além disso, entre os grupos externos, as seqüências de tRNA^{Leu} apresentaram tamanhos diferentes, o que não permitiu um alinhamento confiável. Desta forma, esse conjunto de dados foi excluído das análises.

O gene *Cytb* foi parcialmente amplificado e os fragmentos PCR seqüenciados. O tamanho dos fragmentos de DNA obtidos foi de 639 pb.

A Tabela 3 mostra o número de sítios variáveis, a composição de bases e a distância-*p* (número de sítios diferentes/número total de sítios) entre os pares de seqüências dos indivíduos de *D. lucida*, para os quatro conjuntos de dados *COI/ tRNA^{Leu}/COII/Cytb*.

Tabela 3 – Número de sítios, composição de bases e distância-*p* entre os pares de seqüências para os quatro conjuntos de dados *COI/ tRNA^{Leu}/COII/Cytb* em *D. lucida*.

| | Nº de sítios | C | V | PI | S | %T | %C | %A | %G | Distância- <i>p</i> * |
|---------------------------|--------------|-----|-----|-----|---|------|------|------|------|-----------------------|
| COI | 210 | 167 | 43 | 37 | 6 | 46.5 | 17.1 | 29.9 | 6.4 | 0.041 |
| tRNA^{Leu} | 65 | 58 | 7 | 4 | 3 | 41.0 | 9.3 | 38.7 | 10.9 | 0.014 |
| COII | 300 | 222 | 78 | 69 | 9 | 48.2 | 13.0 | 35.1 | 3.7 | 0.050 |
| Cytb | 639 | 488 | 151 | 142 | 9 | 45.9 | 16.8 | 30.3 | 6.9 | 0.060 |

C – Número de sítios conservados; V – sítios variáveis; PI – Sítios parcimoniosamente informativos; S – *singletons*; * Média de todas as distâncias par-a-par.

ANÁLISES FILOGENÉTICAS

A Figura 3 mostra a árvore filogenética reconstruída com base na região que compreende os genes COI/COII concatenados, utilizando-se 3.000.000 de gerações para a cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC), eliminando as 500.000 árvores iniciais. Para cada gene foi estimado um modelo evolutivo para a estimativa da árvore bayesiana contendo todos os genes concatenados. Definindo *Pachycondyla verenae* como grupo externo, *D. lucida* aparece como um grupo parafilético que contém *D. australis*, *D. gigantea* e *P. crassinoda*.

A Figura 4 mostra a árvore filogenética reconstruída a partir dos dados de seqüências do *Cytb* utilizando inferência bayesiana com 1.500.000 gerações para MCMC e eliminando as 250.000 primeiras árvores. Com este conjunto de dados, considerando as duas espécies de *Pachycondyla* como grupo externo, *D. lucida* aparece como um grupo parafilético que contém *D. gigantea*. As demais espécies de *Dinoponera* apareceram como grupos irmãos de *D. lucida*.

A Figura 5 mostra a árvore reconstruída por inferência bayesiana com 10.000.000 de gerações para MCMC eliminando-se as 3.000.000 de árvores iniciais a partir dos dados concatenados de COI/COII/*Cytb*. Para cada gene foi estimado um modelo evolutivo para a estimativa da árvore bayesiana contendo todos os genes concatenados. Novamente, *D. lucida* foi parafilético em relação a *D. gigantea*.

A Figura 6 mostra a árvore não enraizada contendo apenas indivíduos de *D. lucida*, reconstruída pelo método bayesiano com 3.000.000 de gerações de MCMC eliminando-se as 500.000 árvores iniciais a partir dos dados concatenados de COI/COII/*Cytb*.

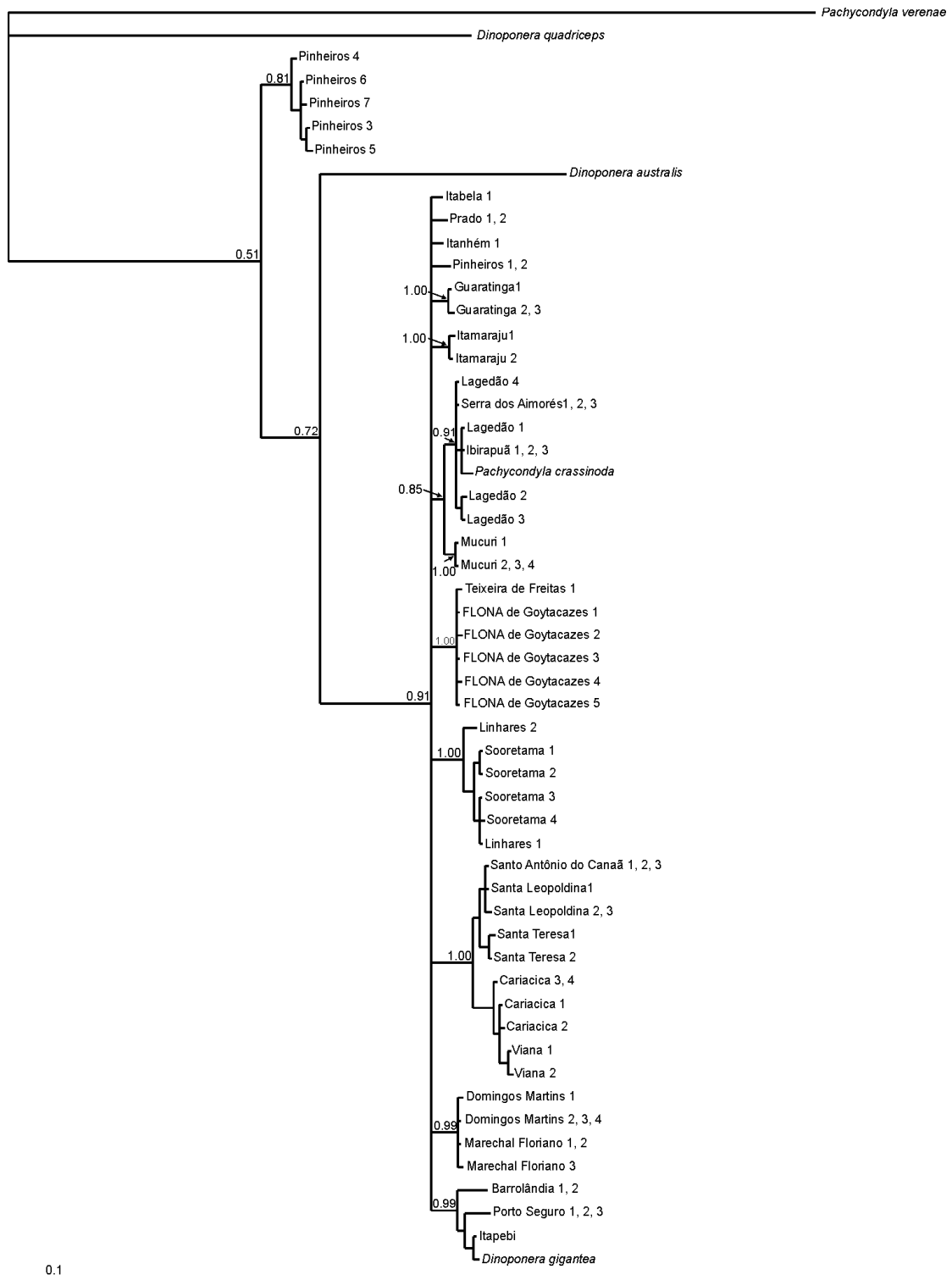


Figura 3. Árvore consenso de duas cadeias, cada uma com 3.000.000 de gerações para MCMC, eliminando-se 500.000 árvores iniciais de cada uma, reconstruída por inferência bayesiana levando em conta modelos de substituição diferentes para cada subconjunto das seqüências COI/COII de *D. lucida* e do grupo externo. Os indivíduos de *D. lucida* estão representados pelo local de coleta e o número da colônia amostrada. Probabilidades posteriores estão exibidas ao lado dos nós.

