

DENISE ELIANE EUZÉBIO PINTO

**DIVERSIDADE GENÉTICA, RELAÇÕES FILOGENÉTICAS E
MORFOLOGIA DAS SENSILAS ANTENAIIS DA FORMIGA AMEAÇADA
Atta robusta BORGMEIER, 1939 (HYMENOPTERA, FORMICIDAE)**

Tese apresentada a 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
2012**

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

T

P659d
2012

Pinto, Denise Eliane Euzébio, 1976-
Diversidade genética, relações filogenéticas e morfologia
das sensilas antenais da formiga ameaçada *Atta robusta*
Borgmeier, 1939 (Hymenoptera, Formicidae) / Denise Eliane
Euzébio Pinto. – Viçosa, MG, 2012.
ix, 72f. : il. ; (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Tânia Maria Fernandes Salomão.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Marcadores genéticos. 2. *Atta robusta*. 3. Biologia
molecular. 4. Restingas. I. Universidade Federal de Viçosa.
II. Título.

CDD 22. ed. 576.53

DENISE ELIANE EUZÉBIO PINTO

**DIVERSIDADE GENÉTICA, RELAÇÕES FILOGENÉTICAS E
MORFOLOGIA DAS SENSILAS ANTENAIAS DA FORMIGA AMEAÇADA
Atta robusta BORGMEIER, 1939 (HYMENOPTERA, FORMICIDAE)**

Tese apresentada a 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: 04 de setembro de 2012.

Denilce Meneses Lopes

Jorge Abdala Dergam dos Santos

Mara Garcia Tavares

Marcos Cunha Teixeira

Tânia Maria Fernandes Salomão
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela proteção e oportunidade de realização de mais um passo importante em minha vida.

À professora Tânia Maria Fernandes Salomão, pela oportunidade, confiança e orientação durante o processo de desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, pela oportunidade e apoio concedido, possibilitando desenvolver este trabalho.

Aos professores do Laboratório de Biologia Molecular de insetos, Lúcio, Mara, Denilce e Gustavo, pelas sugestões e contribuições.

Ao professor Marcos Teixeira (UFRB), à Sabrina Simon e ao senhor Íris Stanciola pelo apoio nas expedições e auxílio nas coletas de campo.

Aos membros da banca, professores, Denilce Meneses Lopes, Jorge Abdala Dergam dos Santos, Mara Garcia Tavares e Marcos da Cunha Teixeira pelas inúmeras contribuições.

Aos estudantes do Laboratório de Biologia Molecular de insetos, pela colaboração no início do desenvolvimento do trabalho, principalmente, à Marcília pela amizade, companheirismo e boas gargalhadas.

Ao Rosenilson, meu esposo, amigo e companheiro pelo apoio, dedicação, atenção e compreensão.

A toda minha família, meus pais, irmãos, sobrinhos, cunhados que sempre me apoiaram.

Aos professores dos programas de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento e de Biologia celular e Estrutural (UFV), pelos ensinamentos.

Ao Udson e ao Helder, pelas contribuições nas análises filogenéticas.

À Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento do projeto de pesquisa.

À Coordenação de aperfeiçoamento e pessoal de nível superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao IBAMA pela concessão da liberação de coletas das amostras e ao General Raton pela Liberação de coletas na restinga da Marambaia.

Ao Núcleo de Microscopia e Micro Análise da Universidade Federal de Viçosa, onde foram realizadas algumas análises.

Aos servidores Monteiro, Carlos e Renata e as secretárias dos programas de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento e de Biologia celular e Estrutural (UFV).

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização da pesquisa e da minha formação profissional.

BIOGRAFIA

Denise Eliane Euzébio, filha de Francisco Euzébio e Maria da Conceição Euzébio nasceu em Ponte Nova, Estado de Minas Gerais em 29 de março de 1976.

Em 2000 iniciou o curso de graduação em Agronomia na Universidade Federal de Viçosa no estado de Minas Gerais. De março de 2003 a dezembro de 2004 foi bolsista de iniciação científica da FAPEMIG exercendo atividades no Laboratório de Controle Biológico de insetos da EPAMIG/CTZM em Viçosa, MG. Em janeiro de 2005, diplomou-se em Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa no estado de Minas Gerais. Em agosto de 2005, iniciou o curso de Mestrado em Entomologia, na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, defendendo a dissertação em julho de 2007. Em agosto de 2008, iniciou o curso de Doutorado em Genética e Melhoramento defendendo tese em 04 de setembro de 2012 na Universidade Federal de Viçosa.

ÍNDICE

| | Página |
|--|--------|
| Resumo..... | vi |
| Abstract | viii |
| Introdução geral | 1 |
| Referências bibliográficas | 5 |
| CAPÍTULO I. Diversidade genética e estrutura populacional de <i>Atta robusta</i> (Hymenoptera, Formicidae): formiga cortadeira ameaçada de extinção. | 9 |
| Resumo | 10 |
| Abstract | 11 |
| Introdução | 12 |
| Materiais e métodos | 14 |
| Resultados | 17 |
| Discussão | 25 |
| Referências bibliográficas | 31 |
| CAPÍTULO II. Morfologia e morfometria das sensilas antenais de <i>Atta robusta</i> , Borgmeier 1939 (Hymenoptera: Formicidae). | 36 |
| Resumo | 37 |
| Abstract | 38 |
| Introdução | 39 |
| Materiais e métodos | 40 |
| Resultados | 44 |
| Discussão | 47 |
| Referências bibliográficas | 50 |
| CAPÍTULO III. Morfologia das sensilas antenais de <i>Atta robusta</i> , Borgmeier 1939 (Hymenoptera, Formicidae). | 54 |
| Resumo | 55 |
| Abstract | 56 |
| Introdução | 57 |
| Materiais e métodos | 58 |
| Resultados | 59 |
| Discussão | 64 |
| Referências bibliográficas | 67 |
| Conclusões gerais | 70 |
| Anexos | 71 |

RESUMO

PINTO, Denise Eliane Euzébio, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2012. **Diversidade genética, relações filogenéticas e morfologia das sensilas antenais da formiga ameaçada *Atta robusta* Borgmeier, 1939 (Hymenoptera, Formicidae)**. Orientadora: Tânia Maria Fernandes Salomão. Coorientadores: Lucio Antônio de Oliveira Campos e Gustavo Ferreira Martins.

Atta robusta (Hymenoptera: Formicidae) é uma espécie de formiga com distribuição restrita às restingas dos estados do Rio de Janeiro e do Espírito Santo e está ameaçada de extinção. Foram objetivos deste estudo: 1. caracterizar e comparar sequências do DNA mitocondrial (mtDNA) de espécies de *Atta*, incluindo *A. robusta* bem como avaliar a estrutura genética da população de *A. robusta* amostrada; 2. estimar o tempo do ancestral comum mais recente para *A. robusta* e as relações filogenéticas entre *A. robusta* e outras espécies de *Atta*, 3. descrever e comparar a morfologia e a morfometria das sensilas antenais de duas populações de *A. robusta*. As coletas de *A. robusta* foram realizadas em 16 localidades dos estados do Espírito Santo e do Rio de Janeiro, e as de *A. sexdens* e *A. bisphaerica* no Município de Viçosa no estado de Minas Gerais. DNA total de cada amostra foi obtido e utilizado como molde em reações de amplificação de regiões específicas do DNA mitocondrial (COI-COII) e DNA nuclear (EF1 α). As sensilas antenais de duas populações localizadas geograficamente distantes foram analisadas morfologicamente. A sequência COI-COII das espécies de *Atta* analisadas é rica em nucleotídeos A+T, sendo a maior porcentagem encontrada na região intergênica (IGS). A população de *A. robusta* apresentou baixa diversidade nucleotídica e alta diversidade haplotípica o que são características de populações com formação recente. Foram identificados oito haplótipos mitocondriais que formam três haplogrupos estruturados geograficamente indicando nulo ou limitado fluxo gênico entre os haplogrupos. A análise filogenética mostrou que *A. robusta* é um grupo monofilético e derivado em relação às outras espécies de *Atta* analisadas. As espécies de *A. sexdens* e *A. robusta* formam grupos irmãos claramente distintos e com alto valor de probabilidade Bayesiana. O tempo do ancestral comum de *A. robusta* foi estimado em 7,8 milhões de anos. Os dados de diversidade genética obtidos, bem como o padrão filogeográfico sugerido para *A. robusta* reforçam a necessidade de se

preservar os ambientes de restinga para preservar as populações de *A. robusta*, objeto de estudo no presente trabalho. Independentemente das populações avaliadas, diferentes tipos de sensilas antenais (tricóideas retas e curvadas, basicônicas, ampuláceas e celocônicas) foram identificadas, sendo as mesmas mais numerosas nos flagelômeros distais. Diferenças no número e no comprimento das sensilas tricóideas retas e curvadas no flagelômeros F8 e F9 foram observadas. As diferenças entre as sensilas antenais das duas populações avaliadas são decorrentes de uma possível plasticidade fenotípica da espécie *A. robusta*, uma característica importante considerando a adaptação desta formiga a possíveis variações ambientais.

ABSTRACT

PINTO, Denise Eliane Euzébio, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, september 2012. **Genetic diversity, phylogenetic relationships and morphology of antennal sensilla of the endangered ant *Atta robusta* Borgmeier, 1939 (Hymenoptera, Formicidae).** Adviser: Tânia Maria Fernandes Salomão. Co-Advisers: Lucio Antônio de Oliveira Campos and Gustavo Ferreira Martins.

Atta robusta (Hymenoptera: Formicidae) is an ant species with distribution restricted to the restingas in the Brazilian states of Rio de Janeiro and Espírito Santo, and is threatened with extinction. Objectives of this study were: 1. to characterize and compare sequences of mitochondrial DNA (mtDNA) of *Atta* species, including *A. robusta*, as well as assess the genetic structure of the *A. robusta* population sampled; 2. estimate the time to the most recent common ancestor for *A. robusta* and the phylogenetic relationships among *A. robusta* and other *Atta* species; and 3. describe and compare the morphology and morphometry of the antennal sensilla of two *A. robusta* populations. Collections of *A. robusta* were conducted at 16 locations in the states of Espírito Santo and Rio de Janeiro; and *A. sexdens* and *A. bisphaerica* were obtained in the municipality of Viçosa, Minas Gerais, Brazil. Total DNA from each sample was obtained and used as a template in amplification reactions for specific regions of the mitochondrial DNA (COI-COII) and nuclear DNA (EF1 α). Antennal sensilla of two populations located geographically distant from each other were analyzed morphologically. The COI-COII sequence of the *Atta* species analyzed is rich in A+T nucleotides, where the highest percentage was encountered in the intergenic region (IGS). The *A. robusta* population showed low nucleotide diversity and high haplotype diversity, which are characteristic of recently formed populations. Eight mitochondrial haplotypes were identified that form three geographically structured haplogroups, indicating no or limited gene flow between haplogroups. The phylogenetic analysis showed that *A. robusta* is a monophyletic and derived group in relation to the other species of *Atta* analyzed. The species *A. sexdens* and *A. robusta* form clearly distinct sister groups with high Bayesian probability. Common ancestor time of *A. robusta* was estimated at 7.8 million years. The data obtained from genetic diversity, as well as the phylogeographic pattern suggested for *A. robusta*, reinforces the need to preserve the restinga environments for preservation of *A. robusta* populations, the object of study in this work.

Independent of the populations evaluated, different types of antennal sensilla (straight and curved trichodea, basiconica, ampullacea and celosonic) were identified, most numerous in the distal flagellomeres. Differences in the number and length of straight and curved sensilla trichodea in the flagellomeres F8 and F9 were observed. Differences between the antennal sensilla of the two populations are resultant of a possible phenotypic plasticity of the species *A. robusta*, an important feature considering adaptation of this ant to environmental variations.

INTRODUÇÃO GERAL

As formigas são insetos eussociais, constituem um dos grupos de maior sucesso na história terrestre e estão distribuídas por todas as regiões do Planeta (Bolton, 1994). Nas regiões tropicais, onde são abundantes, representam 25% ou mais da biomassa animal (Schultz, 2000). Além disso, são insetos que surgiram há aproximadamente 120 milhões de anos e tiveram uma grande expansão há 70 milhões de anos, conforme documentado em registros fósseis do período do Cretáceo e Terciário (Grimald & Engel 2005).

Dentre as formigas reconhecidas, encontram-se as da subfamília Myrmicinae, que começou a diversificar durante o final do Cretáceo (Moreau *et al.* 2006). Nesta subfamília está incluída a tribo Attini que surgiu há aproximadamente 50 milhões de anos (Moreau *et al.* 2006) e é conhecida pelo cultivo de um fungo simbiote. Neste grupo, os gêneros mais basais são conhecidos como Attines inferiores, que cultivam o fungo usando como substrato matéria morta como carcaça de insetos e restos de vegetais, enquanto os gêneros derivados *Acromyrmex* e *Atta*, conhecidos como Attines superiores, cultivam o fungo usando como substrato, material vegetal fresco. Os gêneros *Acromyrmex* e *Atta* são popularmente conhecidos como formigas cortadeiras e tiveram origem entre 8 e 12 milhões de anos (Schultz & Brady 2008).

O gênero *Atta*, também conhecido como formigas cabeçudas, ou saúvas, encontra-se distribuído em grande parte das Américas (Wheeler 1907, Mueller *et al.* 2001) sendo muitas espécies do gênero consideradas pragas na agricultura (Loeck *et al.* 2001, Herz *et al.* 2007) por cortar material vegetal fresco e carregá-los para dentro dos ninhos.

As formigas do gênero *Atta* apresentam uma complexa organização social em ninhos subterrâneos, onde suas colônias são formadas por milhões de indivíduos de

castas diferentes (Evison & Ratnieks, 2007). Existem as operárias denominadas de jardineiras, soldados e cortadeiras, de acordo com a função na colônia, e as castas reprodutivas (machos e fêmeas alados) que em certos períodos do ano saem em revoada para o acasalamento e fundação de novas colônias. Essa organização envolve uma comunicação por meio de sinais químicos e mecânicos (Billen, 2006) percebidos por estruturas sensoriais do tipo sensilas (Kleineidam *et al.* 2000, Ozaki *et al.* 2005). Estes sinais são transmitidos ao sistema nervoso central e processados pelo cérebro, que envia uma mensagem de resposta ao estímulo (Chapman, 1998) permitindo a comunicação com meio ambiente bem como entre os indivíduos da colônia.

Apesar da extensa distribuição geográfica das formigas do gênero *Atta*, a espécie *A. robusta*, Borgmeier, 1939, é uma espécie ameaçada e restrita às áreas litorâneas. Inicialmente, esta espécie havia sido indicada como endêmica apenas em algumas localidades do Rio de Janeiro, como, Guanabara (Mariconi 1970) e Baixada Fluminense (Fowler 1995), posteriormente Gonçalves e Nunes (1984) registraram sua ocorrência nas restingas do Rio de Janeiro, desde São João da Barra até a Marambaia. Após revisão bibliográfica, museográfica e diversas incursões ao campo Teixeira *et al.* (2003) sugeriram o endemismo de *A. robusta*, que ocorre apenas em áreas de restingas e está distribuída deste o Sul do Rio de Janeiro até o Norte do Espírito Santo.

Os estudos existentes sobre esta espécie descrevem o comportamento de forrageamento, a importância na dispersão e na germinação de sementes, dinâmica espacial de plântulas e modificação do solo (Teixeira *et al.*, 2008).

As principais causas de *A. robusta* está na lista de espécies ameaçadas de extinção (Machado *et al.* 2003), são o provável endemismo, a baixa densidade

populacional, a dependência da cobertura vegetal (Teixeira & Schoereder, 2005) e a rápida redução da cobertura vegetal das restingas. As restingas vêm passando por intensa fragmentação, principalmente pela ocupação imobiliária que atualmente tem sido uma das principais causas da perda de biodiversidade neste ecossistema.

A biologia molecular está consolidada, como uma ferramenta importante para estudos evolutivos dos mais variados táxons e têm fornecido dados muito úteis para embasar o estabelecimento de programas de preservação e monitoramento de espécies ameaçadas. Dentre estes estudos, destacam-se aqueles com abordagens em análises filogenéticas, filogeográficas em populações de várias espécies de formigas (Goropashnaya *et al.* 2004, Ahrens *et al.* 2005, Miller & Allsopp 2005, Azuma *et al.* 2006, Finn *et al.* 2006, Solomon *et al.* 2008, Ahern *et al.* 2009, Resende *et al.* 2010).

Um dos marcadores genéticos utilizados em estudos populacionais é o DNA mitocondrial (mtDNA) por apresentar, entre outras características, padrão de herança uniparental, ausência de recombinação e rápida taxa de evolução, características estas consideradas importantes em estudos de estrutura populacional (Avisé, 2009). Além disso, por ser de herança materna, o mtDNA é considerado muito útil em estudos de populações de insetos sociais onde as fêmeas são responsáveis pela dispersão e fundação de novas colônias. Dentre os genes mitocondriais mais utilizados nestes estudos encontram-se os que codificam para Citocromo oxidase I (COI), Citocromo oxidase II (COII) e Citocromo b (Cytb) que tem permitido a reconstrução da filogenia e a filogeografia de diversos táxons de formigas (Ahrens *et al.* 2005, Azuma *et al.* 2006, Sarnat & Moreau 2011). Com este mesmo objetivo, genes nucleares, mesmo apresentando taxa de evolução relativamente baixa, comparada com a do mtDNA, têm sido utilizados em combinação com o mtDNA.

Como exemplo, destaca-se o fator de alongação EF1 α utilizado em alguns estudos (Schultz & Brady 2008, Bacci *et al.* 2009).

Apesar de alguns aspectos das características e importância ecológica de *A. robusta* já estarem esclarecidos, pouco se conhece sobre a estrutura populacional dessa espécie. Embora os estudos baseados em biologia molecular possam resultar em dados que esclareçam a estrutura, diversidade genética e história evolutiva das populações, não foi encontrado na literatura, relatos desses estudos com *A. robusta*. Aliado ao estudo genético, o levantamento de dados morfológicos de *A. robusta* também poderá contribuir com informações que possam auxiliar no estabelecimento de práticas de conservação desta importante espécie de formiga ameaçada de extinção.

Considerando o exposto, foram avaliadas neste estudo a diversidade e a estruturação genética das amostras das populações de *A. robusta* de restingas dos estados do Rio de Janeiro e do Espírito Santo utilizando como marcador genético, sequências específicas do mtDNA das mesmas. Foi, também, inferida com base em sequências do mtDNA e nDNA, as relações filogenéticas entre *A. robusta* e outras espécies do gênero *Atta* e datado o ancestral comum mais recente das populações *A. robusta*. Além disso, as características morfológicas do órgão de comunicação, as sensilas antenais de *A. robusta*, foram descritas e comparadas entre duas populações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afonso AS, Medeiros AS, Nunes CS, Rodrigues GA, Nunes RS, Tavares LFM, Conde MMS (2007) Florística da vegetação arbustiva aberta na Restinga da Marambaia, RJ. *Revista Brasileira de Biociências* 5: 450-452.
- Ahern RG, Hawthorne DJ, Raupp MJ (2009) Phylogeography of a specialist insect, *Adelges cooleyi*: historical and contemporary processes shape the distribution of population genetic variation. *Molecular Ecology* 18: 343-356.
- 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.
- Avise JC (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.
- Bacci M, Solomon SE, Mueller UG, Martins VG, Carvalho AOR, Vieira LGE, Silva-Pinhati ACO (2009) Phylogeny of leafcutter ants in the genus *Atta* Fabricius (Formicidae: Attini) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 51: 427-437.
- Billen J (2006) Signal variety and communication in social insects. *Proceedings of the Netherlands Entomological Society Meeting* 17: 9-25.
- Bolton B (1994) *Identification guide to the ant genera of the world*. Cambridge, Harvard University Press. 222 p.
- Chapman RF (1998) *The insects: structure and function*. Cambridge University Press. 770 p.

- Cogliatti-Carvalho L, Freitas AFN, Rocha CFD, Sluys MV (2001) Variação na estrutura e na composição de Bromeliaceae em cinco zonas de restinga no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Macaé, RJ. *Revista Brasileira de Botânica* 24: 1-9.
- Evison SEF, Ratnieks FLW (2007) New role for majors in *Atta* leafcutter ants. *Ecological Entomology* 32: 451- 454.
- Finn DS, Theobald DM, Black WC, Poff NL (2006) Spatial population genetic structure and limited dispersal in a Rocky Mountain alpine stream insect. *Molecular Ecology* 15: 3553-3566.
- Gomes FH, Vidal-Torrado P, Macías F, Gherardi B, Perez XLO (2007) Solos sob vegetação de restinga na ilha do Cardoso (sp). I - caracterização e classificação. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 31: 1563-1580.
- Goropashnaya AV, Fedorov VB, Seifert B, Pamilo P (2004) Limited phylogeographical structure across Eurasia in two red wood ant species *Formica pratensis* and *F. lugubris* (Hymenoptera, Formicidae). *Molecular Ecology* 13: 1849-1858.
- Grimald D, Engel MS (2005) *Evolution of the insects*. New York: Cambridge University Press. 755 p.
- Herz H, Beyschlag W, Holldobler B (2007) Assessing herbivory rates of leaf-cutting ant (*Atta colombica*) colonies through short-term refuse deposition counts. *Biotropica* 39: 476-481.
- Loeck AE, Grützmacher DD, Storch G (2001) Distribuição geográfica de *Atta sexdens piriventris* Santschi, 1919, nas principais regiões agropecuárias do estado do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Agrociência* 7: 54-57.

- Kleineidam C, Romani R, Tautz J, Isidoro N (2000) Ultrastructure and physiology of the CO₂ sensillum ampullaceum in the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. *Arthropod Structure & Development* 29: 43-55.
- Machado ABM, Brescovit AD, Mielke OH, Casagrande M, Silveira FA, Ohlweiler FP, Zeppelini D, Maria M, Wieloch AH (2003) Invertebrados terrestres. Panorama geral dos invertebrados terrestres ameaçados de extinção. 193p.
- Miller LJ, Allsopp PG (2005) Phylogeography of the scarab beetle *Antitroglus parvulus* Britton (Coleoptera: Scarabaeidae) in south-eastern Queensland, Australia. *Australian Journal of Entomology* 44: 29-36.
- Moreau CS, Bell CD, Vila RS, Archibald B, Pierce NE (2006) Phylogeny of the ants: Diversification in the age of angiosperms. *Science* 312: 101-104.
- Mueller UG, Schultz TR, Currie CR, Adamas RMM, Malloch D (2001) The origin of the Attine ant-fungus mutualism. *The Quarterly Review of Biology* 76: 169-197.
- Ozaki M, Wada-Katsumata A, Fujikawa K, Iwasaki M, Yokohari F, Satoji Y, Nisimura T, Yamaoka R (2005) Ant nestmate and non-nestmate discrimination by a chemosensory sensillum. *Science* 309: 311-313.
- Resende HC, Yotoko KSC, Delabie JHC, Costa MA, Campiolo S, Tavares MG, Campos LAO, Fernandes-Salomão TM (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.
- Sarnat EM, Moreau CS (2011) Biogeography and morphological evolution in a Pacific island ant radiation. *Molecular Ecology* 20: 114-130.
- Schultz TR (2000) In search of ant ancestors. *PNAS* 97: 14028-14029.

- Schultz TR, Brady SG (2008) Major evolutionary transitions in ant agriculture. National Academy of Sciences of the USA 105:5435-5440.
- Suguió K, Martín L, Bitencourt CSPA, Domínguez JML, Flexor JM, Azevedo AEG (1985) Flutuações do nível relativo do mar durante o quaternário superior ao longo do litoral brasileiro e suas implicações na sedimentação costeira. Revista Brasileira de Geociências 15: 273-286.
- Teixeira MC, Schoederer JH, Mayhé-Nunes AJ (2003) Geographic Distribution of *Atta robusta* Borgmeier (Hymenoptera: Formicidae). Neotropical Entomology 32: 719-721.
- Teixeira MC, Schoederer JH, Louzada JNC (2004) Occurrence of *Atta robusta* Borgmeier (Hymenoptera: Formicidae) in the North of Espírito Santo State, Brazil. Neotropical Entomology 33: 265-266.
- Teixeira MC, Santos IA, Schoederer JH (2008) *Atta robusta*: endemismo, extinção ou ausência de estudo? In: Insetos sociais: da biologia à aplicação. In: Santos IA, Vilela EF, Schoederer HH, Lino Neto J, Campos LAO and Serrão JE (eds) Insetos Sociais: da Biologia à Aplicação. 1ª edição. Editora UFV, Viçosa, MG, Brasil, pp 359-367.
- Wheeler WM (1907) The fungus ants of North America. Bulletin of the American Museum of Natural History 23: 669-807.

CAPÍTULO I

Diversidade genética e estrutura populacional de *Atta robusta* (Hymenoptera, Formicidae): formiga cortadeira ameaçada de extinção

RESUMO

Atta robusta é uma espécie de formiga cortadeira supostamente endêmica de restingas e ameaçada de extinção. Neste estudo, sequências do DNA mitocondrial de *A. robusta*, *A. sexdens* e *A. bisphaerica* foram caracterizadas e comparadas. Foi avaliado, também, a estruturação genética das populações de *A. robusta*, visando determinar, com base em análise do DNA mitocondrial (mtDNA), o seu padrão filogeográfico. As coletas de *A. robusta* foram realizadas em 16 localidades dos estados do Espírito Santo e do Rio de Janeiro, e as de *A. sexdens* e *A. bisphaerica* no município de Viçosa no estado de Minas Gerais. O DNA total de uma operária de cada colônia foi utilizado para amplificação da região COI-COII do mtDNA das três espécies *Atta*. Os produtos da amplificação foram sequenciados e as sequências obtidas foram comparadas e caracterizadas. Haplótipos mitocondriais foram identificados com base nas sequências COI e IGS da região COI-COII de *A. robusta*. Estas mesmas sequências de *A. robusta* foram utilizadas para estimativas de diversidade nucleotídica e haplotípica, e definição da rede de haplótipos. A região COI-COII de espécies de *Atta* é rica em nucleotídeos A+T, sendo a maior porcentagem encontrada na região intergênica (IGS). A população de *A. robusta* analisada apresentou baixa diversidade nucleotídica e alta diversidade haplotípica. Os dados de diversidade genética obtidos, bem como o padrão filogeográfico sugerido para *A. robusta*, reforçam a necessidade de se preservar os ambientes de restinga para, indiretamente preservar *A. robusta* formiga endêmica desse ecossistema.

Palavras chaves: DNA mitocondrial, rede de haplótipos, endemismo.

ABSTRACT

Atta robusta is leaf-cutter ant species supposedly endemic to the restingas and endangered by extinction. In this study, the mitochondrial DNA sequences of *A. robusta*, *A. sexdens* and *A. bisphaerica* were characterized and compared. The genetic structure of *A. robusta* was also evaluated in order to determine, based on analysis of mitochondrial DNA (mtDNA), its phylogeographic pattern. *A. robusta* specimens were collected in 16 locations in the Brazilian states of Espírito Santo and Rio de Janeiro, and *A. sexdens* and *A. bisphaerica* in the municipality of Viçosa, Minas Gerais, Brazil. The total DNA of a worker from each colony was used for amplification of the COI-COII region of mtDNA from the three *Atta* species. The amplification products were sequenced and the sequences obtained were compared and characterized. Mitochondrial haplotypes were identified based on COI and IGS sequences of the COI-COII region in *A. robusta*. These same sequences of *A. robusta* were used to estimate nucleotide and haplotype diversity, and for definition of the haplotype network. The COI-COII region of *Atta* species is rich in A+T nucleotides, with the highest percentage found in the intergenic region (IGS). The *A. robusta* population analyzed presented a low nucleotide diversity and high haplotype diversity. Data obtained on genetic diversity, as well as the phylogeographic pattern suggested for *A. robusta*, reinforces the need to preserve restinga environments to indirectly preserve the *A. robusta* ant endemic to this ecosystem.

Keywords: mitochondrial DNA, haplotype network, endemism.

INTRODUÇÃO

As formigas do gênero *Atta* (Hymenoptera: Formicidae) distribuem-se nas regiões neotropicais e possui várias espécies consideradas pragas na agricultura (Loeck *et al.* 2001; Herz *et al.* 2007). Dentre as espécies deste gênero, encontra-se *A. robusta* que é uma espécie ameaçada de extinção, classificada na categoria de espécies vulneráveis (Machado *et al.* 2003). Sendo que o provável endemismo nas restingas dos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo (Teixeira *et al.* 2003, Teixeira *et al.* 2004), a baixa densidade populacional, a dependência da cobertura vegetal (Teixeira & Schoereder, 2005) e a rápida redução da cobertura vegetal das restingas, são as principais causas de sua ameaça.

Atta robusta, Borgmeier, 1939, inicialmente, havia sido indicada como endêmica apenas em algumas localidades do Rio de Janeiro, como, Guanabara (Mariconi 1970) e Baixada Fluminense (Fowler 1995), posteriormente Gonçalves e Nunes (1984) registraram sua ocorrência nas restingas do Rio de Janeiro, desde São João da Barra até a Marambaia. Após revisão bibliográfica, museográfica e diversas incursões ao campo Teixeira *et al.* (2003) sugeriram o endemismo de *A. robusta*, que ocorre apenas em áreas de restingas e está distribuída deste o Sul do Rio de Janeiro até o Norte do Espírito Santo.

Embora as espécies de *Atta* sejam consideradas pragas na agricultura, *A. robusta* desempenha, nos ecossistemas de restinga, papel importante na dinâmica de sementes, pois, as transportam fazendo a dispersão das mesmas e as manipulam retirando o pericarpo, o que facilita a germinação e, conseqüentemente, diminui a ação de predadores (Teixeira *et al.* 2008). Além disso, muitas sementes são deixadas próximas aos ninhos onde o terreno é rico em nutrientes devido aos descartes do substrato utilizado para o cultivo do fungo. Essa é uma característica de grande

relevância para a manutenção das restingas, um ecossistema em que o solo é formado por sedimentos marinhos e areia sendo, portanto, pobre em nutrientes (Gomes *et al.* 2007).

Apesar de *A. robusta* ser uma espécie endêmica de grande importância ecológica, não foi encontrado, na literatura, relatos de estudos visando o conhecimento da estrutura genética de populações desta espécie. Dentre as ferramentas apropriadas para este tipo de estudo encontra-se a genética de populações que tem sido utilizada com sucesso, contribuindo para a compreensão da dinâmica populacional de várias espécies.

Variações genéticas são parâmetros amplamente empregados em estudos de genética de populações com os mais diversos táxons. Estudos com diversas espécies de formigas, mostram a eficiência do DNA mitocondrial (mtDNA) e/ ou nuclear como marcadores moleculares que permitem a detecção de variações genéticas que podem ser utilizadas para inferir sobre a genética das populações, bem como as relações filogenéticas nas diferentes espécies avaliadas (Goropashnaya *et al.* 2004, Ahrens *et al.* 2005, Azuma *et al.* 2006, Moreau *et al.* 2006, Schultz & Brady 2008, Bacci *et al.* 2009, Resende *et al.* 2010).