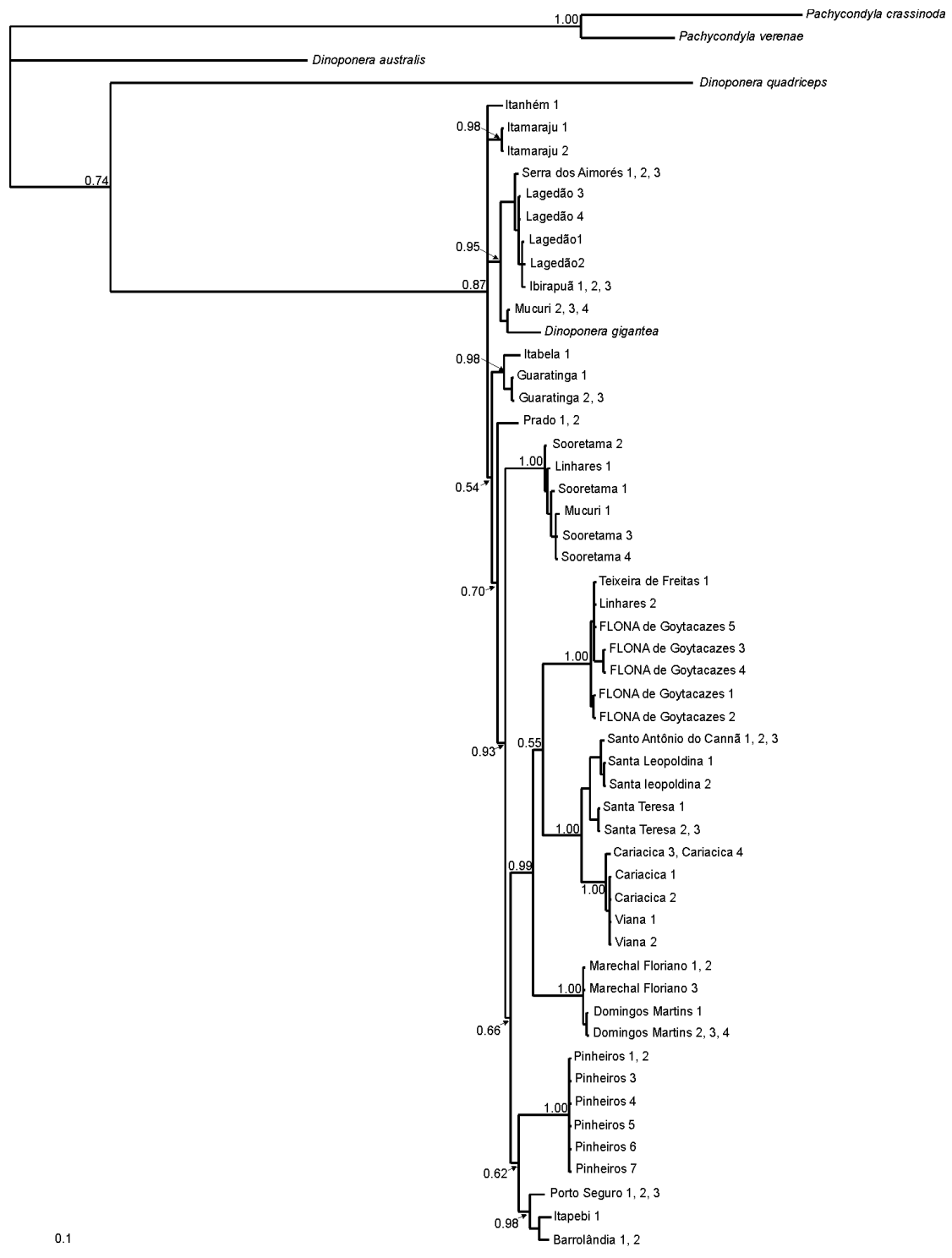


Figura 4. Árvore consenso de duas cadeias, cada uma com 1.500.000 gerações para MCMC, eliminando-se 250.000 árvores iniciais de cada uma, reconstruída por inferência bayesiana com base nas seqüências *Cytb* de *D. lucida* e do grupo externo, levando em conta um modelo de substituição. Os indivíduos de *D. lucida* estão representados pelo local de coleta e o número da colônia amostrada. Probabilidades posteriores estão exibidas ao lado dos nós.

ESTIMATIVAS DE DIVERSIDADE

A Tabela 4 mostra o resultado da análise de variância molecular AMOVA e a Tabela 5 os resultados para os índices de diversidade nucleotídica e haplotípica.

Tabela 4. Análise de variância molecular – AMOVA (Excoffier *et al.*, 1992) considerando como populações os indivíduos de uma mesma localidade. Foram considerados como grupos os agrupamentos identificados na Figura 6.

| Fonte de Variação | Graus de Liberdade | Soma dos quadrados | Componentes de Variância | Porcentagem de Variação |
|---------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------------|-------------------------|
| Entre grupos | 6 | 1.473,1080 | 22,0790 | 62,25 |
| Entre populações/ dentro de grupos | 12 | 389,6770 | 10,1979 | 28,75 |
| Dentro de populações | 46 | 146,8000 | 3,1913 | 9,00 |
| Total | 64 | 2.009,585 | 35,4690 | |

Teste de significância com 10.000 permutações. $P < 0,000001$ para os três níveis hierárquicos.

Índices de Fixação: $F_{ST}=0,91003$, $F_{CT}=0,62251$, $F_{SC}=0.76165$

Os resultados da AMOVA mostraram que a menor porção da variação encontra-se entre os indivíduos de uma mesma população (conjunto de indivíduos de uma mesma localidade). A maior porção da variação foi observada entre os grupos propostos (conjunto de populações que ocorrem próximas geograficamente). Índices de fixação F_{ST} , F_{CT} , F_{SC} . muito altos foram observados. O F_{ST} é definido como a correlação entre pares de haplótipos aleatórios dentro das populações, relativo a pares aleatórios de haplótipos extraídos de toda amostragem, o F_{CT} como a correlação entre pares de haplótipos aleatórios dentro de um dos grupos propostos *a priori*, relativo a pares aleatórios de haplótipos extraídos de toda amostragem, e o F_{SC} como a correlação entre pares de haplótipos dentro das populações,

relativo a pares aleatórios de haplótipos extraídos do grupo (Excoffier *et al.*, 1992).

Tabela 5. Índices de diversidade nucleotídica (p) e haplotípica (Hd) (Nei, 1987).

| | p | Hd |
|-----------------------|--------|--------|
| Dentro das populações | 0,0031 | 0,6577 |
| Dentro dos grupos | 0,0139 | 0,9145 |
| Dentro da espécie | 0,0546 | 0,9879 |

Observou-se uma diversidade nucleotídica muito baixa entre os indivíduos de uma mesma população. A diversidade nucleotídica é muito menor dentro de populações do que dentro dos grupos, que por sua vez é menor que na espécie como um todo. A diversidade haplotípica é alta nos três níveis sendo menor dentro das populações. Poucos haplótipos compartilhados foram observados, e estes se encontram dentro das populações. A existência de muitos haplótipos exclusivos entre as populações justifica os altos índices de diversidade haplotípica.

TESTE DE MANTEL

O teste de Mantel, realizado com 10.000 permutações indicou uma correlação entre a matriz de distâncias genéticas (Distância- p) e a matriz de distâncias geográficas de $r = 0,3304$ ($P < 0,001$). A correlação determinada foi baixa, porém positiva e significativa (Figura 7). Esta correlação indica que parte do isolamento genético das populações pode ser explicado pelo isolamento geográfico que causa restrição do fluxo de fêmeas entre as populações com o aumento da distância.

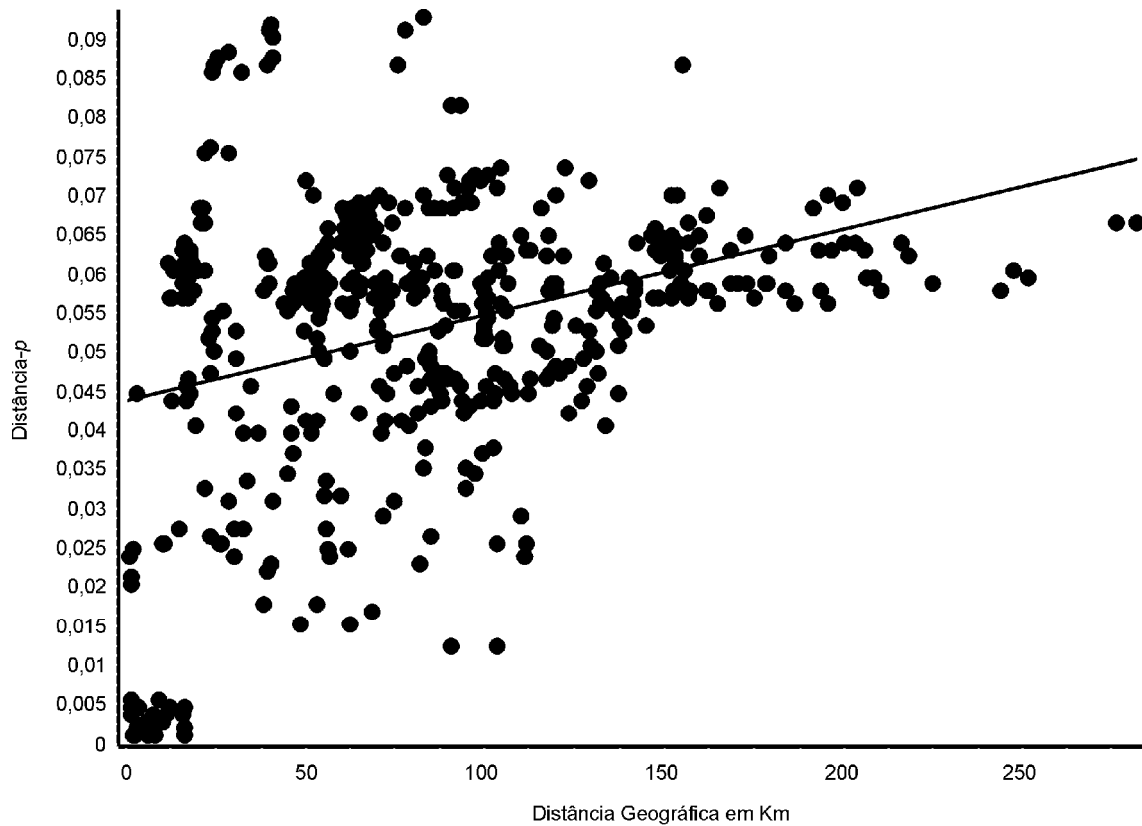


Figura 7. Distribuição das correlações par a par entre as distâncias genéticas e distâncias geográficas dos indivíduos de *D. lucida* estimadas pelo teste de Mantel com 10.000 permutações. $r = 0,3304$ ($P < 0,001$).

ESTIMATIVA DO TEMPO DE COALESCÊNCIA

Jermiin & Crozier (1994) estimaram o tempo de divergência do gene *Cytb* na formiga *Tetraponera rufoniger*. Esta estimativa poderia ser usada para calibrar o relógio molecular neste estudo. Sendo assim, o teste de razão de Verossimilhança (*LRT*) foi conduzido a partir das árvores filogenéticas construídas utilizando apenas as seqüências de *Cytb*. O valor de verossimilhança da árvore sem relógio molecular foi de $-\ln L = 4339.62339$, e com relógio foi de $-\ln L = 4500.12215$. O logaritmo de verossimilhança para a árvore com relógio é significativamente menor do que o valor desconsiderando o relógio ($\chi^2 = 320.99$, 53 g.l., $P < 0,01$). Isso implica que, seguindo o *LRT*, o relógio molecular não se aplica para a filogenia inferida. As árvores filogenéticas reconstruídas a partir das seqüências *Cytb* (Figura 4)

confirmam os resultados obtidos pelo *LRT* indicando que as seqüências do *Cytb* de *D. lucida* não evoluem numa taxa constante com as outras espécies usadas na análise. O tamanho de ramos para a espécie *D. lucida* é bem menor do que o tamanho de ramos das espécies utilizadas como grupo externo. Se for considerado que essas espécies descendem de um ancestral comum, tamanhos de ramos diferentes indicam taxas de substituição diferentes entre as espécies. Desta forma não foi possível calibrar um tempo de divergência entre os clados.

REDE DE HAPLÓTIPOS

A rede de haplótipos construída com base nas seqüências de *COI/COII/Cytb* (Figura 8) apresenta-se em forma de estrela. O centro da rede mostrou uma reticulação entre haplótipos perdidos ou não amostrados com poucos passos mutacionais entre eles.

Nas extremidades da rede, os haplótipos amostrados formam grupos relacionados com a distribuição geográfica, mostrando que indivíduos próximos geograficamente descendem de uma mesma linhagem a partir de um centro de origem. Uma exceção são os indivíduos de Domingos Martins e Marechal Floriano que descendem de uma linhagem mitocondrial distinta dos indivíduos de Cariacica e Viana apesar de estarem próximos geograficamente.

Ramos longos, com muitos passos mutacionais, separam o centro das extremidades da rede. Os ramos são maiores para os indivíduos localizados mais ao sul da distribuição da espécie.

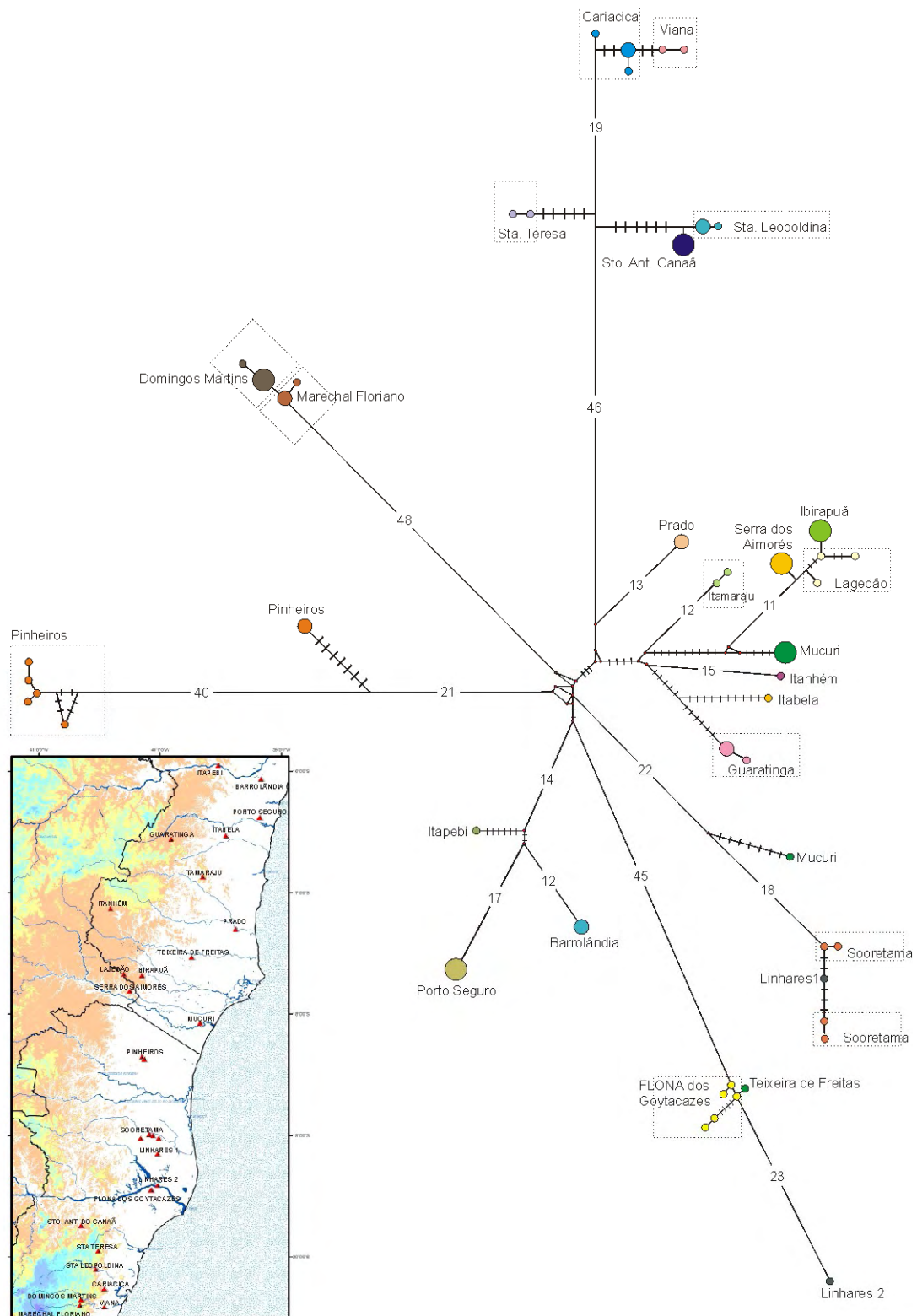


Figura 8. Rede de haplótipos construída por *median-joining network*, a partir de seqüências de *COI*, *COII* e *Cytb* de 69 indivíduos de *D. lucida*. Os passos mutacionais são representados por traços nos ramos. Mais de 10 passos foram representados por números indicando o total dos passos mutacionais entre os dois nós.

DISCUSSÃO

DEFINIÇÃO DO MELHOR CONJUNTO DE DADOS

A hipótese filogenética feita a partir da análise das seqüências COI/COII mostrou a subdivisão da espécie em vários grupos que estão, de certa forma, relacionados à proximidade geográfica entre os pontos de coleta dos ninhos, além de ter mostrado que *D. lucida* pode não ser um grupo monofilético. Isso implica que o grupo taxonômico conhecido como *D. lucida* pode não ser uma espécie bem definida ou que a região seqüenciada neste estudo não foi capaz de resolver a filogenia dentro do gênero.

Considerando apenas as seqüências COI/COII, com a exclusão dos 65 sítios correspondentes ao tRNA^{Leu}, 210 sítios de COI e 300 sítios de COII foram utilizados. Seqüências COI/COII maiores, foram analisadas por Beibl *et al.* (2007) para estudar a filogenia e filogeografia de espécies de formigas do gênero *Chalepoxenus* e *Temnothorax*. O conjunto de dados utilizado por estes autores continha 789 pb de COI e 531 pb de COII, e as relações filogenéticas entre os gêneros foram estabelecidas. É possível que a seqüência utilizada no presente trabalho não tenha sido útil na separação entre as espécies por ser pequena e abranger uma região do tRNA^{Leu} que apresentava pouco polimorfismo.

A hipótese filogenética feita a partir da análise das seqüências *Cytb* mostrou que *D. lucida* pode ser parafilética em relação a *D. gigantea*. Como o banco de DNA continha apenas uma amostra dessa espécie, optou-se então por descartar este indivíduo das análises até que se possam conseguir novas seqüências da espécie *D. gigantea*.

Russo *et al.* (1996) testaram a eficiência de diferentes genes mitocondriais e suas combinações para reconstruir uma dada árvore filogenética reconhecida por especialistas de diferentes áreas, para vertebrados. Os autores concluíram que os genes de tamanho maiores e o conjunto de todos os genes apresentaram as melhores árvores. No presente trabalho foram também analisadas seqüências de diferentes genes e suas combinações (COI, COII, *Cytb*, COICOII, COI*Cytb*, COII*Cytb* e COICOII*Cytb*)

e as árvores filogenéticas reconstruídas a partir destas combinações foram comparadas (*dados não apresentados*). Grupos bastante similares foram observados. Assim, optou-se por utilizar o conjunto de 1149 pb resultantes da concatenação das seqüências de *COI*, *COII* e *Cytb* de *D. lucida*. Neste caso, a hipótese filogenética mostrou que *D. lucida* pode ser parafilética em relação a *D. gigantea*. Devido à impossibilidade de testar este resultado com outras amostras de *D. gigantea* conforme discutido anteriormente, optamos por desconsiderar o indivíduo *D. gigantea* e trabalhar com a hipótese de que *D. lucida* seja monofilética.

RELAÇÕES FILOGENÉTICAS

A árvore reconstruída com *Cytb* mostrou uma relação filogenética mais próxima entre as espécies *D. lucida* e *D. quadriceps* do que entre as espécies *D. lucida* e *D. australis*. Isto pode ser um importante indício biogeográfico para as relações dentro do gênero *Dinoponera*, uma vez que *D. quadriceps* ocorre de forma alopátrica, mais próxima geograficamente de *D. lucida* do que dos indivíduos de *D. australis* usados neste estudo. Isto deve ser comprovado com estudos contendo populações diferentes destas espécies.

A árvore não enraizada obtida com seqüências parciais de *COI/COII/Cytb* de *D. lucida* (Figura 6) mostra sete grupos principais, relacionados com a distribuição geográfica. Este padrão evidencia que os ninhos mais próximos geograficamente guardam relações filogenéticas próximas. Um ninho de Mucuri e outro de Teixeira de Freitas não seguiram esse padrão e devem ser reamostrados.

Os resultados da AMOVA indicando baixa variabilidade genética dentro das populações e maior variabilidade entre os grupos confirmam a estruturação da espécie em grupos relacionados com as proximidades geográficas. A baixa diversidade nucleotídica dentro das populações (0,0031) em relação à diversidade nucleotídica total observada para a espécie (0,0546) mostra que, apesar da alta diversidade haplotípica, os haplótipos de uma mesma população são muito similares entre si. A diversidade

nucleotídica é muito menor dentro de populações do que dentro dos grupos, que por sua vez é menor que na espécie como um todo.