Considerando o exposto, este estudo tem como proposta avaliar a diversidade e a estrutura genética de uma população de *A. robusta* visando obter dados que possam contribuir para a compreensão da dinâmica populacional dessa espécie. Os dados obtidos, associados aos conhecimentos até então documentados para *A. robusta*, poderão ser utilizados no desenvolvimento de estratégias de manejo e de conservação desta importante formiga cortadeira que está ameaçada de extinção.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostragem e extração do DNA de *A. robusta*

Um total de 76 colônias de *A. robusta* foi amostrado em 16 localidades da restinga do litoral do sudeste brasileiro (Tabela 1) sendo sete delas no estado do Espírito Santo (ES) e nove no estado do Rio de Janeiro (RJ) (Figura 1). Além de *A. robusta*, amostras de *A. sexdens* e *A. bisphaerica* foram obtidas em colônias localizadas na região de Viçosa, estado de Minas Gerais e utilizadas em algumas análises. As coletas foram realizadas nos meses de fevereiro de 2008, outubro de 2009 e agosto de 2010 e as amostras foram armazenadas em etanol absoluto à -80 °C. O DNA total foi extraído do tórax de uma operária de cada colônia conforme recomendado por Waldschmidt *et al.* 1997.

Tabela 1: Localidades amostradas, número total de amostras por localidade e código de identificação das amostras

| Espécie | Locais de coleta | Total de amostras | Código |
|-------------------|---------------------------------|-------------------|------------|
| <i>A. robusta</i> | 01 São Mateus – ES | 10 | 03 (01-10) |
| | 02 Linhares – ES | 09 | 09 (01-09) |
| | 03 Aracruz – ES | 09 | 02 (01-09) |
| | 04 Vila Velha- ES | 01 | 01 (01) |
| | 05 Itapemirim - ES | 07 | 04 (01-07) |
| | 06 Maratáizes – ES | 02 | 10 (01-02) |
| | 07 Presidente Kennedy – ES | 08 | 11 (01-08) |
| | 08 S. Francisco Itabapoana - RJ | 05 | 12 (01-05) |
| | 09 São João da Barra – RJ | 06 | 13 (01-06) |
| | 10 Campos de Goytacazes - RJ | 01 | 14 (01) |
| | 11 Quissamã – RJ | 01 | 15 (01) |
| | 12 Rio das Ostras – RJ | 02 | 05 (01-02) |
| | 13 Cabo Frio – RJ | 01 | 06 (01) |
| | 14 Araruama – RJ | 02 | 07(01-02) |
| | 15 Maricá – RJ | 01 | 08 (01) |
| | 16 Marambaia – RJ | 11 | 16 (01-11) |
| Total | 16 Localidades | 76 Amostras | |

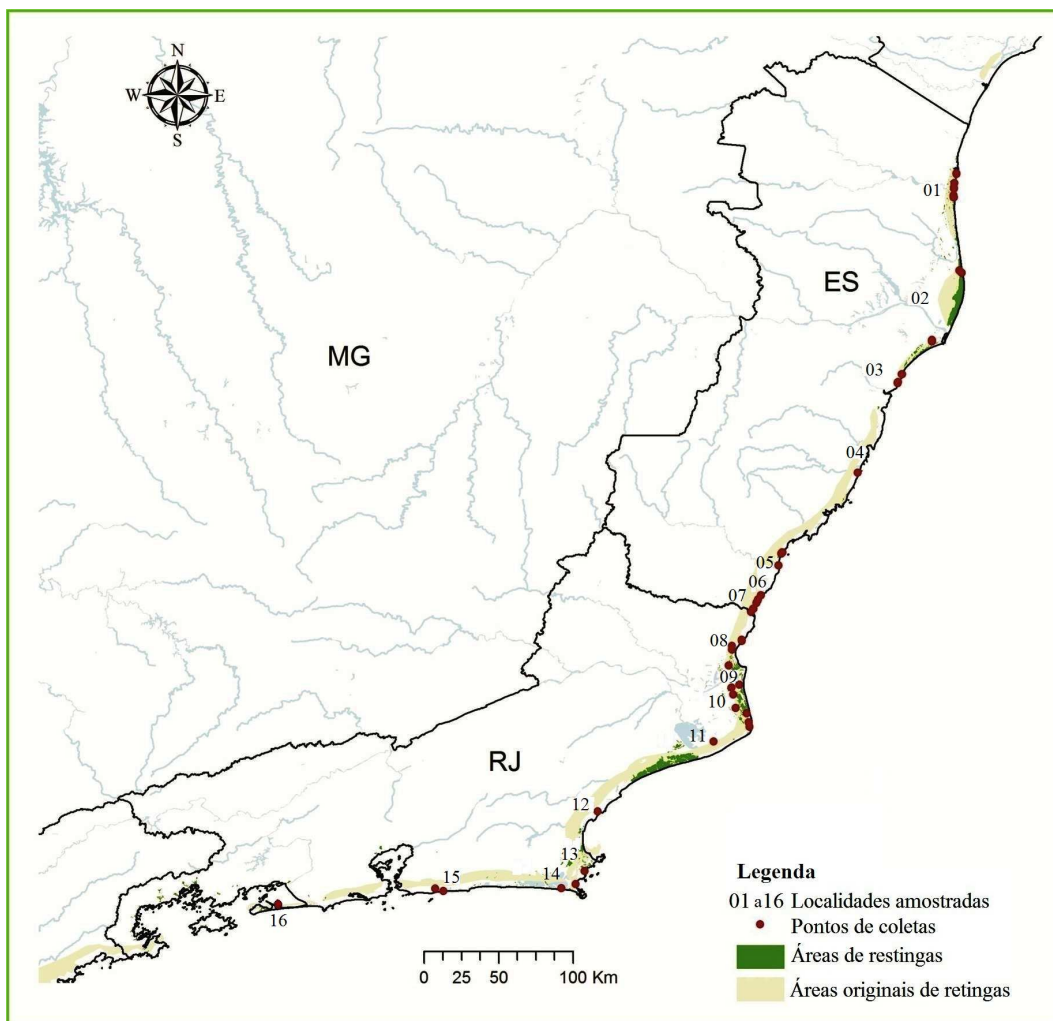


Figura 1: Mapa mostrando as localidades e respectivos pontos de coletas de *Atta robusta* nas restingas dos estados do Espírito Santo (ES) e do Rio de Janeiro (RJ) 01: São Mateus, 02: Linhares, 03: Aracruz, 04: Vila Velha, 05: Itapemirim, 06: Marataízes, 07: Presidente Kennedy, 08: São Francisco do Itabapoana, 09: São João da Barra, 10: Campos dos Goytacazes, 11: Quissamã, 12: Rio das Ostras, 13: Cabo Frio, 14: Araruama, 15: Maricá e 16: Marambaia.

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O DNA total de *A. robusta*, *A. sexdens* e *A. bisphaerica* extraído foi utilizado para amplificação por PCR da região COI-COII do DNA mitocondrial (mtDNA) destas espécies utilizando o par de *primer* C1-J-2828^a e C2-N-3386^a, com sequências (ATTCATTCTTATCTTGAAATATTATTC) e (TTCATAAGTTCAGTATCATTGGTG),

respectivamente (Martins *et al.* 2007). A região amplificada compreende a extremidade 5' do Citocromo oxidase I (COI), tRNA leucine (tRNA^{Leu}), extremidade 3' do Citocromo oxidase II (COII) e o espaço intergênico (IGS) situando entre COI e tRNA^{Leu}.

As reações de amplificação foram feitas em 25 µL de uma mistura contendo tampão flexi Go® Taq 1X (Promega); 1,0 mM de MgCl₂; 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato; 0,4 µM de cada primer; 1,5 U de DNA polimerase Go® Taq (Promega) e aproximadamente 30 ng de DNA total. As condições de amplificação consistiram de um passo de desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, seguido por 30 ciclos de, 94 °C por 10 segundos; 50 °C por 1 minuto; 72 °C por 3 minutos e, um passo final de extensão de 70 °C por 15 minutos. A reação de PCR foi conduzida em termociclador *Mastercycler Gradient* da *Eppendorf*, e os produtos da reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% para a confirmação da amplificação.

Sequenciamento e alinhamento das sequências COI-COII do mtDNA de *A. robusta*, *A. sexdens* e *A. bisphaerica*

Os produtos PCR foram devidamente preparados e enviados para a empresa *MacroGen* onde foram sequenciados nas direções *forward* e *reverse*. As sequências *forward* e *reverse* foram avaliadas e sequências consenso foram obtidas utilizando o pacote de programas *Phred*, *Phrap* e *Consed* (Ewing *et al.* 1998, Ewing & Green 1998). Para confirmação da região amplificada, as sequências consenso obtidas para cada espécie foram comparadas com sequências correspondentes depositadas no *GenBank*. Foram incluídas nas análises oito sequências COI-COII de *A. sexdens* adquiridas no *GenBank* (EU848214.1, EU848210.1, EU848198.1, EU848190.1,

EU848199.1, EU848185.1, EU848169.1, EU848171.1). O alinhamento foi realizado pelo método de *CLUSTAL W* com o programa *MEGA 5* (Tamura *et al.* 2011).

Caracterização das sequências COI-COII do mtDNA de *A. robusta*, *A. sexdens* e *A. bisphaerica*

As sequências COI-COII de *A. robusta* foram avaliadas quanto ao número e posição de possíveis substituições sinônimas e não sinônimas; inserções e deleções bem como quanto a possível ocorrência de mudança na fase de leitura. As sequências de bases das regiões COI e COII contidas nas sequências COI-COII de *A. robusta* foram utilizadas para dedução das sequências de aminoácidos correspondentes utilizando o programa *MEGA 5* (Tamura *et al.* 2011). O programa *MEGA 5* foi empregado, também, para a determinação da porcentagem de bases, A, T, G e C das sequências COI-COII de *A. robusta*, *A. sexdens* e *A. bisphaerica*.

Rede de haplótipos utilizando sequências COI e IGS da região COI-COII de *A. robusta*

As regiões COII e tRNA^{Leu} foram excluídas da composição da rede de haplótipos, utilizando apenas as sequências correspondentes às regiões COI e IGS para essa análise.

Os haplótipos e as diversidades nucleotídica e haplotípica foram determinados utilizando o *software DNASP v. 5.10.01* (Librado & Rozas 2009). A rede de haplótipos foi obtida utilizando o programa *NetWork* (Bandelt *et al.* 1999).

RESULTADOS

Caracterização das sequências COI-COII do mtDNA de *A. robusta*, *A. sexdens* e *A. bisphaerica*

As sequências COI-COII do mtDNA de *A. robusta* apresentaram tamanhos variando de 561 pb a 579 pb (figura 2). O alinhamento entre estas sequências mostrou que as regiões COI, tRNA^{Leu} e COII das diferentes amostras analisadas apresentaram o mesmo tamanho (117 pb, 75 pb e 226 pb, respectivamente). O tamanho da região IGS, no entanto, foi variável sendo o menor tamanho detectado para o haplótipo H7 (143 pb) e o maior para o haplótipo H2 (161 pb), o que resultou na formação de *gaps* nesta região do alinhamento (figura 2).

A região do gene COI de *A. robusta* amplificada codifica 39 aminoácidos e nenhuma substituição não sinônima foi detectada quando as sequências foram comparadas (figura 2). Foi observado também substituição de citosina por timina na posição 75 da sequência COI (figura 2). A sequência de aminoácidos deduzida a partir destas sequências apresentou 100% de identidade com a de *A. robusta* depositada no *GenBank* (FJ599560.1). Além dos *gaps*, substituições de nucleotídeos foram, também, detectadas no alinhamento das sequências IGS de *A. robusta*. Este evento pode ser observado, por exemplo, nas posições 213, 240 e 246 do alinhamento (figura 2).

Em relação às sequências tRNA^{Leu} e COII de *A. robusta* nenhuma substituição de nucleotídeo foi detectada (figura 2). A comparação destas sequências com sequências equivalentes depositadas no *GenBank* (FJ599560.1) mostrou 100% de identidade de nucleotídeos (dados não mostrados). Além disso, a sequência de 76 aminoácidos codificados pela região COII apresentaram 100% de identidade com sequências de *A. robusta* depositadas no *GenBank* (FJ599560.1).

Ainda considerando as características das sequências COI-COII de *A. robusta*, não foram observadas nas sequências dos genes que codificam para COI,

tRNA^{Leu} e COII, códon de terminação prematura, nem inserções ou deleções que resultam em mudanças de fase de leitura.

Ao comparar o tamanho das sequências COI-COII de *A. robusta*, *A. sexdens* e *A. bisphaerica* observou-se que as regiões COI, COII e tRNA^{Leu} das três espécies apresentaram o mesmo tamanho. No entanto, o tamanho da região IGS para *A. robusta* variou de 143 a 161 pb enquanto os de *A. sexdens* e *A. bisphaerica* foram de 156 pb e 167 pb, respectivamente (figura 2).

A Tabela 2 (Anexo) mostra que a composição dos nucleotídeos A, T, C e G entre as regiões gênicas e intergênica de *A. robusta*, *A. sexdens* e *A. bisphaerica* é variável sendo a composição de bases A e T predominante. Esta mesma tabela mostra, também, que independentemente da espécie avaliada, as sequências COI e IGS foram as que apresentaram a menor e a maior porcentagem de A+ T respectivamente.

Haplótipos identificados em *A. robusta*

Oito haplótipos mitocondriais foram identificados analisando as sequências COI-COII de *A. robusta*. A (Tabela 2) mostra as frequências dos mesmos e as respectivas localidades amostradas. Os haplótipos H1 e H3 foram os mais frequentes, enquanto os haplótipos H5 e H6 foram os menos frequentes. Os haplótipos H2, H5, H7 e H8 são exclusivos das amostras de São Mateus (ES), Araruama (RJ), Presidente Kennedy (ES) e Marambaia (RJ) respectivamente.

Tabela 2. Haplótipos mitocôndrias de *Atta robusta* identificados, frequências dos haplótipos e respectivas localidades amostradas.

| Haplótipo | Frequência | Localidades | |
|-----------|------------|--|---|
| | | Espírito Santo | Rio de Janeiro |
| H1 | (0,28) | Aracruz, São Mateus, Linhares, Vila Velha | |
| H2 | (0,10) | São Mateus | |
| H3 | (0,35) | Itapemirim, Marataízes, Presidente Kennedy | São Francisco do Itabapoana, São João da Barra, Campos dos Goytacazes, Quissamã, Rio das Ostras |
| H4 | (0,09) | | Cabo Frio, Maricá, Marambaia |
| H5 | (0,03) | | Araruama |
| H6 | (0,03) | Marataízes, Presidente Kennedy | |
| H7 | (0,04) | Presidente Kennedy | |
| H8 | (0,08) | | Marambaia |

COI

1 15 30 45 60 75 90 105

H1 GAATCACTTTCTAAAAAACGCTTATTATTAATATATTCCTTTCTTAACTCTTCCTTAGAATGATTAAGAAAATACCCACCTTTAAATCATAGATTTACAGAAATCCATCTATTGCC

H2 GAATCACTTTCTAAAAAACGCTTATTATTAATATATTCCTTTCTTAACTCTTCCTTAGAATGATTAAGAAAATACCCACCTTTAAATCATAGATTTACAGAAATCCATCTATTGCC

H3 GAATCACTTTCTAAAAAACGCTTATTATTAATATATTCCTTTCTTAACTCTTCCTTAGAATGATTAAGAAAATATCCACCTTTAAATCATAGATTTACAGAAATCCATCTATTGCC

H4 GAATCACTTTCTAAAAAACGCTTATTATTAATATATTCCTTTCTTAACTCTTCCTTAGAATGATTAAGAAAATACCCACCTTTAAATCATAGATTTACAGAAATCCATCTATTGCC

H5 GAATCACTTTCTAAAAAACGCTTATTATTAATATATTCCTTTCTTAACTCTTCCTTAGAATGATTAAGAAAATACCCACCTTTAAATCATAGATTTACAGAAATCCATCTATTGCC

H6 GAATCACTTTCTAAAAAACGCTTATTATTAATATATTCCTTTCTTAACTCTTCCTTAGAATGATTAAGAAAATATCCACCTTTAAATCATAGATTTACAGAAATCCATCTATTGCC

H7 GAATCACTTTCTAAAAAACGCTTATTATTAATATATTCCTTTCTTAACTCTTCCTTAGAATGATTAAGAAAATATCCACCTTTAAATCATAGATTTACAGAAATCCATCTATTGCC

H8 GAATCACTTTCTAAAAAACGCTTATTATTAATATATTCCTTTCTTAACTCTTCCTTAGAATGATTAAGAAAATACCCACCTTTAAATCATAGATTTACAGAAATCCATCTATTGCC

Sequência de aminoácidos E S L S K K R L I I N M F F L N S S L E W L S K Y P P L N H S F T E I P S I A

Figura 2. Haplótipos mitocondriais (H1 a H8) detectados com base nas sequências COI-COII do mtDNA de *Atta robusta*. A sequência de aminoácidos deduzida a partir das sequências gênicas também é mostrada. Bases de cor vermelha: região onde se observa gaps. Bases de cor verde: regiões onde se observa duplicações de bases. Bases de cor azul: região onde se observa substituição de nucleotídeo.