Os resultados acima são interpretados como resultado do efeito fundador, devido ao comportamento de expansão de novos ninhos de *D. lucida*. A expansão da população se dá por eventos únicos de migração, ou de pequenos grupos de migrantes para novos locais adjacentes, com subsequente aumento do número de ninhos por eventos de fissão de colônias. Desta forma, os ninhos mais próximos são mais aparentados, pois derivam de uma única ou poucas colônias. A baixa diversidade entre colônias próximas também foi observado na formiga Ponerinae *Diacamma cyaneiventre* (Doums *et al.*, 2002).

Os índices de diversidade e de fixação indicam uma alta estruturação do DNA mitocondrial da espécie *D. lucida*. Parte dessa estruturação pode estar associada ao comportamento de fundação de novos ninhos com limitações quanto à distância percorrida pela fêmea, fazendo com que ninhos mais próximos geograficamente descendam de uma mesma linhagem mitocondrial. Altos valores de F_{st} também mostraram altos índices de estruturação das populações de outras formigas de dispersão com restrito fluxo de fêmeas, como é o caso de *Formica exsecta*: $F_{st}=0.72$ (Liutard & Keller, 2001) e *Diacamma cyaneiventre*: $F_{st}= 0.75$ (Doums *et al.*, 2002).

REDE DE HAPLÓTIPOS

A rede de haplótipos mostrou em seu centro (Figura 9) a existência de pelo menos 6 haplótipos ancestrais inferidos para todas as linhagens mitocondriais amostradas.

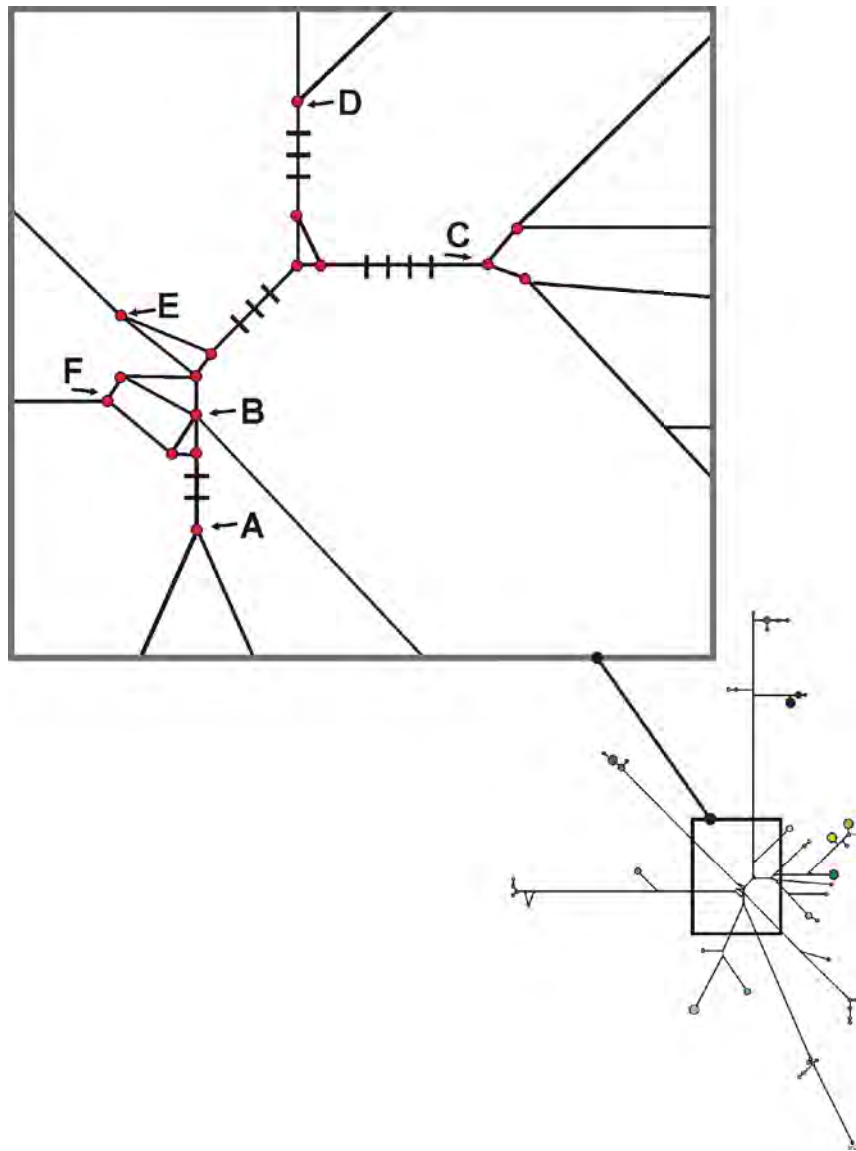


Figura 9. Ampliação do centro da rede de haplótipos indicando 6 haplótipos ancestrais inferidos para as linhagens mitocondriais atuais de *D. lucida*.

Os haplótipos ancestrais inferidos foram extintos, ou não foram amostrados, e estão relacionados entre si com poucos passos mutacionais. Isso pode indicar a existência de um gargalo genético ocorrido no passado, provocado pela redução da espécie a poucas populações ou a uma única população com baixa variabilidade genética. Devido a esta descendência comum a partir de poucos haplótipos, ninhos coletados distantes geograficamente coalescem a um mesmo haplótipo ancestral comum inferido (Figura 10). As colônias destacadas foram coletadas no extremo norte da

distribuição da espécie (Itapebi, Barrolândia e Porto Seguro/ BA) e na Floresta Nacional dos Goytacazes (FloNa dos Goytacazes), município de Linhares, na região central do Espírito Santo.

A partir desse haplótipo ancestral, as populações derivadas se diferenciaram, porém guardando relações ancestrais. Com a migração das populações ocupando novas áreas pode-se esperar um isolamento por distância (Wright, 1943) uma vez que, apesar da ausência de barreiras físicas, o fluxo gênico é limitado com o aumento da distância entre as colônias. As fêmeas de *D. lucida* não são capazes de voar e por isso, o fluxo gênico mitocondrial estará restrito à capacidade e possibilidade de caminhada das fêmeas entre as populações isoladas. Áreas muito abertas (sem florestas) ou muito distantes podem representar assim uma barreira. A correlação $r=0,33$ entre as distâncias genéticas e as distâncias geográficas mostra que apenas parte da estruturação da espécie reflete o isolamento por distância. O isolamento por distância estaria acontecendo naquelas linhagens mitocondriais descendentes de uma mesmo haplótipo ancestral inferido que, percorrendo longas distâncias geográficas, tornaram-se mais distintas geneticamente. Isso gera então uma estruturação da população em relação à proximidade genética. Uma vez que o fluxo gênico mitocondrial está limitado pela distância geográfica, ninhos mais próximos geograficamente são também mais próximos geneticamente.

Entretanto não foi observada em todas as colônias analisadas a proximidade genética entre ninhos próximos geograficamente. Verificou-se, por exemplo, que colônias localizadas em Cariacica e Viana são geneticamente mais relacionadas com colônias de Santa Teresa, Santo Antônio do Canaã e Santa Leopoldina, apesar de estarem mais próximas geograficamente de Domingos Martins e Marechal Floriano (Figura 11). Isto sugere a colonização de locais próximos por linhagens mitocondriais descendentes de diferentes haplótipos ancestrais. Essa colonização se deu de forma que as populações ocuparam locais adjacentes, mas não ocorreu fluxo gênico mitocondrial entre essas populações.

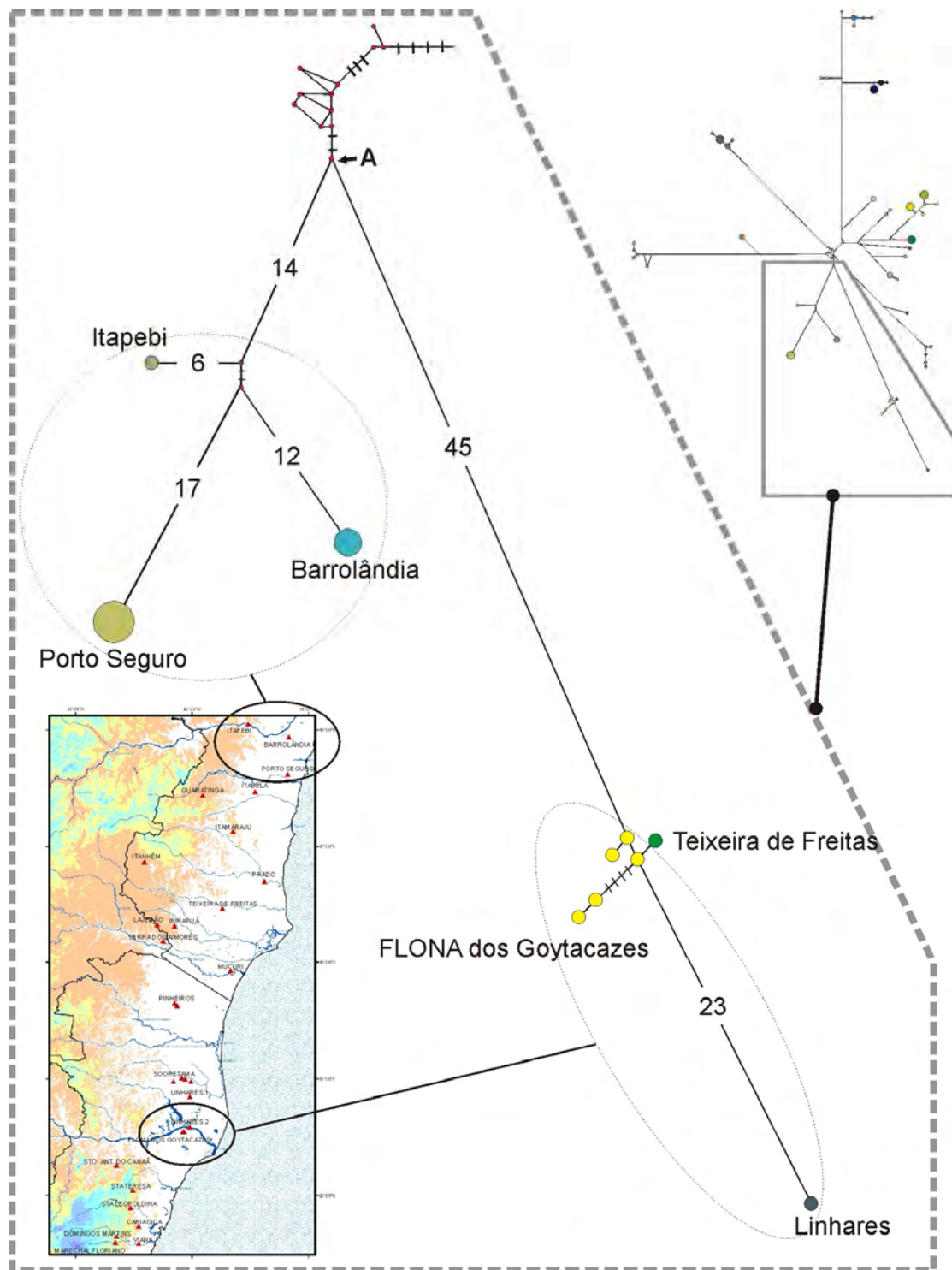


Figura 10. Ampliação de parte da rede de haplótipos, mostrando duas linhagens mitocondriais distantes geograficamente que descendem de um ancestral comum "A" inferido.

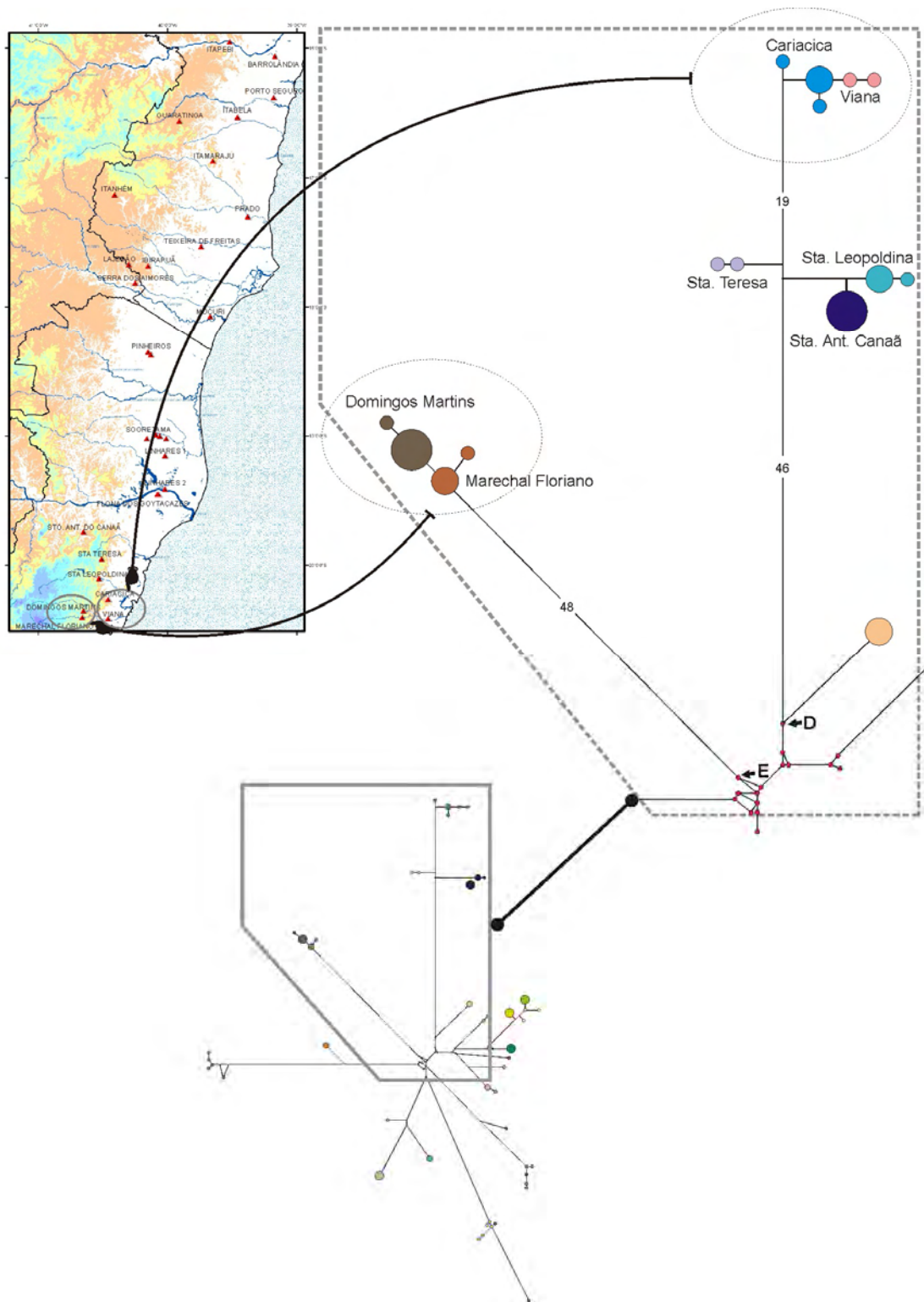


Figura 11. Ampliação de parte da rede de haplótipos, mostrando linhagens mitocondriais próximas geograficamente que descendem de diferentes haplótipos ancestrais inferidos “D” e “E”.

O haplótipo ancestral “A” deu origem às linhagens mitocondriais coletadas em Itapebi (BA), Barrolândia (BA), Porto Seguro (BA), Linhares2 (ES, colônia coletada ao sul do Rio Doce) e FloNa dos Goytacazes (Linhares, ES). O ninho de Teixeira de Freitas também está relacionado a esta linhagem, mas nesse caso pode ter havido erro de identificação da amostra. O haplótipo ancestral “B” deu origem às linhagens mitocondriais coletadas em Sooretama (ES) e Linhares1 (ES, ninho coletado ao norte do Rio Doce). Um ninho de Mucuri também está relacionado a esta linhagem, mas também nesse caso pode ter havido erro de identificação da amostra. O haplótipo ancestral “C” deu origem às linhagens mitocondriais coletadas em Guaratinga, Itabela, Itanhém, Mucuri, Lagedão, Ibirapuã e Lagedão (BA) e Serra dos Aimorés (divisa de MG/BA). O haplótipo ancestral “D” deu origem às linhagens mitocondriais coletadas em Prado (BA), Santo Antônio do Canaã, Santa Teresa, Santa Leopoldina, Cariacica e Viana (ES). O haplótipo ancestral “E” deu origem às linhagens mitocondriais coletadas em Domingos Martins e Marechal Floriano (ES). O haplótipo ancestral “F” deu origem às linhagens mitocondriais coletadas em Pinheiros (ES). Novas análises serão realizadas para aquelas amostras onde se acredita ter havido erro de identificação. Levando em consideração esta possibilidade, os haplótipos que representam um dos ninhos de Mucuri e o ninho de Teixeira de Freitas, foram excluídos da discussão dos resultados até que se possam realizar novas amostragens.

Longos ramos, com muitos passos mutacionais, foram observados na rede de haplótipos. Eles podem ser explicados pelo acúmulo de mutações provavelmente fixadas por deriva devido ao efeito fundador que acompanha o comportamento de dispersão dos ninhos. Os longos ramos podem ainda estar relacionados à perda de haplótipos intermediários ao longo das gerações. A perda de haplótipos intermediários em populações com limitado fluxo gênico gera uma estruturação filogeográfica com padrão descontínuo de divergência genética (Categoria I) conforme proposto por Avise *et al.* (1987).

HIPÓTESE SOBRE OS FATORES EVOLUTIVOS RELACIONADOS À DIVERSIFICAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE *D. lucida*

Uma vez que a distribuição atual de *D. lucida* está restrita a uma faixa que acompanha a linha da costa leste do Brasil desde o Espírito Santo até o sul da Bahia, espera-se que os eventos geológicos que influenciaram o paleoambiente local interferiram na estrutura filogeográfica da espécie.

A herança geológica, variações no nível do mar e suas implicações nas mudanças climáticas são os principais processos condicionantes da formação do litoral brasileiro (Tessler & Goya, 2005).

Um processo fitogeográfico descontinuado de longa duração (2 a 3 milhões de anos) permitiu o estabelecimento de mosaicos de florestas com biomas distintos por toda a costa leste do Brasil. Um dos mais sérios processos de fragmentação da tropicalidade incidente sobre a América do Sul aconteceu a partir de aproximadamente 2 milhões de anos A.P. (Ab'Saber, 2001). A expansão de um clima seco provocou a redução descontínua de florestas em redutos climaticamente favoráveis, os quais preservaram a biota florestal e permitiu o refúgio da fauna, fato este conhecido como a Teoria dos Refúgios Ecológicos (Brown Jr. & Ab'Saber, 1979). O estabelecimento deste clima seco no litoral brasileiro está relacionado às flutuações do nível do mar durante o Quaternário. Há aproximadamente 17.000 anos, o nível relativo do mar esteve 110 m abaixo do nível atual (Suguio *et al.*, 1988) durante o máximo da última glaciação pleistocênica.

Em relação à atual área de distribuição da espécie *D. lucida* uma importante unidade biogeográfica é a “Península de Abrolhos” (Anexo 2) proposta por Schaefer *et al.* (2006). Recuperando dados sedimentológicos e geoquímicos da plataforma submersa de Abrolhos, os autores inferiram sobre as condições paleo-ambientais nesta região durante a última glaciação.