Continuação IGS

H1 120 135 150 165 180 195 210 225 240 255 270
H1 TAATTTCCICTATTCTTCCTAATTTTTAAAATCCACTTT- AAATCACTAAATCCA-----AATCAAATTTTTAAATTTTAAATTAATTTAT--TCCCTTTTTACTTAATC-TATAICTATCTTATTGTATTATTTTTATTTTTACATTAATCATTATAAATA
H2 TAATTTCCICTATTCTTCCTAATTTTTAAAATCCACTTT- AAATCACTAAATCCAATCAAATTTTTAAATTTTAAATTAATTTAT--TCCCTTTTTACTTAATC-TATAICTATCTTATTGTATTATTTTTATTTTTACATTAATCATTATAAATA
H3 TAATTTCCICTATTCTTCCTAATTTTTAAAATCCACTTT- AAATCACTAAATCCA-----AATCAAATTTTTAAATTTTAAATTAATTTAT--TACCCTTTTTACTTAATC-TATAICTATTTTATTATATTATTTTTATTTTTACATTAATCATTATAAATA
H4 TAATTTCCICTATTCTTCCTAATTTTTAAAATCCACTTT- AAATCACTAAATCCA-----AATCAAATTTTTAAATTTTAAATTAATTTAT--TACCCTTTTTACTTAATC-TATAICTATTTTATTGTATTATTTTTATTTTTACATTAATCATTATAAATA
H5 TAATTTCCICTATTCTTCCTAATTTTTAAAATCCACTTTTAAATCACTAAATCCA-----AATCAAATTTTTAAATTTTAAATTAATTTAT--TACCCTTTTTACTTAATC-TATAICTATTTTATTGTATTATTTTTATTTTTACATTAATCATTATAAATA
H6 TAATTTCCICTATTCTTCCTAATTTTTAAAATCCACTTT- AAATCACTAAATCCA-----AATCAAATTTTTAAATTTTAAATTAATTTATATTTACCCTTTTTACTTAATC-TATAICTATTTTATTATATTATTTTTATTTTTACATTAATCATTATAAATA
H7 TAAT- -----CCTAATTTTTAAAATCCACTTT- AAATCACTAAATCCA-----AATCAAATTTTTAAATTTTAAATTAATTTAT--TACCCTTTTTACTTAATC-TATAICTATTTTATTATATTATTTTTATTTTTACATTAATCATTATAAATA
H8 TAATTTCCICTATTCTTCCTAATTTTTAAAATCCACTTT- AAATCACTAAATCCA-----AATCAAATTTTTAAATTTTAAATTAATTTAT--TACCCTTTTTACTTAATCTATAICTATTTTATTATATTATTTTTATTTTTACATTAATCATTATAAATA

Continuação tRNA^{Leu}

H1 285 300 315 330 345
H1 TTTTAATATGGCAGAATAGTGCATTGAATTTAAACTTCAATAAAAAAGACCATATATCTTTTATTTAAAAATTAAT
H2 TTTTAATATGGCAGAATAGTGCATTGAATTTAAACTTCAATAAAAAAGACCATATATCTTTTATTTAAAAATTAAT
H3 TTTTAATATGGCAGAATAGTGCATTGAATTTAAACTTCAATAAAAAAGACCATATATCTTTTATTTAAAAATTAAT
H4 TTTTAATATGGCAGAATAGTGCATTGAATTTAAACTTCAATAAAAAAGACCATATATCTTTTATTTAAAAATTAAT
H5 TTTTAATATGGCAGAATAGTGCATTGAATTTAAACTTCAATAAAAAAGACCATATATCTTTTATTTAAAAATTAAT
H6 TTTTAATATGGCAGAATAGTGCATTGAATTTAAACTTCAATAAAAAAGACCATATATCTTTTATTTAAAAATTAAT
H7 TTTTAATATGGCAGAATAGTGCATTGAATTTAAACTTCAATAAAAAAGACCATATATCTTTTATTTAAAAATTAAT
H8 TTTTAATATGGCAGAATAGTGCATTGAATTTAAACTTCAATAAAAAAGACCATATATCTTTTATTTAAAAATTAAT

Continuação COII

H1 ³⁶⁰ACATGATTAATTTCCCTCCAAGATTCTAACTCACCTACTTATGACTTAAATAATTTTTTCCACGATTCGCTATAATTATCTTAACTTACATCACTATTTAAATTTATTTATTACATTTAGATTAATAATCTAACA³⁷⁵AAATTTATTAATCGATTTTACTAG³⁹⁰
H2 ACATGATTAATTTCCCTCCAAGATTCTAACTCACCTACTTATGACTTAAATAATTTTTTCCACGATTCGCTATAATTATCTTAACTTACATCACTATTTAAATTTATTTATTACATTTAGATTAATAATCTAACA⁴⁰⁵AAATTTATTAATCGATTTTACTAG⁴²⁰
H3 ACATGATTAATTTCCCTCCAAGATTCTAACTCACCTACTTATGACTTAAATAATTTTTTCCACGATTCGCTATAATTATCTTAACTTACATCACTATTTAAATTTATTTATTACATTTAGATTAATAATCTAACA⁴³⁵AAATTTATTAATCGATTTTACTAG⁴⁵⁰
H4 ACATGATTAATTTCCCTCCAAGATTCTAACTCACCTACTTATGACTTAAATAATTTTTTCCACGATTCGCTATAATTATCTTAACTTACATCACTATTTAAATTTATTTATTACATTTAGATTAATAATCTAACA⁴⁶⁵AAATTTATTAATCGATTTTACTAG⁴⁸⁰
H5 ACATGATTAATTTCCCTCCAAGATTCTAACTCACCTACTTATGACTTAAATAATTTTTTCCACGATTCGCTATAATTATCTTAACTTACATCACTATTTAAATTTATTTATTACATTTAGATTAATAATCTAACA⁴⁹⁵AAATTTATTAATCGATTTTACTAG⁵¹⁰
H6 ACATGATTAATTTCCCTCCAAGATTCTAACTCACCTACTTATGACTTAAATAATTTTTTCCACGATTCGCTATAATTATCTTAACTTACATCACTATTTAAATTTATTTATTACATTTAGATTAATAATCTAACA⁵¹⁰AAATTTATTAATCGATTTTACTAG
H7 ACATGATTAATTTCCCTCCAAGATTCTAACTCACCTACTTATGACTTAAATAATTTTTTCCACGATTCGCTATAATTATCTTAACTTACATCACTATTTAAATTTATTTATTACATTTAGATTAATAATCTAACA⁵¹⁰AAATTTATTAATCGATTTTACTAG
H8 ACATGATTAATTTCCCTCCAAGATTCTAACTCACCTACTTATGACTTAAATAATTTTTTCCACGATTCGCTATAATTATCTTAACTTACATCACTATTTAAATTTATTTATTACATTTAGATTAATAATCTAACA⁵¹⁰AAATTTATTAATCGATTTTACTAG

Continuação COII

H1 ⁵²⁵AAAATCAAAC⁵⁴⁰TATTGAAATTGTTTGAAC⁵⁵⁵TATTCTACCAATATTTATTC⁵⁷⁰TTATTGCTATAGCTATCC
H2 AAAATCAAAC⁵⁴⁰TATTGAAATTGTTTGAAC⁵⁵⁵TATTCTACCAATATTTATTC⁵⁷⁰TTATTGCTATAGCTATCC
H3 AAAATCAAAC⁵⁴⁰TATTGAAATTGTTTGAAC⁵⁵⁵TATTCTACCAATATTTATTC⁵⁷⁰TTATTGCTATAGCTATCC
H4 AAAATCAAAC⁵⁴⁰TATTGAAATTGTTTGAAC⁵⁵⁵TATTCTACCAATATTTATTC⁵⁷⁰TTATTGCTATAGCTATCC
H5 AAAATCAAAC⁵⁴⁰TATTGAAATTGTTTGAAC⁵⁵⁵TATTCTACCAATATTTATTC⁵⁷⁰TTATTGCTATAGCTATCC
H6 AAAATCAAAC⁵⁴⁰TATTGAAATTGTTTGAAC⁵⁵⁵TATTCTACCAATATTTATTC⁵⁷⁰TTATTGCTATAGCTATCC
H7 AAAATCAAAC⁵⁴⁰TATTGAAATTGTTTGAAC⁵⁵⁵TATTCTACCAATATTTATTC⁵⁷⁰TTATTGCTATAGCTATCC
H8 AAAATCAAAC⁵⁴⁰TATTGAAATTGTTTGAAC⁵⁵⁵TATTCTACCAATATTTATTC⁵⁷⁰TTATTGCTATAGCTATCC

Seqüência de aminoácidos T W L I S L Q D S N S P T Y D L M I F F H D F A M I I L T Y I T I L I L F I T F S L M S N K F I N R F L L E N Q T I E I V W T I L P M F I L I A M A I

Rede de haplótipos com base em sequências COI e IGS da região COI-COII do mtDNA de *Atta robusta*

Os oito haplótipos mitocondriais identificados em *A. robusta* (Tabela 2) foram utilizados para obtenção da rede de haplótipos (Figura 3). Esta rede mostrou que o número de passos mutacionais entre os haplótipos variou de 1 a 13. Os oito haplótipos formam três haplogrupos que se encontram geograficamente estruturados ao longo da área de ocorrência de *A. robusta* (Figura 4). As diversidades nucleotídica (π) e haplotípica (H_d) foram de $0,00821 \pm 0,0003$ e $0,7789 \pm 0,03$ respectivamente.

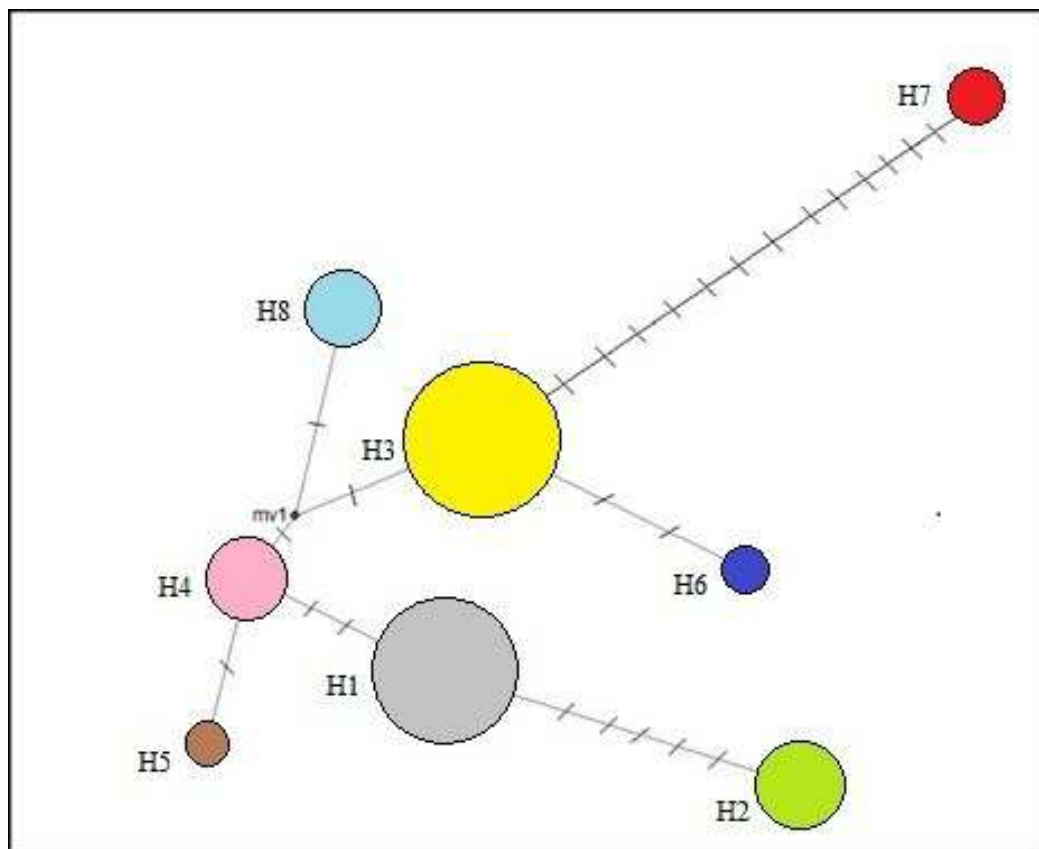


Figura 3. Rede de haplótipos mitocondriais de *A. robusta* inferida com base em sequências COI e sequências IGS concatenadas. Os *gaps* na região IGS foram considerados na análise. Cada círculo corresponde um haplótipo (H1 a H8). O tamanho de cada círculo é proporcional à frequência em que o haplótipo foi

amostrado. Cada traço nas linhas que conectam os haplótipos representa um passo mutacional entre os haplótipos. mv1: haplótipo não amostrado.

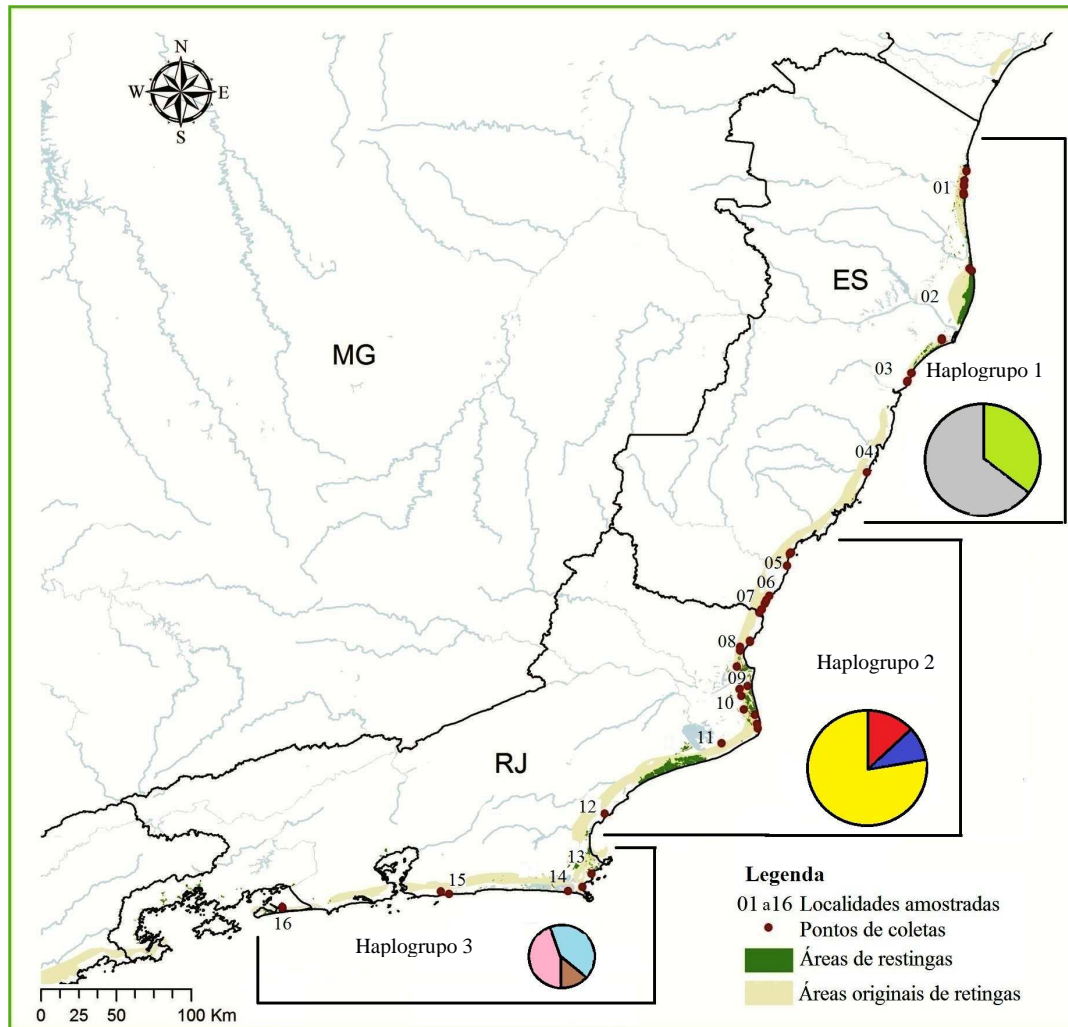


Figura 4: Mapa mostrando localização dos três haplogrupos, 1, 2 e 3 formados pelas populações de *Atta robusta* coletadas nas restingas dos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo e definidos com base na topologia da rede de haplótipos obtida na (Figura 3).

DISCUSSÃO

A ausência de variação nas sequências do gene COII e tRNA^{Leu} avaliadas e a detecção de apenas uma substituição sinônima de nucleotídeo na sequência do gene

COI mostra que, em *A. robusta*, estas três regiões codificadoras são altamente conservadas, estando estes genes mitocondriais sob forte pressão seletiva. Os valores de identidade de nucleotídeos bem como de aminoácidos entre as sequências COII, tRNA^{Leu} e COI de *A. robusta* obtidas neste estudo e sequências equivalentes de *A. robusta* depositadas no GenBank, reforça ainda mais o alto nível de conservação das mesmas nesta espécie. O alto nível de conservação destes genes parece ser comum no gênero *Atta*. Martins *et al* (2007), por exemplo, analisando, com base na região COI-COII, pseudogenes de amostras de *Atta cephalotes* procedentes de diferentes regiões do Brasil e da Colômbia, mostraram que em vários indivíduos avaliados todas as substituições de nucleotídeos identificadas nas sequências COI e a maioria das identificadas na região COII foi sinônima.

A considerável variação, tanto no tamanho como na sequência de nucleotídeos observada na região intergênica (IGS) de *A. robusta*, provavelmente decorrente de fenômenos de duplicação em *tandem* em algumas sequências e/ou deleção de nucleotídeos em outras, explica variação no tamanho total das sequências COI-COII de *A. robusta*. A variação na região IGS já era esperada por ser esta uma região não codificadora e, portanto, menos sujeita a pressão seletiva. Um exemplo de duplicação em *tandem* é a duplicação da sequência ATCCA observada na sequência IGS do haplótipo H2. Eventos de deleção de nucleotídeos foram detectados, por exemplo, na extremidade 5' da sequência IGS do haplótipo H7, onde se observa deleção de treze nucleotídeos quando esta sequência é comparada com as dos demais haplótipos.

A variação no tamanho da região intergênica (IGS) entre *A. robusta* (143 a 161 pb), *A. sexdens* (156 pb) e *A. bisphaerica* (167 pb) também era esperado. Este resultado é congruente com o observado por Bacci *et al.* (2009) que relataram

valores de 131 pb e 207 pb para sequências IGS de *A. laevigata* e *A. mexicana* respectivamente.

A porcentagem de bases A+T nas sequências COI-COII de *A. robusta* foi similar ao observado em *A. sexdens* e *A. bisphaerica*. Esta predominância de bases A+T é concordante com o observado para insetos em geral, onde o mtDNA é rico em A+T, com porcentagens de A+T variando de 60% a 80% (Simon *et al.* 1994).

A região rica em A+T de *A. robusta*, *A. sexdens* e *A. bisphaerica* em relação à das sequências codificadoras, parece ser uma característica comum em insetos considerando que o mesmo foi relatado por Cornuet *et al.* (1991) para *Apis mellifera* (Hymenoptera) e por Lewis *et al.* (1994) para *Drosophila* (Diptera).

Cornuet *et al.* (1991) sugerem que a região IGS de *A. mellifera* possa ter função de origem de replicação do mtDNA da espécie, por apresentar características típicas de regiões de replicação como, por exemplo, formar estruturas secundárias e ser rica em A+T o que facilitaria o início da replicação, já que, neste caso, segundo Kowalski *et al.* (1988), a energia livre necessária para separação de dupla fita de DNA é menor. É possível que em *A. robusta* a região IGS pode ter também a função de origem de replicação. Estudos complementares de caracterização desta região poderão comprovar ou não esta hipótese.

A identificação de haplótipos exclusivos bem como a distribuição de três haplogrupos em três diferentes regiões ao longo da área amostrada sugere que a população de *A. robusta* analisada está altamente estruturada em três possíveis subpopulações dentro da população analisada.

A subdivisão da população de *A. robusta* sugere a ausência ou um limitado fluxo gênico. Entretanto, o alcance de voo das rainhas do gênero *Atta* é relativamente grande, podendo ultrapassar mais de um quilômetro de distância (Moser 1967) o que,

teoricamente, implicaria em alta capacidade de dispersão e, conseqüentemente, facilitaria o fluxo gênico nos períodos de revoada. A ausência de fluxo gênico entre os grupos de *A. robusta* pode ser, então, dentre outros fatores, resultado da constante fragmentação das planícies costeiras, onde vivem estas formigas, agravado pela ocupação imobiliária, principalmente, nas cidades de Vitória no estado do ES e do Rio de Janeiro no estado do RJ. Estas ações humanas podem estar contribuindo para o estabelecimento de barreiras à dispersão de rainhas de *Atta* em períodos de revoada o que comprometeria o fluxo gênico.

A baixa diversidade nucleotídica ($\pi = 0,00821$) e a alta diversidade haplotípica ($Hd = 0,7789$) observada em *A. robusta* são típicas de populações que tiveram expansão territorial recente. Pois, segundo Grand & Bowen (1998), baixa diversidade nucleotídica (abaixo de 0,5) e alta diversidade haplotípica (acima de 0,5) são indícios de que a população passou por um gargalo populacional seguido de um rápido crescimento, acumulando mutações, o qual seria o caso de *A. robusta*.

Segundo Avise *et al.* (1987) cinco padrões filogeográficos denominados de categoria I, II, III, IV e V explicam a estrutura populacional de espécies com base na diversidade genética e distribuição geográfica dos organismos. Considerando a baixa diversidade genética e a alta estruturação populacional de *A. robusta* é possível que esta espécie siga o padrão filogeográfico na categoria III. Trata-se de um padrão filogeográfico típico de populações intimamente ligadas do ponto de vista histórico, mas que apresenta ausência ou limitado fluxo gênico nos dias atuais. Ou seja, é um padrão filogeográfico típico de populações filogeneticamente muito próximas, que se separaram recentemente. A hipótese de que a população de *A. robusta* passou por uma recente expansão territorial na sua área de ocorrência sustenta-se, em parte, pelo fato das restingas, áreas colonizadas pela espécie, se constituírem em ecossistemas

geologicamente recentes (Souza *et al.* 2005) o que é evidenciado pela presença de sedimentos de origem holocênica, com cerca de 5.100 anos, nas desembocaduras de rios do sudeste brasileiro (Suguio *et al.* 1985).

Historicamente, a tribo *Attini* originou-se em florestas tropicais úmidas, mais precisamente na bacia amazônica, que se expandiu durante os períodos interglaciais no Terciário e Quaternário, favorecendo a dispersão desta tribo (Nunes & Jaffé 1998). Além disso, evidências da flora e da fauna da Amazônia e da Mata Atlântica indicam que estes ecossistemas, provavelmente, foram ligados no passado (Bigarella *et al.* 1975) o que facilitaria a dispersão do gênero *Atta*. Condizente com estes relatos, Solomon *et al.* (2008) ao estudarem as espécies *A. sexdens*, *A. laevigata* e *A. cephalotes*, mostraram que o padrão de dispersão biogeográfico destas formigas indica que as mesmas tiveram origem na região amazônica e se dispersaram para outras regiões do Brasil, inclusive para a Mata Atlântica. Considerando a forma de dispersão destas espécies de *Atta* e que os ambientes de restinga são ecossistemas formados recentemente, é possível que os ancestrais de *A. robusta* tenham colonizado áreas no interior da Mata Atlântica e, posteriormente, migrado para as restingas. Um local que pode ter sido nicho ecológico de *A. robusta* são as muçunungas (áreas com características típicas de restingas encontradas no interior da Mata Atlântica) (Saporettie *et al.* 2011). Além disso, há relatos de ocorrência de *A. robusta* em áreas de muçunungas do norte estado do Espírito Santo (Teixeira 2012 comunicação pessoal), o que sustenta ainda mais esta hipótese.

A baixa variabilidade genética e a alta estruturação populacional evidenciada para *A. robusta* somado ao fato de ser uma espécie endêmica de áreas de restinga, reforça a necessidade de se preservar o ecossistema em que vivem, considerando que organismos com baixa diversidade genética tem menor capacidade de adaptação às

mudanças ambientais. A ocorrência de *A. robusta* ao longo do litoral aliada à fragmentação das restingas decorrente da ocupação imobiliária torna esta espécie ainda mais vulnerável, devido à redução do habitat e, conseqüentemente, do tamanho efetivo da população. Isto dificulta, ainda mais, o fluxo gênico entre as regiões fragmentadas aumentando os riscos de perda de variabilidade.

Desta forma, medidas para a preservação das restingas devem ser adotadas a fim de minimizar os impactos causados neste ecossistema. Segundo Haig (1998), os métodos de conservação devem ser adotados com base na estrutura populacional da espécie, sendo que em uma população estruturada geograficamente, sua diversidade deve ser localmente conservada preservando a variabilidade existente entre os grupos. Este é um possível procedimento a ser adotado para a conservação de *A. robusta* em razão dos resultados obtidos neste estudo.

Agradecimentos: A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão das bolsas de estudos. Ao senhor Iris Raimundo Stanciola e Sabrina Simon pelo apoio nas expedições de campo e auxílio nas coletas. Ao professor Marcos Teixeira pelo auxílio nas coletas e indicação das áreas de ocorrência desta espécie. Ao IBAMA pela autorização das coletas das amostras. Ao General Rodrigo Ratton pela autorização de coleta de amostras na restinga de Marambaia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- Avise 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. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489-522.
- Azuma N, Ogata K, Kikuchi T, Higashi S (2006) Phylogeography of Asian weaver ants, *Oecophylla smaragdina*. *Ecological Research* 21: 126-136.
- Bacci M, Solomon SE, Mueller UG, Martins VG, Carvalho AOR, Vieira LGE, Silva-Pinhati ACO (2009) Phylogeny of leafcutter ants in the genus *Atta* Fabricius (Formicidae: Attini) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 51: 427-437.
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48.
- Batalha-Filho H (2008) Distribuição geográfica, filogeografia e história evolutiva da abelha sem ferrão *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae). Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 56 p.
- Bigarella JJ, Andrade LD, Riehs PJ (1975) Considerações a respeito das mudanças paleoambientais na distribuição de algumas espécies vegetais e animais no Brasil. *Academia Brasileira de Ciências* 47: 411-464.
- Cornuet JM, Garnery L, Solignac M (1991) Putative origin and function of the intergenic region between COI and COII of *Apis mellifera* L. Mitochondrial DNA. *Genetics of America* 1128: 393-403.

- Cristiano MP (2009) Variabilidade genética e filogeografia da espécie ameaçada de extinção *Melipona capixaba* Moure e Camargo (Hymenoptera: Apidae). Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 46p.
- Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research* 8: 175-185.
- Ewing B, Green P (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research* 8: 186-194.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.1: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50.
- Fowler HG (1995) The population status of the endangered brazilian endemic leaf-cutting ant *Atta robusta* (Hymenoptera: Formicidae). *Biological Conservation* 74: 147-150.
- Gomes FH, Vidal-Torrado P, Macías F, Gherardi B, Perez XLO (2007) Solos sob vegetação de restinga na ilha do Cardoso (sp). I - caracterização e classificação. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 31: 1563-1580.
- Goropashnaya AV, Fedorov VB, Seifert B, Pamilo P (2004) Limited phylogeographical structure across Eurasia in two red wood ant species *Formica pratensis* and *F. lugubris* (Hymenoptera, Formicidae). *Molecular Ecology* 13: 1849-1858.
- Grand WS, Bowen BW (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.
- Haig SM (1998) Molecular contributions to conservation. *Ecology* 79: 413-425.

- Herz H, Beyschlag W, Holldobler B (2007) Assessing herbivory rates of leaf-cutting ant (*Atta colombica*) colonies through short-term refuse deposition counts. *Biotropica* 39: 476-481.
- Kowalski DA, Natale D, Eddy MJ (1988) Stable DNA unwinding, not “breathing,” accounts for single-strand-specific nuclease hypersensitivity of specific A + T-rich sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85: 9464-9468.
- Lewis DL, Farr CL, Farquhar AL, Kaguni LS (1994) Sequence, Organization, and Evolution of the A+T Region of *Drosophila melanogaster* Mitochondrial DNA. *Molecular Biology and Evolution* 11:523-538.
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analyses of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1452-1452.
- Loeck AE, Grützmacher DD, Storch G (2001) Distribuição geográfica de *Atta sexdens piriventris* Santschi, 1919, nas principais regiões agropecuárias do estado do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Agrociência* 7: 54-57.
- Machado ABM, Brescovit AD, Mielke OH, Casagrande M, Silveira FA, Ohlweiler FP, Zeppelini D, Maria M, Wieloch AH (2003) Invertebrados terrestres. Panorama geral dos invertebrados terrestres ameaçados de extinção. 193p.
- Martins-Jr J, Solomon SE, Mikheyev AS, Mueller UG, Ortiz A, Bacci-Jr M (2007) Nuclear mitochondrial-like sequences in ants: evidence from *Atta cephalotes* (Formicidae: Attini). *Insect Molecular Biology* 16: 777-784.
- Moreau CS, Bell CD, Vila RS, Archibald B, Pierce NE (2006) Phylogeny of the ants: Diversification in the age of angiosperms. *Science* 312: 101-104.
- Moser J (1967) Mating activities of *Atta texana* (Hymenoptera: Formicidae). *Insectes Sociaux* 14: 293-312.

- Nunes AJM, Jaffé K (1998) On the biogeography of Attini (Hymenoptera: Formicidae). *Ecotropicos* 11: 45-54.
- Resende HC, Yotoko KSC, Delabie JHC, Costa MA, Campiolo S, Tavares MG, Campos LAO, Fernandes-Salomão TM (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.
- Santos U, Volcker CM, Belei FA, Cioffi MB, Bertollo LAC, Paiva SR Dergam, JA (2009) Molecular and karyotypic phylogeography in the Neotropical *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae) fish in eastern Brazil. *Journal of Fish Biology*, 75, 2326-2343.
- Saporetto-Junior AW, Schaefer CEGR, Souza AL, Soares MP, Araújo DSD, Meira-Neto JAA (2011) Influence of Soil Physical Properties on Plants of the Mussununga Ecosystem, Brazil. *Folia Geobotanica* 47:29–39.
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crepi B, Liu H, Flook P (1994) Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial polymerase chain reaction primers. *Entomological Society of America* 87: 651- 701.
- Schultz TR, Brady SG (2008) Major evolutionary transitions in ant agriculture. *National Academy of Sciences of the USA* 105: 5435-5440.
- Solomon SE, Bacci-Jr M, Martins-Jr J, Vinha GG, Mueller UG (2008) Paleodistributions and comparative molecular phylogeography of leafcutter ants (*Atta* spp.) Provide new insight into the origins of Amazonian diversity. *PLoS ONE* 3: 1-15.
- Souza CRG, Suguio K, Oliveira AMS, Oliveira PE (2005) *Quaternário do Brasil*. Editora Holos, Ribeirão Preto, São Paulo. 371p.