Com a regressão marinha e conseqüente exposição da plataforma continental ocorre a formação da “Península Abrolhos” sendo que ao norte da “Península” condições bem mais úmidas enquanto que os setores central e sul da “Península” apresentavam condições semi-áridas. As condições mais úmidas do paleo-ambiente possibilitaram a formação de áreas de refúgios

florestais mais extensos ao norte e a semi-aridez provocou a redução das florestas nas regiões central e sul da “Península” em redutos florestais menores e disjuntos.

Com o processo de aquecimento iniciado há 12.000 anos, o derretimento das geleiras estocadas em regiões polares e altas cordilheiras provocou a ascensão no nível do mar e as mudanças climáticas permitiram o reestabelecimento das florestas nas áreas atuais.

Supondo que os acontecimentos dos últimos três milhões de anos tenham ocorrido conforme o descrito acima, pode-se traçar uma história, com três momentos distintos, que ajudaria a explicar a diversificação e estruturação filogeográfica em *D. lucida*.

Num primeiro momento, 2 a 3 milhões de anos A.P., a existência de florestas pode ter permitido a diversificação de diferentes populações de *D. lucida*, acarretando parte da variação hoje observada. Uma vez que o fluxo gênico mitocondrial depende da capacidade de dispersão das fêmeas e esta dispersão está restrita à sua possibilidade de caminhar e considerando o comportamento agregado dos ninhos (Peixoto, 2006), mesmo em florestas contínuas é possível ocorrer a estruturação das populações com isolamento por distância. Os longos ramos observados na rede de haplótipo sugerem uma estruturação antiga das populações.

Num segundo momento, com a regressão do nível do mar durante as várias glaciações e o estabelecimento do clima seco na região, a partir de 2 milhões de anos A.P., a espécie provavelmente se estabeleceu em diferentes refúgios florestais. Nestes períodos, as áreas mais ao norte da “Península de Abrolhos” por ser mais úmida e apresentar refúgios florestais mais extensos, pode ter sido utilizado como reduto de populações maiores que permitiu fluxo gênico mitocondrial entre as populações remanescentes. Isso pode explicar os menores tamanhos de ramos da rede de haplótipos entre as populações ao norte da distribuição atual da espécie, desde Mucuri até Itapebi, no sul da Bahia.

Na parte central e sul da “Península de Abrolhos”, o estabelecimento de climas mais secos reduziu as formações florestais a refúgios menores e disjuntos que podem ter abrigado populações menores, provocando o isolamento mais antigo das populações nestas áreas. Isso pode explicar os

longos ramos da rede de haplótipos das populações que se distribuem desde Pinheiros até Marechal Floriano, no Espírito Santo. Nestes refúgios florestais menores e disjuntos as populações de *D. lucida* sendo menores sofrem maior efeito da deriva genética e assim, as mutações se acumulam de forma mais rápida. Isso pode ser observado, por exemplo, nas populações de Domingos Martins e Marechal Floriano isoladas de Cariacica e Viana por muitos passos mutacionais. Mesmo estando relativamente próximas geograficamente estas populações podem descender de ancestrais que se refugiaram em áreas disjuntas e, por isso, estão isoladas geneticamente há mais tempo. Com o fim das glaciações pleistocênicas e a expansão das florestas as áreas atuais puderam ser colonizadas.

A modificação da rede de haplótipos (Figura 13) facilita visualizar a estruturação das populações de *D. lucida* em relação à possível barreira geográfica representada pela “Península de Abrolhos” durante o Pleistoceno. O centro da rede pode representar haplótipos extintos durante o estabelecimento do clima seco na região. Na parte superior da rede de haplótipos, com menores tamanhos de ramos, as populações que ocupam atualmente o sul da Bahia, descendentes de ancestrais que possivelmente se refugiaram nos extensos redutos florestais formados na porção mais úmida ao norte do paleo-ambiente da “Península de Abrolhos”. Na parte inferior da rede de haplótipos, com longos ramos, as populações que ocupam atualmente o Espírito Santo, descendentes de ancestrais que provavelmente se refugiaram nos redutos florestais menores e disjuntos e, por isso, estão isoladas há mais tempo. Conforme explicado anteriormente um dos ninhos de Mucuri e o ninho de Teixeira de Freitas foram excluídos da discussão dos resultados até que se possam realizar novas amostragens.

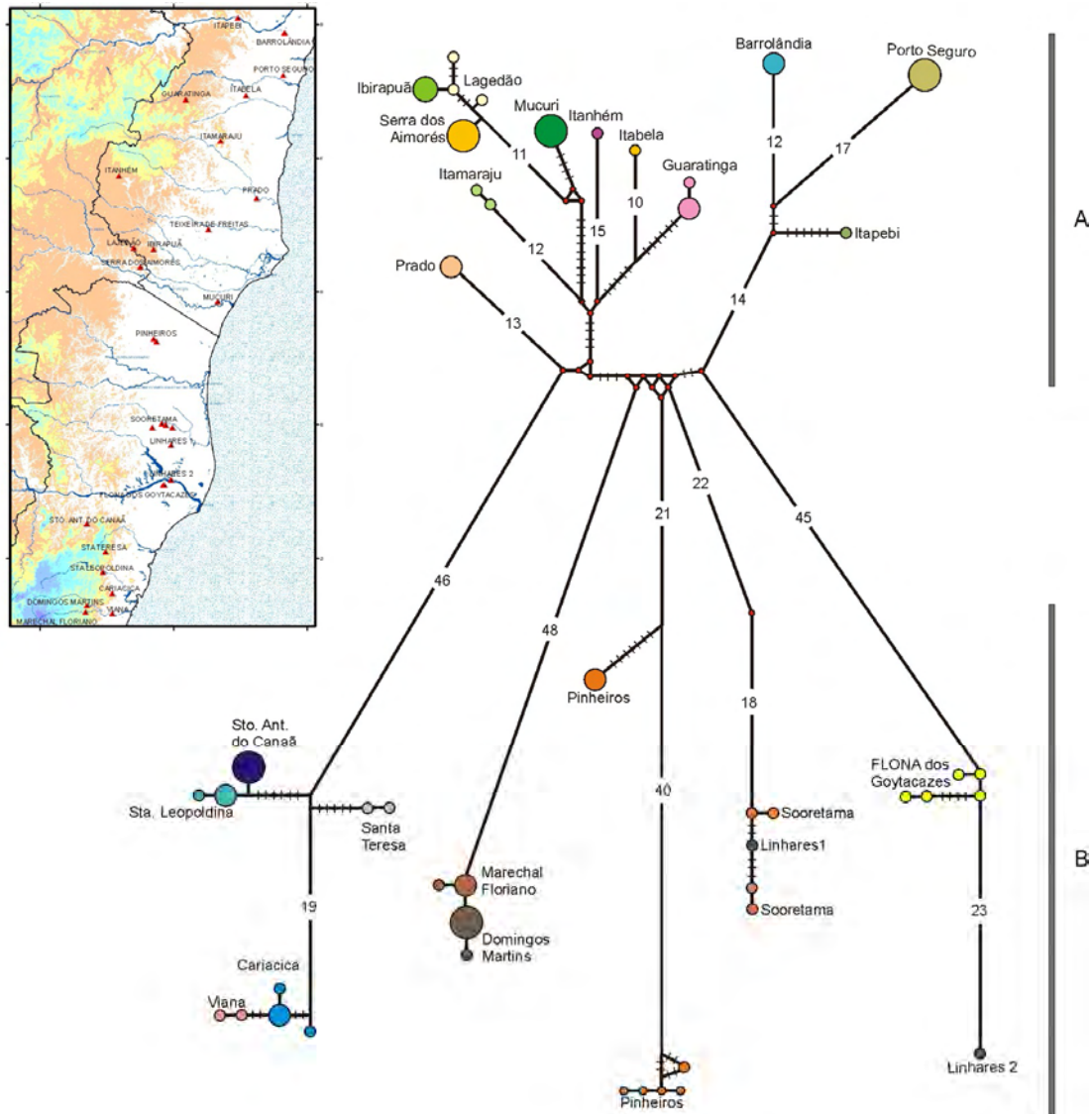


Figura 13. Modificação da rede de haplótipos construída por *median-joining network*, a partir de seqüências de *COI*, *COII* e *Cytb* de 69 indivíduos de *D. lucida* em relação à possível barreira biogeográfica “Península de Abrolhos” (Anexo 2)(Schaefer *et al.*, 2006). A barra “A” representa os haplótipos descendentes de ancestrais que possivelmente se refugiaram ao norte da “Península de Abrolhos”. A barra “B” representa os haplótipos descendentes de ancestrais que possivelmente se refugiaram ao sul da “Península de Abrolhos”.

PERDA DE HAPLÓTIPOS E ISOLAMENTO DAS POPULAÇÕES EM REFÚGIOS FLORESTAIS MODERNOS: CONSEQÜÊNCIAS PARA A CONSEVAÇÃO DE *D. lucida*.

O “Plano de Manejo de *Dinoponera lucida* Emery, a Formiga Gigante do Corredor Central da Mata Atlântica” concluiu que a espécie ocorre em Florestas Ombrófilas Densas, em diferentes níveis de regeneração e/ou perturbação e também em Florestas Estacionais Semi-decíduais, em estágios avançados e secundários médios de regeneração; florestas sobre tabuleiros em estágios avançados, médios e iniciais; e também pode sobreviver em Cabucas, sistema de cultivo do cacau, onde o sub-bosque da floresta é retirado e substituído pelas plantas de cacau, mantendo-se as árvores de dossel (Delabie, 2004).

Com o intenso desmatamento da Mata Atlântica as áreas remanescentes que podem acolher populações de *D. lucida* estão reduzidas e muito isoladas. Estas áreas representam refúgios ecológicos modernos para espécie e as populações amostradas nestes locais apresentaram haplótipos exclusivos não encontrados em nenhum outro lugar da distribuição atual da espécie. A perda de áreas naturais possivelmente representou também a perda de haplótipos intermediários e a consequência disto é que as populações remanescentes não compartilham haplótipos.

Sendo assim, as populações remanescentes representam histórias evolutivas únicas e a perda de qualquer uma delas não pode ser substituída ou compensada pela conservação de nenhuma outra. Isto implica a necessidade de esforços conservacionistas que visem preservar o máximo possível das áreas remanescentes que ainda abrigam populações de *D. lucida*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho contribuiu para o entendimento de que a estruturação filogeográfica mitocondrial das populações de *D. lucida* não pode ser explicada por um único evento. É, provavelmente, o resultado de processos múltiplos que alteraram a paisagem com implicações no estabelecimento das populações.

Os fatores sugeridos para explicar a estrutura filogeográfica encontrada são: (a) estruturação devido ao isolamento por distância, das populações ancestrais anteriores ao Pleistoceno; (b) isolamento das populações durante o Pleistoceno pela barreira biogeográfica “Península de Abrolhos”; (c) Manutenção de populações nos refúgios ecológicos durante as glaciações do Quaternário, possivelmente com mais fluxo gênico entre as populações ancestrais ao norte da “Península” e mais isolamento entre as populações ancestrais ao sul da “Península” (d) Perda de haplótipos intermediários e isolamento das populações em refúgios florestais modernos que abrigam populações com haplótipos exclusivos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ab'Saber AN (2001) *Litoral do Brasil*. Metalivros, São Paulo.

Aguiar AP, Chiarello AG, Mendes SL, Matos EM (2005) Os Corredores Central e da Serra do Mar na Mata Atlântica brasileira. *In*: Galindo-Leal, C.; Câmara, I. G. (Eds.). *Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas*. Belo Horizonte: Fundação SOS Mata Atlântica, Conservação Internacional e Centro de Ciências Aplicadas à Biodiversidade. pp 119-132.

Ahrens ME, Ross KG, Shoemaker DD (2005) Phylogeographic structure of the fire ant *Solenopsis invicta* in its native south American range: roles of natural barriers and habitat connectivity. *Evolution.*, **59**, 1733-1743.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman, DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, **215**, 403-410.

Avice JC (2000) *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University press, Cambridge, Massachusetts.

Avice JC, Arnold J, Ball RM , Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NC (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, **18**, 489-522.

Ayres JM, Fonseca GAB, Rylands AB, Queiroz HL, Pinto LP, Masterson D, Cavalcanti RB (2005) *Os corredores ecológicos das florestas tropicais do Brasil*. Belém: Sociedade Civil. Maminaurá. 256p.

Azuma N, Ogata K, Kikuchi T, Higashi S (2006) Phylogeography of asian Weaver ants, *Oecophylla smaragdina*. *Ecol. Res.*, **21**, 126-136.

Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.*, **16**, 37-48.

Barros LAC, Mariano CS, Pompolo SG, Delabie JHC, Campiolo S (2006). Variação cariotípica em populações de *Dinoponera lucida* emery (Formicidae: Ponerinae). **Resumos** do 52º Congresso Brasileiro de Genética, pp 242.

Beibl J, Buschinger A, Foitzik S, Heinze J (2007) Phylogeny and Phylogeography of the mediterranean species of the parasitic ant genus *Chalepoxenus* and its *Temnothorax* hosts. *Insect. Soc.*, **54**, 189-199.

Brasil. Ministério do Meio Ambiente (2006) *O corredor central da mata atlântica: uma nova escala de conservação da biodiversidade*. Brasília. Ministério do Meio Ambiente, Conservação Internacional. 46 p.

Brown Jr. KS, Ab'Sáber AN (1979). Ice-age forest refuges and evolution in the neotropics: correlation of paleoclimatological, geomorphological and pedological data with modern biological endemism. *Paleoclimas*, 1-30.

Caterino MS, Cho S, Sperling FAH (2000). The current state of insect molecular systematic: a thriving tower of babel. *Annu. Rev. Entomol.*, **45**, 1-54.

Costa MA, Silva JG, Netto EM, Campiolo S, Domingues AMT, Delabie JHC (2006). Padrões de diferenciação geográfica em populações de *Dinoponera lucida* emery (formicidae, ponerinae) estimado por meio de análises de PCR-RFLP. In: 52 Congresso Brasileiro de Genética, 2006, Foz do Iguaçu. Resumos do 52 Congresso Brasileiro de Genética, p. 327-327.

Delabie, JCH (2004) Plano de Manejo de *Dinoponera lucida* Emery, a formiga gigante do Corredor Central da mata Atlântica. PROBIO, MMA.

Doums C, Cabrera H, Peeters C (2002) Population genetic structure and male-biased dispersal in the queenless ant *Diacamma cyaneiventris*. *Mol. Ecol.*, **11**, 2251-2264.

Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.*, **8**, 175–185.

Ewing B, Green P (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res.*, **8**: 186–194.

Excoffier L, Smouse PE, Quattro J (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA data. *Genetics*, **131**, 479-491.

Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinf. Online*, **1**, 47-50.

Felsenstein J (2004) *Inferring phylogenies*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, pp 322-323.

Galindo-Leal C, Câmara IB (2003) Atlantic Forest hotspot status: an overview. *In: Galindo-Leal C, Câmara IB (2003) The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats and outlook*. Washington: Island Press, Center for Applied Biodiversity Science at Conservation International. pp 3-10.

Gascon C, Williamson B, Fonseca GAB (2000). Receding forest edges and vanishing reserves. *Science*, **288**, 1356-1358.

Hall HG, Smith PR (1991) Distinguishing African and European honey bee matrilineages using amplified mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 4548-4552.

Higgins D, Thompson J, Gibson T, Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL_W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4673-4680.

Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*, **17**, 754-755.

IPEMA - Instituto de Pesquisas da Mata Atlântica (2005) *Conservação da Mata Atlântica no Espírito Santo: cobertura florestal e unidades de conservação*. Vitória: IPEMA, Conservação Internacional. 142p.

Jermiin LS, Crozier RH (1994) The cytochrome *b* region in the mitochondrial DNA of the ant *Tetraponera rufoniger*: sequence divergence in Hymenoptera may be associated with nucleotide content. *J. Mol. Evol.*, **38**, 282-294.

Kempf, WW (1971) A preliminary review of the ponerine ant genus *Dinoponera* Roger Hymenoptera: Formicidae. *Stud. Entomol.*, **14**, 369-394.

Liautard C, Keller L (2001) Restricted effective queen dispersal at a microgeographic scale in polygynous populations of the ant *Formica exsecta*. *Evolution*, **55**, 2484–2491.

Majer JD (1983) Ants: bio-indicators of minesite rehabilitation, land-use, and land conservation. *Env. Manag.*, **7**, 375-383.

Mariano CSF, Delabie JHC, Ramos LS (2004) *Dinoponera lucida* Emery (Formicidae: Ponerinae): the highest number of chromosomes known in Hymenoptera. *Naturwissenschaften*, **91**, 182–185.

Mariano CSF, Sposito EC, Lopes AL, Barros L, Pompolo SG, Delabie JHC (2005) Análises comparativas no gênero *Dinoponera* Roger (Ponerinae: Ponerini). *Resumos do XVII Simpósio de Mirmecologia*.

Miller MP (2005) Alleles in space (AIS): Computer software for the joint analyses of interindividual spatial and genetic information. *J. Hered.*, **96**, 722-724.

Meyer A, Zardoya R (2003) Recent advances in the (molecular) phylogeny of vertebrates. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, **34**, 311–38

Monnin T, Peeters C (1998) Monogyny and regulation of worker mating in the queenless ant *Dinoponera quadricaps*. *Anim. Behav.*, **55**, 299–306

Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, **403**, 853-858.

Nei M (1987) *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, new York, USA.

Nylander JAA (2004). MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.

Peeters C, Ito F (2001). Colony dispersal and the evolution of queen morphology in social hymenoptera. *Annu. Rev. Entomol.* **46**, 601–630.

Peeters C (1993) Monogyny and polygyny in ponerine ants with or without queens. In: *Queen Number and Sociality in Insects* (Ed. By L. Keller), Oxford, Oxford University Press, pp. 235-261.

Paiva RVS, Brandão CRF (1995) Nests, worker population, and reproductive status of workers, in the giant queenless ponerine ant *Dinoponera* Roger Hymenoptera Formicidae. *Ethol. Ecol. Evol.*, **7**, 297-312.

Pamilo P, Gertsch P, Thorén P, Seppä P (1997) Molecular populations genetics of social insects. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, **28**, 1-15.

Peixoto AV (2006) Conhecimento sobre a bioecologia e o comportamento de *Dinoponera lucida*, Emery (Formicidae: Ponerinae). **Tese** (Mestrado) Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC, 89p.

Prado PI, Landau EC, Moura RT, Pinto LPS, Fonseca GAB, Alger K (2003) *Corredor de biodiversidade na Mata Atlântica do Sul da Bahia*. CD-ROM II. Ilhéus: IESB/CI/ CABS/UFMG/UNICAMP.

Quek SP, Davies SJ, Ashton OS, Itino T, Pierce NE (2007) The geography of diversification in mutualistic ants: a gene's-eye view into neogene history of Sundaland rain forest. *Mol. Ecol.*, **16**, 2045-2062.

Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, **19**, 2496-2497.

Russo CAM, Takezaki N, Nei M (1996) Efficiencies of different genes and different tree-building methods in recovering a known vertebrate phylogeny. *Mol. Biol. Evol.*, **13**, 525-536.

Schaefer CEGR, Pereira TL, Dergan JA, Albuquerque MA, Souza E (2006) Barreira biogeográfica da "Península de Abrolhos": geomorfologia, ictiofauna e conciliação de dados botânicos. *In: Alves RJV, Castro JWA, orgs. (2006) Ilhas oceânicas brasileiras da pesquisa ao manejo*. Brasília: MMA, SBF, 298p.