- Suguió K, Martín L, Bitencourt CSPA, Domínguez JML, Flexor JM, Azevedo AEG (1985) Flutuações do nível relativo do mar durante o quaternário superior ao longo do litoral brasileiro e suas implicações na sedimentação costeira. *Revista Brasileira de Geociências* 15: 273-286.
- 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: 2731–273.
- Teixeira MC, Schoederer JH, Mayhé-Nunes AJ (2003) Geographic Distribution of *Atta robusta* Borgmeier (Hymenoptera: Formicidae). *Neotropical Entomology* 32: 719-721.
- Teixeira MC, Schoederer JH, Louzada JNC (2004) Occurrence of *Atta robusta* Borgmeier (Hymenoptera: Formicidae) in the North of Espírito Santo State, Brazil. *Neotropical Entomology* 33: 265-266.
- Teixeira MC, Santos IA, Schoederer JH (2008) *Atta robusta*: endemismo, extinção ou ausência de estudo? In: *Insetos sociais: da biologia à aplicação*. In: Santos IA, Vilela EF, Schoederer HH, Lino Neto J, Campos LAO and Serrão JE (eds) *Insetos Sociais: da Biologia à Aplicação*. 1ª edição. Editora UFV, Viçosa, MG, Brasil, pp 359-367.
- Waldschmidt AM, Salomão TMF, Barros EG, Campos LAO (1997) Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). *Brazilian Journal of Genetics* 20: 421-423.

CAPÍTULO II

Relações filogenéticas entre espécies do gênero *Atta* e tempo de divergência da espécie ameaçada *Atta robusta* (Hymenoptera, Formicidae)

RESUMO - *Atta robusta*, formiga endêmica das restingas dos estados do Rio de Janeiro e do Espírito Santo foi descrita originalmente como subespécie de *Atta sexdens*, e, posteriormente, elevada à categoria de espécie. Estudos genéticos com abordagens filogenéticas no gênero *Atta* incluindo *A. robusta* são raros. Considerando que este tipo de estudo poderá resultar em dados que poderão contribuir para a elucidação de questões relativas a processos evolutivos da espécie, o presente estudo investigou, com base em sequências concatenadas de EF1 (nDNA) e COICOII (mtDNA), relações de parentesco entre espécies de *Atta*, incluindo *A. robusta*. Além disso, foi estimado o tempo do ancestral comum mais recente para *A. robusta*. Para a reconstrução filogenética utilizou-se estatística Bayesiana. O Programa Beast foi empregado para estimar o tempo do ancestral comum mais recente de *A. robusta*. A árvore filogenética obtida mostrou claramente que *A. robusta* é um grupo monofilético e derivado em relação às outras espécies de *Atta* analisadas. As espécies de *A. sexdens* e *A. robusta* aparecem como grupos irmãos claramente distintos e com alto valor de probabilidade Bayesiana. O tempo do ancestral comum de *A. robusta* foi estimado em 7,8 milhões de anos, embora a maioria das amostras de *A. robusta* tenha se diversificado por volta de 2 milhões de anos. Os resultados obtidos constituem informações importantes para compreensão da história evolutiva de *A. robusta*, formiga endêmica e ameaçada de extinção nas restingas do sudeste brasileiro.

Palavras chaves: Attini, Biologia molecular, DNA, Filogenia.

ABSTRACT – *Atta robusta*, an ant endemic to restingas of the Brazilian states of Rio de Janeiro and Espírito Santo, was originally described as a subspecies of *Atta sexdens*, and later elevated to the category of species. Genetic studies with phylogenetic approaches in the genus *Atta* including *A. robusta* are rare. Considering that this type of study can result in data which may contribute to the elucidation of issues related to species evolutionary processes, this study investigated, based on concatenated sequences of EF1 (nDNA) and COICOII (mtDNA), relationships among *Atta* species, including *A. robusta*. Furthermore, the time to the most recent common ancestor for *A. robusta* was estimated. Bayesian statistics was used for phylogenetic reconstruction; and the Beast Program was used to estimate the time of the most recent common ancestor of *A. robusta*. The phylogenetic tree obtained clearly showed that *A. robusta* is a monophyletic and derived group in relation to the other *Atta* species analyzed. The species *A. sexdens* and *A. robusta* appear as clearly distinct sister groups with high Bayesian probability. Time of the common ancestor of *A. robusta* was estimated at 7.8 million years, although the majority of *A. robusta* samples have diversified for roughly 2 million years. The results obtained provide important information for understanding the evolutionary history of *A. robusta*, an endemic ant and endangered species round in the restingas of southeastern Brazil.

Keywords: Attini, Molecular biology, DNA, Phylogeny.

INTRODUÇÃO

As formigas surgiram há milhões de anos e se estabeleceram com sucesso no Planeta. Dentre as formigas destacam-se as da tribo *Attini* (subfamília Myrmicinae) que surgiu há aproximadamente 50 milhões de anos (Moreau *et al.* 2006) e é conhecida pelo cultivo de um fungo simbiote. Esta tribo compreende 13 gêneros com aproximadamente 230 espécies descritas (Brandão & Mayhé-Nunes, 2001; Schultz & Brady, 2008), incluindo as espécies do gênero *Atta* popularmente conhecidas como saúvas.

Atta robusta, saúva preta, foi descrita em 1939 por Thomaz Borgmeier, que inicialmente a classificou como uma subespécie de *A. sexdens*. Porém, Gonçalves em 1942, com base na morfologia do aparelho genital de machos, demonstrou que *A. robusta* constituía uma espécie independente. Posteriormente, os dados de Gonçalves foram confirmados com exemplares coletados na região de São Bento, no estado do Rio de Janeiro (Borgmeier, 1950).

Os estudos realizados com *A. robusta* foram, principalmente, sobre sua distribuição geográfica e características comportamentais da espécie (Teixeira *et al.* 2003, Teixeira *et al.* 2004, Teixeira *et al.* 2008) e previsão de nicho ecológico (Datillo *et al.* 2012). Características atribuídas a esta espécie como possível endemismo, ameaça de extinção e relevância ecológica tem despertado o interesse de pesquisadores em conhecer melhor esta espécie.

Alguns estudos genéticos empregando marcadores do DNA com abordagens filogenéticas ou filogeográficas de espécies do gênero *Atta* tem sido documentados (Moreau *et al.* 2006, Schultz & Brady 2008, Solomon *et al.* 2008). No entanto, o único estudo filogenético envolvendo *A. robusta* é o relatado por Bacci *et al.* (2009). Neste estudo, foi comprovado, com base em análise de sequências COI/COII

(mtDNA) e EF1 α (nDNA), a monofilia do gênero *Atta* e confirmada a subdivisão do gênero em quatro subgêneros, *Neoatta*, *Epiatta*, *Atta* e *Archeatta*, mostrando que *A. sexdens* e *A. robusta*, juntas, formam um grupo monofilético, o subgênero *Neoatta*.

Apesar de pertencerem ao mesmo subgênero, as relações filogenéticas entre *A. robusta* e as subespécies de *A. sexdens* não foram detalhadas. Além disso, o tempo de divergência de *A. robusta* no gênero *Atta* não foi ainda relatado. Tanto as relações filogenéticas como a estimativa de tempo de divergência entre formigas mais aparentadas são inferidas, atualmente, com base em análises de sequências de DNA nuclear (nDNA) e DNA mitocondrial (mtDNA) combinados (Schultz e Brady, 2008, Bacci *et al.* 2009 e Sarnat e Moreau 2011).

A proposta do presente estudo é ampliar os conhecimentos acerca das relações filogenéticas entre *A. robusta* e outras espécies de *Atta*, bem como estimar o tempo de divergência da mesma no gênero utilizando informações de sequências de mtDNA e nDNA.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostragem e extração do DNA total de *Atta robusta*

Um total de 12 colônias de *A. robusta* foram amostradas em 12 localidades diferentes (uma colônia por localidade e uma amostra por colônia) sendo seis colônias amostradas no estado do Espírito Santo (ES) e seis no Rio de Janeiro (RJ) (Tabela 1 - Anexo). As operárias foram armazenadas em etanol absoluto a -80° C até a extração de DNA. O DNA total de cada operária foi extraído conforme recomendado por Waldschmidt *et al.* (1997), utilizando apenas o tórax de cada indivíduo.

Amplificação parcial do gene EF1 α (nDNA) e amplificação da região COI-COII (mtDNA) de *Atta robusta*

O DNA extraído foi utilizado nas reações de amplificação parcial do gene EF1 α (nDNA) e amplificação da região COI-COII (mtDNA) de *A. robusta* utilizando o par de *primer* U52.1 e L53 com sequências (CCGCTTCAGGATGTCTATAA) e (CCGCGTCTCAGTTCYTTCAC), respectivamente (Lapolla *et al.* 2006) e o par de *primer*, C1-J-2828^a e C2-N-3386^a, com sequências (ATTCATTCTTATCTTGAAATATTATTTTC) e (TTCATAAGTTCAGTATCATTGGTG), respectivamente (Martins *et al.* 2007).

A amplificação de EF1 α foi realizada em 25 μ L de uma mistura contendo tampão flexi Go® Taq 1X (Promega); 1,0 mM de MgCl₂; 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato; 0,4 μ M de cada *primer*; 1,0 U de DNA polimerase Go® Taq (Promega) e aproximadamente 30 ng de DNA total. As condições de amplificação consistiram de um passo de desnaturação inicial a 94 °C por 1:20 minutos; seguido por 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto; 54 °C por 30 segundos e 68 °C por 20 segundos e um passo final de extensão a 68 °C por 4 minutos.

A região COI-COII amplificada compreende três genes, o Citocromo oxidase I (COI), tRNA leucine (tRNA^{leu}) e Citocromo oxidase II (COII), além do espaçador intergênico (IGS) localizado entre COI e tRNA. As reações de amplificação continha em uma mistura de 25 μ L, contendo tampão flexi Go® Taq 1X (Promega); 1,0 mM de MgCl₂; 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato; 0,4 μ M de cada *primer*; 1,5 U de DNA polimerase Go® Taq (Promega) e aproximadamente 30 ng de DNA total. As condições de amplificação consistiram de um passo de desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, seguido por 30 ciclos de, 94

°C por 10 segundos; 50 °C por 1 minuto; 72 °C por 3 minutos e, um passo final de extensão de 70 °C por 15 minutos.

A reação de PCR foi conduzida em termociclador *Mastercycler Gradient* da *Eppendorf* e os produtos PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% para a confirmação da amplificação.

Sequenciamento, alinhamento de sequências e análise filogenética de espécies de *Atta*.

Amostras dos produtos de PCR foram preparadas de acordo com as especificações da empresa MacroGen para onde foram enviadas e sequenciadas em ambas as direções (*forward* e *reverse*). As sequências *forward* e *reverse* obtidas foram avaliadas e utilizadas para obtenção de sequências consenso utilizando o pacote de programa, *Phred*, *Phrap* e *Consed* (Ewing *et al.* 1998; Ewing & Green 1998). Para conferir a identidade das sequências obtidas, as mesmas foram comparadas com sequências equivalentes de *A. robusta* depositadas no *Genbank*.

As sequências EF1 α e COI-COII de *A. robusta* obtidas foram alinhadas juntamente com sequências equivalentes de outras espécies de *Atta* (subespécies de *A. sexdens* (seis), *A. laevigata* (três), *A. bisphaerica* (duas), *A. capiguara* (duas), *A. opaciceps* (uma), *A. columbica* (uma), *A. texana* (uma), *A. mexicana* (uma), *A. insularis* (uma) e de *Acromyrmex*, *Acromyrmex octospinosus* (duas) depositadas no *Genbank*) (Tabela 1 - Anexo). *Acromyrmex octospinosus* foi utilizada como grupo externo.

O alinhamento das sequências pelo método de *CLUSTAL W* e as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa *MEGA 5* (Tamura *et al.* 2011).

Após o alinhamento das sequências EF1 α foram excluídos alguns nucleotídeos da extremidade 5' das mesmas, obtendo-se sequências de 279 pb. Após

o alinhamento das sequências COI-COII, foram excluídos as regiões do gene tRNA^{leu}, a região intergênica IGS e alguns nucleotídeos da extremidade 5` da região COI destas sequências, obtendo-se sequências de 467 pb que continham, portanto, apenas as regiões COI e COII (COI+COII). As sequências COI+COII (467 pb) foram concatenadas com as sequências EF1 α (279 pb) obtendo-se sequências de 746 pb que foram utilizadas nas análises filogenéticas.

O programa *MrModeltest* (Nylander 2004) foi empregado para auxiliar na escolha do modelo de evolução molecular. O modelo HKY + G foi escolhido para as sequências EF1 α e o modelo GTR + I + G para as sequências COI+COII. A árvore filogenética foi construída utilizando as sequências EF1 α e COI+COII concatenadas. Para a obtenção da árvore filogenética foi empregado o programa *MrBayes 3.1* (Huelsenbech e Ronquist, 2001), com 1.000.000 de gerações, excluindo 25% das gerações iniciais. A árvore obtida e os valores de probabilidade a posterior foram visualizados por meio do programa *Figtree v1.3.1* (Rambaut 2009).

Estimativa do tempo do ancestral comum mais recente (Tmrca) de *Atta robusta*

O tempo do ancestral comum mais recente (Tmrca) para *A. robusta* foi estimado utilizando o pacote de programa *Beast v1.6.1* (Drummond & Rambaut 2010). Também nesta análise foram utilizados o modelo de evolução molecular GTR + I + G para as sequências COI+COII e o modelo HKY + G para as sequências EF1 α . Para a datação do tempo de divergência do último ancestral comum de *A. robusta* foi utilizado o modelo de relógio molecular relaxado e o processo de especiação. Como ponto de calibração utilizou-se o tempo de 10 milhões de anos, que representa a média do tempo estimado para formigas cortadeiras, 8 a 12 milhões de anos (Schultz e Brady 2008). Durante a análise considerou-se 10.000.000 de

gerações, excluindo-se as 1.000 gerações iniciais. A árvore foi visualizada por meio do programa *Figtree v1.2* (Rambaut 2009).

RESULTADOS

As sequências EF1 α e COI+COII concatenadas (746 pb) apresentaram 76,6% dos sítios conservados e 23,4% variáveis. Dentre os sítios variáveis, 18% foram informativos. Estas sequências foram utilizadas para obtenção da árvore filogenética representada na Figura 1.

As espécies *A. texana*, *A. mexicana* e *A. insularis* formaram um clado monofilético e basal com alto valor de probabilidade posterior (1,0). Da mesma forma, o grupo constituído por *A. bisphaerica*, *A. capiguara*, *A. volllenweideri* e *A. laevigata* bem como o formado por *A. robusta* e as subespécies de *A. sexdens* também, formam, um clado monofilético com alto valor de probabilidade posterior, 0,97 e 0,89 respectivamente. Dentro do clado que inclui *A. robusta* e as subespécies de *A. sexdens*, *A. robusta* forma um clado monofilético com alto valor de probabilidade posterior (1,0).