Suguio K, Martin L, Flexor JM (1988) Quaternary sea levels of the Brazilian coast: recent progress. *Episodes*, **11**, 203-208

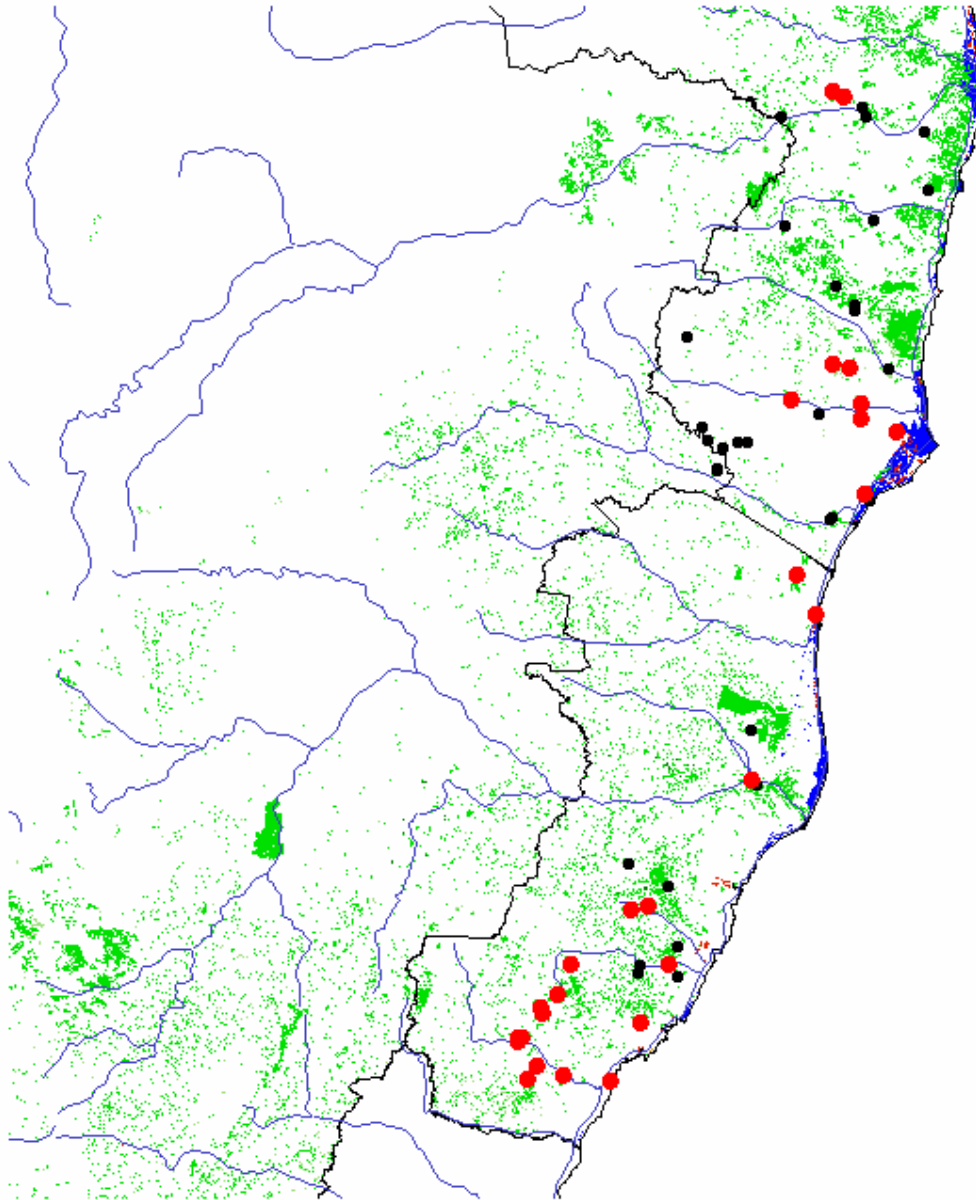
Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, **24**, 1596-1599.

Tessler MG, Goya SC (2005) Conditioning factors of coastal processes in the Brazilian Coastal Area. *Rev. Depto. Geografia*, **17**, p. 11-23.

Waldschmidt AM, Salomão TMF, Barros EG, Campos LAO (1997) Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). *Braz. J. Gen.*, **20**, 421-423.

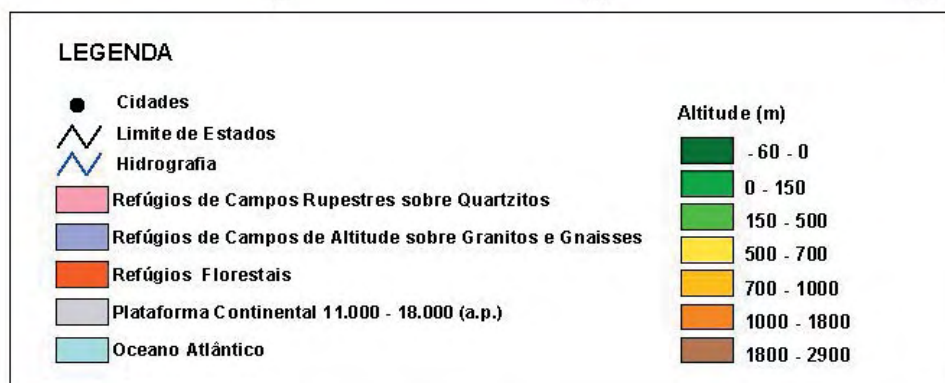
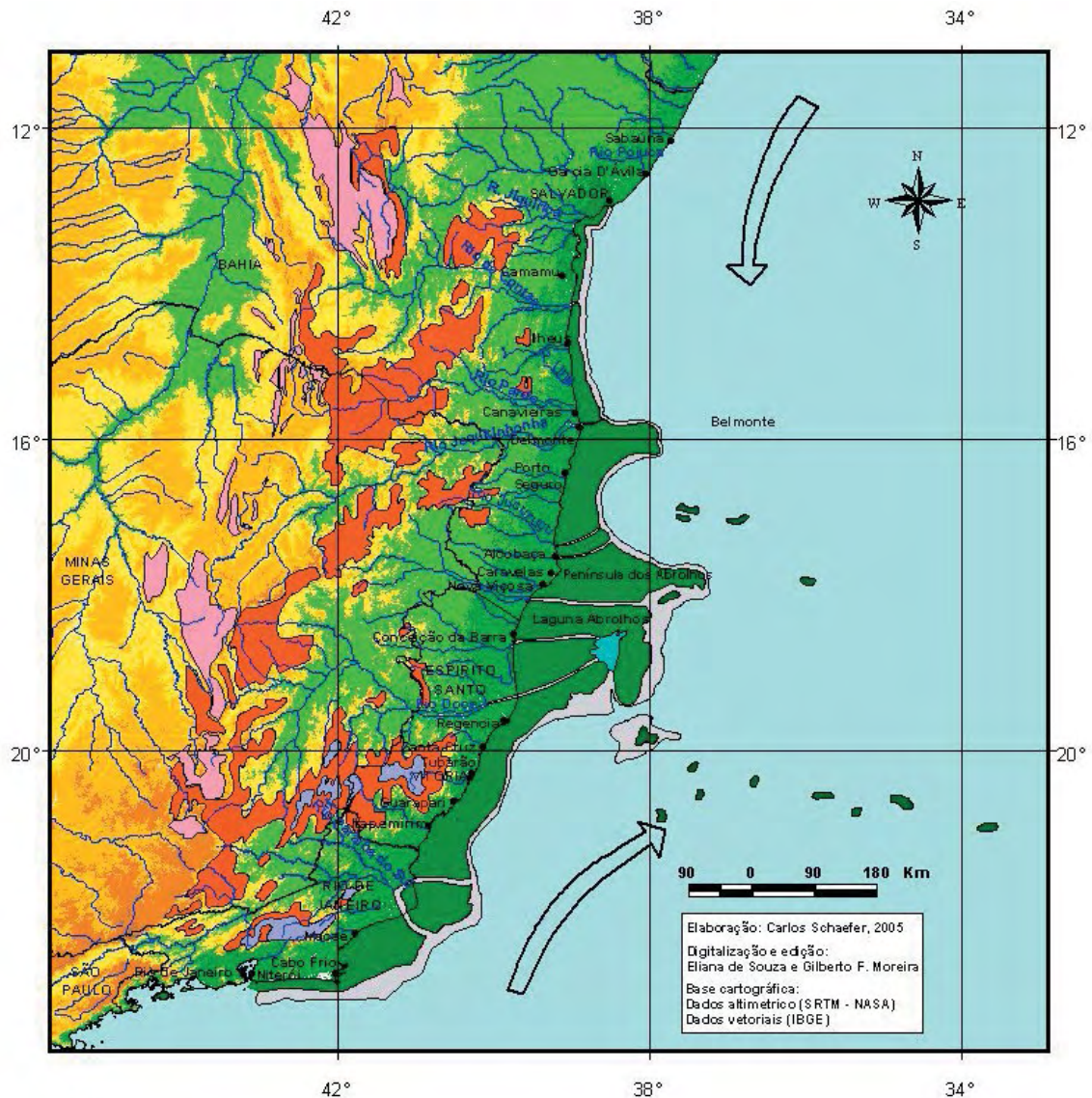
Wright S (1943) Isolation by distance. *Genetics*, **28**, 114-138.

ANEXO 1



Anexo 1. Áreas visitadas em busca de populações de *D. lucida* durante a execução do projeto “Plano de Manejo de *Dinoponera lucida* Emery, a Formiga Gigante do Corredor Central da Mata Atlântica”. Fonte: Delabie (2004). Legenda: ● Presente; ● Ausente

ANEXO 2



Anexo 2. Península Abrolhos e paleo-litoral entre Salvador e Rio de Janeiro - 18.000 - 11.000 anos (a.p.) Fonte: Schaefer *et al.* 2006).