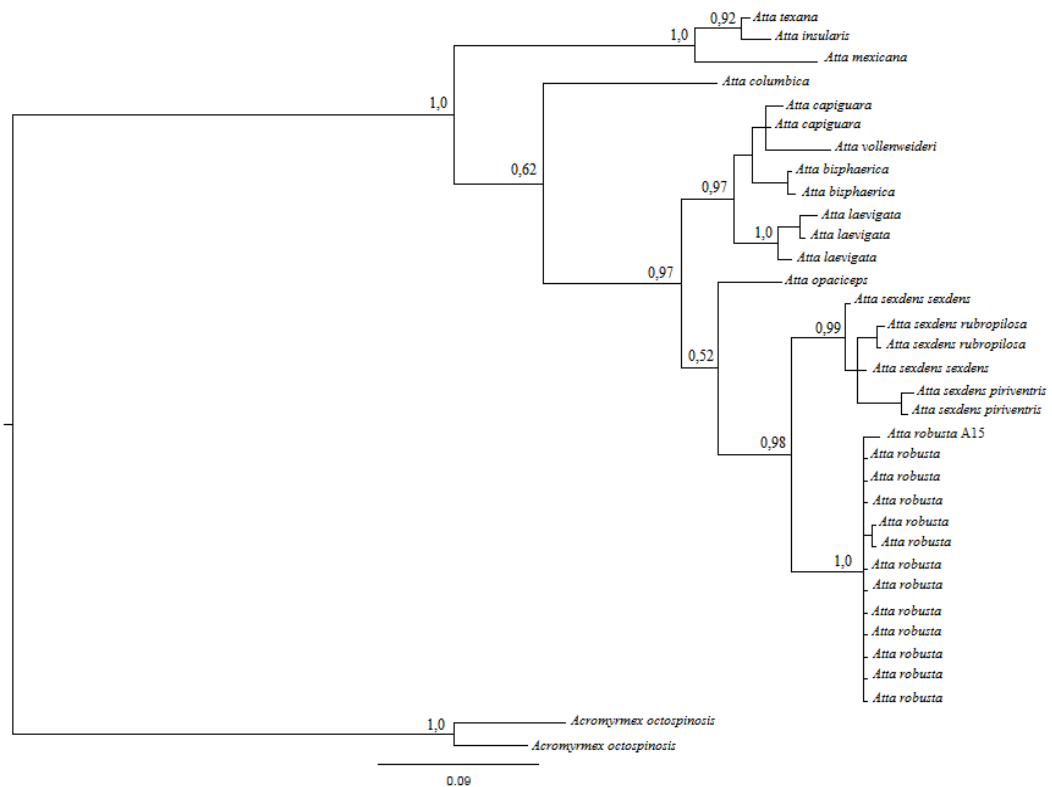


Figura 1: Árvore filogenética de espécies do gênero *Atta* obtida por inferência Bayesiana com 1.000.000 de gerações e utilizando sequências dos genes EF1 α COI+COII e concatenados. *Acromyrmex octospinosis* foi utilizada como grupo externo. Os suportes dos ramos são probabilidades Bayesianas posterior.

Estimativa do Tempo do ancestral comum mais recente de *Atta robusta*

O tempo de divergência do ancestral comum mais recente (Tmrca) foi estimado em 7,8 milhões de anos (período conhecido como Mioceno) com intervalo de confiança entre o mínimo de 5,7 e o máximo de 10 milhões (Figuras 2 e 3). A maioria das amostras de *A. robusta* analisadas diversificou entre 2,5 milhões a 500 mil anos (Figura 2), entre o final do Plioceno e durante o Pleistoceno.

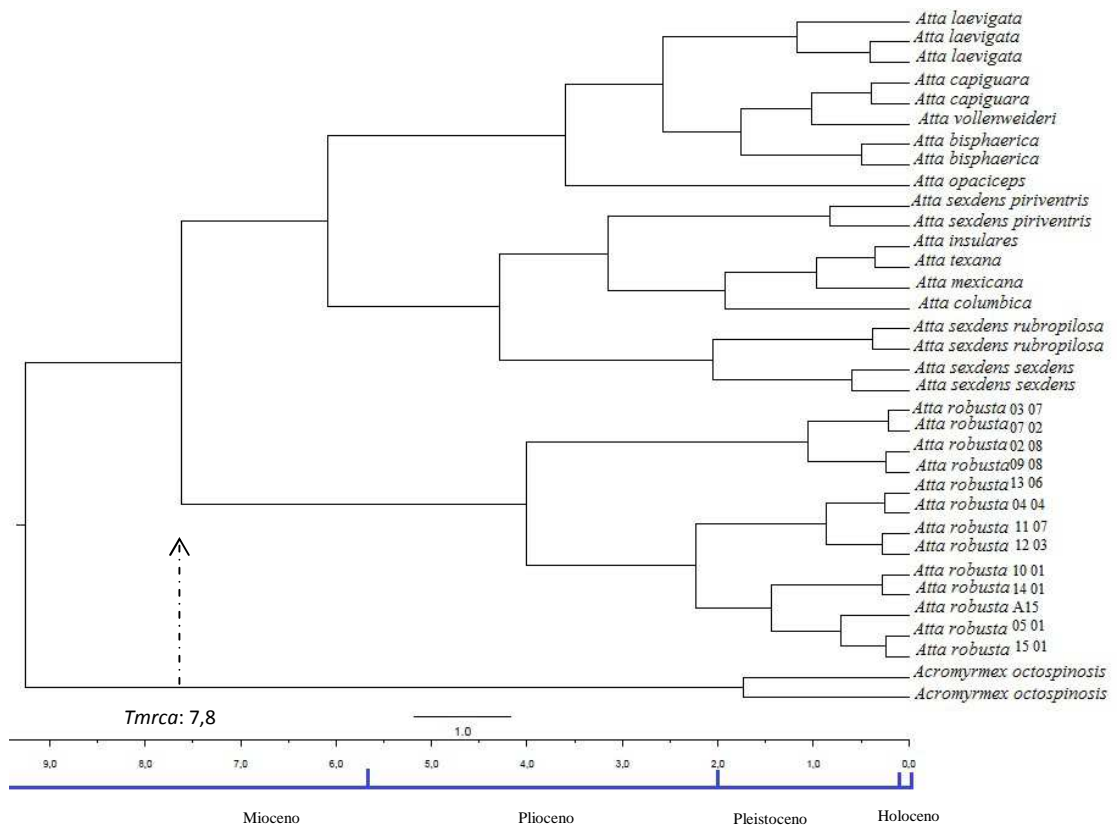


Figura 2: Árvore filogenética de espécies do gênero *Atta* obtida com base em sequências EF1 α e COI+COII concatenadas, utilizando o pacote de programa *Beast* com 10.000.000 gerações. A seta tracejada na vertical indica o Tmrca de *A. robusta* (7,8 milhões de anos). A barra horizontal preta indica o tempo em milhões de anos. A barra azul indica as épocas geológicas correspondentes aos milhões de anos indicados na barra preta.

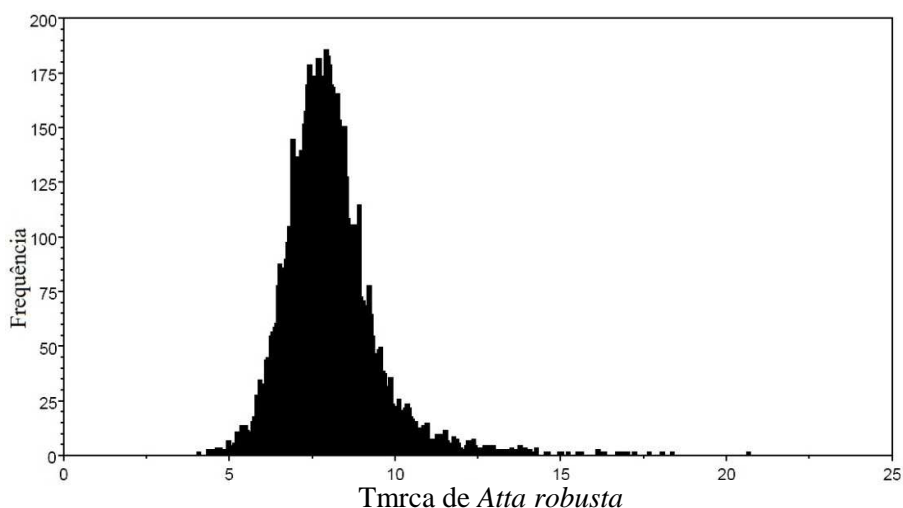


Figura 3: Gráfico obtido pelo programa *Beast* mostrando o tempo de divergência do último ancestral comum (tmrca) de *Atta robusta*. A variação de tmrca entre o mínimo de 5,7 a um máximo de 10 milhões de anos com pico máximo em 7,8 milhões de anos mostra o intervalo de provável divergência do grupo. Este intervalo contém 95% dos valores amostrados para baixo e para cima da média (95% *HPD lower* – 95% *HPD upper*).

DISCUSSÃO

A utilização das sequências EF1 α e COI+COII concatenadas resultou em uma reconstrução filogenética com considerável resolução, podendo-se inferir sobre a filogenia do grupo de formigas estudadas. As espécies geograficamente mais distantes, *A. texana*, *A. mexicana* e *A. insularis*, que são endêmicas e ocorrem na região sul da América do Norte, no México e em Cuba, respectivamente (Nunes e Jaffé 1998), formaram um clado monofilético e irmão do clado formado pelas outras espécies de *Atta*, as quais são amplamente distribuídas na América do Sul. Este mesmo agrupamento, já havia sido relatado, por Bacci *et al.* (2009). Segundo Nunes e Jaffé (1998), *A. insularis* de Cuba pode ter surgido através de vicariância juntamente com *A. mexicana* da América Central, pois são membros do mesmo subgênero e compartilham um ancestral comum.

Neste grupo de espécies de *Atta* estudado, o grupo monofilético formado por *A. texana*, *A. mexicana* e *A. insulares* mostra-se com ramos mais curtos, enquanto o clado formado por *A. robusta* aparece com ramos mais longos. Estes dados são condizentes com os observados por Gonçalves (1942), que mostrou com base na morfologia externa da genitália dos machos, *A. mexicana* como espécie basal e *A. sexdens* e suas subespécies como derivadas.

A relação de parentesco entre *A. columbica* que também tem uma distribuição geográfica mais restrita, ocorrendo na Colômbia e Guatemala (Fernandez 2003), e as demais espécies avaliadas, não se mostra resolvida na árvore filogenética, pois o valor da probabilidade posterior que sustenta o clado foi baixo. O mesmo resultado foi observado para *A. opaciseps* considerando que o valor de probabilidade posterior foi baixo. A formação do grupo monofilético que incluiu *A. bisphaerica*, *A. capiguara*, *A. volllenweideri* e *A. laevigata* sustentado por alta probabilidade posterior foi, também, relatado por Bacci *et al.* (2009).

Neste estudo a espécie *A. robusta* e as subespécies de *A. sexdens* foram incluídas no mesmo clado, o que era esperado considerando que segundo Bacci *et al.* (2009) as mesmas pertencem ao subgênero *Neoatta*. O alto nível de sustentabilidade do clado de *A. robusta* deixou evidente a monofilia deste grupo. Esta proximidade filogenética entre *A. robusta* e as subespécies *A. sexdens* é congruente com o descrito por Borgmeier (1939) que considerou, originalmente, *A. robusta* como subespécie de *A. sexdens*. Além de grupos filogeneticamente distintos, as subespécies de *A. sexdens* e *A. robusta* apresentam diferenças ecológicas, *A. robusta* coloniza áreas integras de restingas construindo ninhos sob vegetação típica desse ecossistema, enquanto as subespécies de *A. sexdens*, não colonizam áreas de restingas e são adaptadas a ambientes degradados assim como áreas utilizadas para práticas agrícolas.

O tempo de divergência do ancestral comum mais recente de *A. robusta*, estimado em 7,8 milhões de anos, está no final da época conhecida como Mioceno que se estendeu entre 5 a 23 milhões de anos atrás durante o período do Quaternário (Souza *et al.* 2005). Assim como para *A. robusta*, outras espécies deste gênero, *A. sexdens*, *A. laevigata* e *A. chephalotes*, também, tiveram, o tempo de divergência estimado entre o final do Mioceno e Pleistoceno (Solomon *et al.* 2008).

A calibração do relógio molecular também permitiu inferir sobre o período de dispersão da população de *A. robusta*. Apesar do último ancestral comum da espécie ser datado em 7,8 milhões de anos, estima-se que a maioria das amostras de *A. robusta* avaliadas neste estudo, começaram a se diversificar por volta de 2 milhões de anos, ou seja, no final do Plioceno, se estendendo até mais ou menos 500 mil anos no período do Pleistoceno.

Alguns autores relatam que as características do paleoclima no Pleistoceno e Holoceno contribuíram para o processo de diversificação e dispersão destas espécies de formigas. Segundo Nunes e Jaffé (1998), durante os períodos glaciais, o clima na América do Sul era mais seco, contrastando com o clima da floresta amazônica. Posteriormente, durante os períodos interglaciais no Terciário e Quaternário (Pleistoceno e Holoceno) a floresta da amazônica se expandiu, favorecendo a expansão geográfica do grupo *Attini* para as outras áreas do Brasil.

A estimativa do tempo de divergência em 7,8 milhões de anos no Mioceno, e a posterior diversificação da população de *A. robusta* no Pleistoceno, reforçam a hipótese de que *A. robusta*, possivelmente, sofreu um gargalo populacional com posterior dispersão da população e expansão territorial. Essa hipótese, sustenta-se, em parte, pelo fato das restingas, áreas colonizadas pela espécie, se constituírem em ecossistemas geologicamente recentes (Souza *et al.* 2005) o que é evidenciado pela

presença de sedimentos de origem holocênica, com cerca de 5.100 anos, nas desembocaduras de rios do sudeste brasileiro (Suguio *et al.* 1985).

Os resultados apresentados mostraram que as informações contidas nos genes analisados permitiram a reconstrução, com boa resolução, das relações filogenéticas no grupo de formigas analisado. A análise das sequências EF1 α e COI+COII e a estatística bayesiana empregada mostram que *A. robusta* é um grupo monofilético, separado claramente das subespécies de *A. sexdens* e que forma um clado com ramos longos em relação às outras espécies de *Atta* incluídas neste estudo. Além disso, verificou-se que o tempo de divergência do último ancestral comum de *A. robusta* ocorreu no final do Mioceno, porém, a maioria das amostras estudadas se diversificaram a partir de dois milhões de anos.

Agradecimentos: A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão das bolsas de estudos. Ao senhor Iris Raimundo Stanciola e Sabrina Simon pelo apoio nas expedições de campo e auxílio nas coletas. Ao professor Marcos Teixeira pelo auxílio nas coletas e indicação das áreas de ocorrência desta espécie. Ao IBAMA pela autorização das coletas das amostras. Ao General Rodrigo Ratton pela autorização de coleta de amostras na restinga de Marambaia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bacci M, Solomon SE, Mueller UG, Martins VG, Carvalho AOR, Vieira LGE, Silva-Pinhati ACO (2009) Phylogeny of leafcutter ants in the genus *Atta* Fabricius

- (Formicidae: Attini) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 51: 427-437.
- Borgmeier T (1950) Estudos sobre *Atta* (Hym. Formicidae). Memórias do Instituto Osvaldo Cruz 48: 239-263.
- Borgmeier VT (1959) Revision der Gattung *Atta* Fabricius (Hym., Formicidae). *Studia Entomológica* 2:1-4.
- Brandão CRF, Mayhê-Nunes AJ (2001) A new fungus-growing ant genus, *Mycetagroicus* gen, with the description of three new species and comments on the monophyly of the Attini (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology* 38: 639-665.
- Carvalho JB, Almeida EAB (2010) Biogeografia da América do Sul: padrões e processos. Editora Roca. 302p.
- Dáttilo W, Falcão JCF, Teixeira MC (2012) Predictive model of distribution of *Atta robusta* Borgmeier 1939 (Hymenoptera: Formicidae): subsidies for conservation of a Brazilian leaf-cutting ant endangered species. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 1: 01-09
- Della Lucia TMC (1993) As formigas cortadeiras. Editora Folha de Viçosa. 262 p.
- Drummond AJ, Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7: 01-08.
- Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research* 8: 175-185.
- Ewing B, Green P (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research* 8: 186-194.
- Fernandes F (2003) Introducción a las hormigas de la región Neotropical. 424p.

- Gonçalves CR (1942) Contribuição para o conhecimento do gênero *Atta* Fabr., das formigas saúvas. Sociedade Brasileira de Agronomia 5: 333-358.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic tree. Bioinformatics 17: 754-755.
- Lapolla JS, Schultz TR, Kjer KM, Bischoff JF (2006) Phylogenetic position of the ant genus *Acropyga* Roger (Hymenoptera: Formicidae) and the evolution of trophophoresy. Insect Systematics & Evolution 37: 197-212.
- Moreau CS, Bell CD, Vila RS, Archibald B, Pierce NE (2006) Phylogeny of the ants: Diversification in the age of angiosperms. Science 312: 101-104.
- Nylander JAA. (2004) MrModeltest v2. Program distributed by the author. Uppsala University: Evolutionary Biology Center.
- Nunes AJM, Jaffé K (1998) On the biogeography of Attini (Hymenoptera: Formicidae). Ecotropicos 11: 45-54.
- Rambaut A (2009) FigTree v1.3.1. Adquirido em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Sarnat EM, Moreau CS (2011) Biogeography and morphological evolution in a Pacific island ant radiation. Molecular Ecology 20: 114-130.
- Schultz TR, Brady SG (2008) Major evolutionary transitions in ant agriculture. National Academy of Sciences of the USA 105: 5435-5440.
- Solomon SE, Bacci-Jr M, Martins-Jr J, Vinha GG, Mueller UG (2008) Paleodistributions and comparative molecular phylogeography of leafcutter ants (*Atta* spp.) Provide new insight into the origins of Amazonian diversity. PLoS ONE 3: 1-15.
- Souza CRG, Suguio K, Oliveira AMS, Oliveira PE (2005) Quaternário do Brasil. Editora Holos, Ribeirão Preto, São Paulo. 371p.

- 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: 2731–273.
- Teixeira MC, Schoederer JH, Mayhé-Nunes AJ (2003) Geographic Distribution of *Atta robusta* Borgmeier (Hymenoptera: Formicidae). *Neotropical Entomology* 32: 719-721.
- Teixeira MC, Schoederer JH, Louzada JNC (2004) Occurrence of *Atta robusta* Borgmeier (Hymenoptera: Formicidae) in the North of Espírito Santo State, Brazil. *Neotropical Entomology* 33: 265-266.
- Teixeira MC, Santos IA, Schoederer JH (2008) *Atta robusta*: endemismo, extinção ou ausência de estudo? In: Insetos sociais: da biologia à aplicação. In: Santos IA, Vilela EF, Schoederer HH, Lino Neto J, Campos LAO and Serrão JE (eds) *Insetos Sociais: da Biologia à Aplicação*. 1ª edição. Editora UFV, Viçosa, MG, Brasil, pp 359-367.
- Waldschmidt AM, Salomão TMF, Barros EG, Campos LAO (1997) Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). *Brazilian Journal of Genetics* 20: 421-423.

CAPÍTULO III

Morfologia e morfometria das sensilas antenais de *Atta robusta*, Borgmeier 1939 (Hymenoptera: Formicidae)

RESUMO- *Atta robusta*, formiga importante na dinâmica dos ecossistemas de restinga, é uma espécie endêmica e ameaçada de extinção. O objetivo desse trabalho foi descrever e comparar a morfologia das sensilas antenais de duas populações de *A. robusta*, sendo uma delas coletada na localidade de São Mateus no estado do Espírito Santo e a outra em Maricá no estado do Rio de Janeiro. Independentemente de qual das populações avaliadas, diferentes tipos de sensilas antenais, tricóideas retas e curvadas, basicônicas, ampuláceas e celocônicas foram identificadas, sendo as mesmas mais numerosas nos flagelômeros distais. Diferenças no número e no comprimento das sensilas tricóideas retas e curvadas no flagelômeros F8 e F9 foram observadas. As diferenças entre as sensilas antenais dos indivíduos das duas populações avaliadas e a possível plasticidade fenotípica de *A. robusta*, é uma característica importante considerando a adaptação desta espécie a possíveis variações ambientais.

Palavras chaves: Órgãos sensoriais, espécie ameaçada, plasticidade fenotípica.

ABSTRACT - The ant *Atta robusta* plays an important role in ecosystem dynamics of the restinga and is an endemic and endangered species. The objective of this study was to describe and compare the morphology of antennal sensilla from two populations of *A. robusta*, one collected in the city of São Mateus in the Brazilian state Espírito Santo and the other in Maricá in the state of Rio de Janeiro. Regardless of the populations evaluated, different types of antennal sensilla, straight and curved trichodea, basiconica, ampullacea and celosonic were identified, most numerous in the distal flagellomeres. Differences in the number and length of straight and curved sensilla trichodea in flagellomeres F8 and F9 were observed. Differences between the antennal sensilla of individuals from the two populations evaluated and the possible phenotypic plasticity of *A. robusta* is an important feature considering the adaptation of this species to potential environmental variations.

Keywords: Sensory organs, endangered species, phenotypic plasticity.

INTRODUÇÃO

Atta robusta é uma espécie de formiga cortadeira e considerada ecologicamente importante por, entre outras características, dispersar sementes em ecossistema de restinga (Teixeira *et al.* 2008). Esta espécie é endêmica em áreas de restinga dos estados do Rio de Janeiro e do Espírito Santo e é considerada ameaçada de extinção na categoria de vulnerável (Machado 2003).

As formigas, em geral, vivem em uma complexa organização social e suas colônias são formadas por milhões de indivíduos de castas diferentes (Evison & Ratnieks, 2007). Tal organização se deve a comunicação por meio de vários sinais químicos e mecânicos do ambiente bem como daqueles compartilhados entre os membros da colônia (Billen, 2006). Estes sinais são percebidos pelas sensilas, estruturas sensoriais (Kleineidam *et al.* 2000, Ozaki *et al.* 2005), transmitidos ao sistema nervoso central e processados pelo cérebro, que envia uma mensagem de resposta ao estímulo (Chapman 1998).

As sensilas são encontradas em todo o corpo do inseto, mas, principalmente, nas antenas que são as principais estruturas de comunicação. Existem diferentes tipos de sensilas que são classificados de acordo com a sua forma e função sendo as mais comuns as denominadas de tricóideas e basicônicas (Renthal *et al.* 2003, Ozaki *et al.* de 2005, Rocha *et al.* 2007, Spaethe *et al.* 2007, Onagbola *et al.* 2008).

A morfologia e a abundância das sensilas antenais podem variar de acordo com a família (Hashimoto, 1991), subespécies (Stort & Moraes-Alves, 1999), castas (Nakanishi *et al.* 2009) e até mesmo com o estágio de desenvolvimento dos insetos (Silva *et al.* 2010). Além disso, os tipos e tamanhos de sensilas antenais de insetos

podem variar com diferentes regiões geográficas amostradas, como acontece, por exemplo, com as do percevejo *Rhodnius prolixus* (Esteban *et al.* 2005).

A importância ecológica de *A. robusta* é um argumento mais do que justificado para que mais estudos sejam realizados visando ampliar os conhecimentos biológicos sobre esta espécie.

Considerando a ausência de relatos de estudos sobre a morfologia dos órgãos sensoriais de *A. robusta*, a proposta deste estudo foi avaliar a microanatomia dos tipos e a distribuição de sensilas antenais de *A. robusta* amostrada na restinga dos estados do Espírito Santo e do Rio de Janeiro. Além disso, diferenças no número e no comprimento deste órgão sensorial foram também investigadas nesta espécie de formiga ameaçada de extinção.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostragem

Operárias de *A. robusta* foram coletadas em ninhos subterrâneos nas restingas de São Mateus (SM) no estado do Espírito Santo (S 39°74'60" e 18°68'23 W") e nas restingas de Maricá (M) no estado do Rio de Janeiro (S 42°88'92" e 22°94'58 W"). As amostras foram mantidas em álcool absoluto e transferidas para o Laboratório de Biologia Molecular de Insetos do Departamento de Biologia Geral da UFV - Viçosa, MG, Brasil. As amostras coletadas em cada localidade foram consideradas como uma população.

Microscopia eletrônica de varredura

Dez operárias de *A. robusta* de cada população (SM e M) tiveram a antena direita removida para análise de microscopia eletrônica de varredura. As antenas foram lavadas com PBS (tampão de fosfato salino) e desidratadas com acetona em

série crescente (50 a 100%). Em seguida, as antenas foram submetidas à secagem no ponto crítico, montadas em bases de alumínio e metalizadas com a utilização do dispositivo de pulverização catódica. Posteriormente as mesmas foram observadas em microscópio do tipo LEO VP1430 SEM no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa, para a descrição da morfologia e os tipos de sensilas identificados.

Descrição das sensilas

A antena das operárias de *A. robusta* foi caracterizada e o comprimento do segmento escapo, pedicelo e flagelo foram medidos. Em cada população, foram descritas os diferentes tipos de sensilas identificados nos três últimos flagelômeros (F7, F8 e F9) das antenas de cada operária analisada. Optou-se por analisar estes três últimos flagelômeros, primeiro, por constituírem a parte da antena que a formiga usa para tatear o ambiente e, segundo, por ter sido observado que, neste caso, as sensilas estavam concentradas nesta região das antenas.

Análise estatística

A contagem das sensilas nas duas populações foi realizada em três áreas (14.870 mM² / flagelômero) de cada um dos flagelômeros F7, F8 e F9 utilizando o programa Adobe Photoshop CS e o número médio das sensilas dessas áreas foi submetido à análise estatística. Foram analisadas estatisticamente apenas as sensilas tricóideas, porque, é um tipo de sensila encontrada em todos os flagelômeros.

Um total de 20 sensilas de cada um dos flagelômeros F7, F8 e F9 foram medidos utilizando o programa Image-Pro Plus (Media Cybernetics). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com 5% de probabilidade utilizando o programa SAEG.

RESULTADOS

A antena das operárias de *A. robusta* mostrou-se geniculada e formada por três segmentos básicos: escapo, pedicelo e flagelo, com comprimentos médios de 3,13 milímetros, 0,45 milímetros e 3,74 milímetros, respectivamente. No flagelo foram identificados nove flagelômeros (F1 a F9), com comprimento médio de 0,38 milímetro, com exceção do último, que apresentou média de 0,67 milímetro (Figura 1A). Observou-se, também, que a concentração de sensilas aumentou da parte basal para a extremidade da antena, com maior número e tipos diferentes de sensilas nos flagelômeros distais. O formato da antena e os tipos de sensilas encontradas foram os mesmos nas 2 populações estudadas.

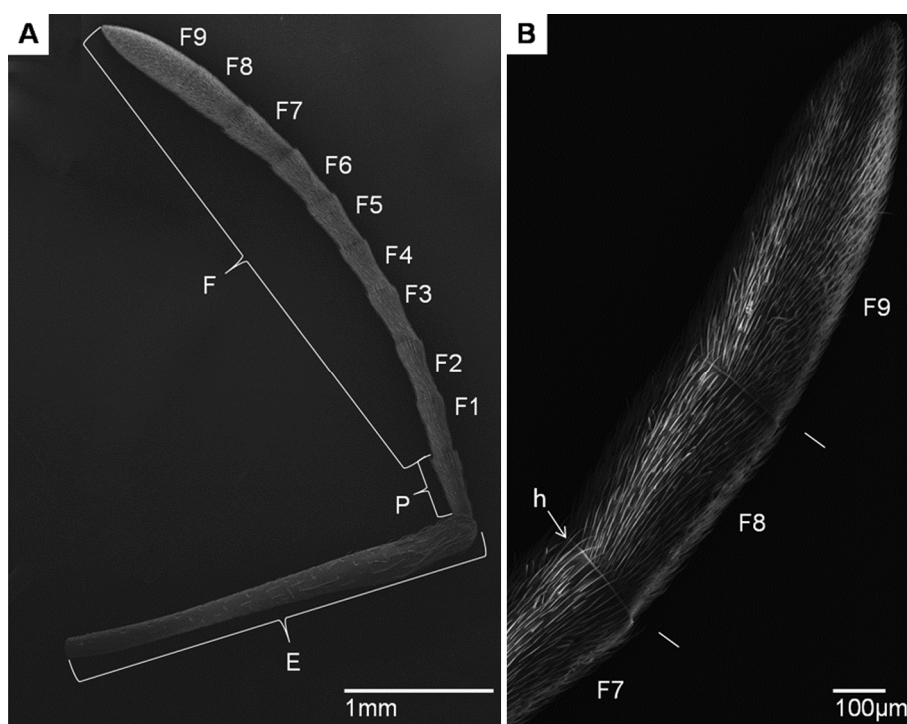


Figura 1- Microscopia eletrônica de varredura de antena de *A. robusta*. A: visão geral da superfície dorsal. Escapo (E), pedicelo (P) e flagelo (F). B: visão detalhada dos três últimos flagelômeros (F7, F8 e F9) cobertos por sensilas antenais (h).

Com a observação detalhada das superfícies dorsais de antenas das operárias de *A. robusta* das populações de São Mateus (SM) e de Maricá (M) foram identificados vários tipos de sensilas como, 1: tricóideas: caracterizada pela

extremidade fina, com dois subtipos, 1.1: tricóideas retas, as mais comuns, ligeiramente curva e mais abundante no flagelômero F9 e 1.2: tricóideas curvadas, que são longas, de extremidade curva e também encontrada em abundância no F9 (Figura 1B e 2); 2: basicônicas: são sensilas digitiformes (finger-like), com base larga e extremidade cônica sendo mais grossa e menos comum que as tricóideas; 3: ampuláceas: são encontradas em uma abertura central de depressão elíptica com bordas proeminentes na superfície da antena e 4: celocônica: são pequenas aberturas redondas e com bordas menos proeminentes, em comparação com as ampuláceas. As sensilas ampuláceas e celocônicas são encontradas exclusivamente no final do flagelômero F9 (Figura 2).

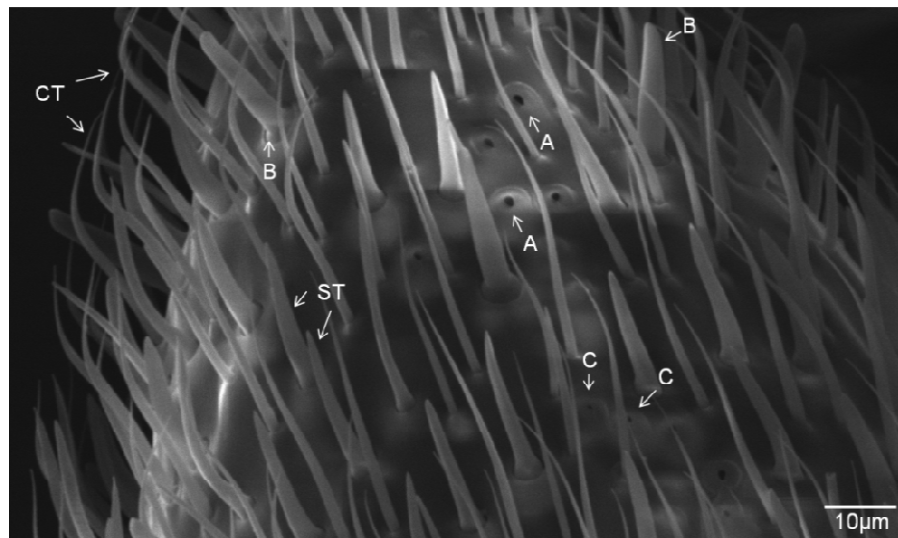


Figura 2: Microscopia eletrônica de varredura mostrando detalhes do último flagelômero da antena de *A. robusta* e diferentes tipos de sensilas. Tricóideas curvas (CT) e retas (ST), basicônicas (B), ampuláceas (A) e celocônicas (C).

O número médio de sensilas tricóideas por área ($14.870 \text{ mM}^2 / \text{flagelômero}$) foi de $3,2 \pm 0,32$ no flagelômero F7; $9,1 \pm 0,35$ no F8 e de $19,1 \pm 1,32$ no F9 da antena dos indivíduos da população SM. Na antena dos indivíduos da população M

os valores foram de $2,5 \pm 0,24$ no F7; $8,5 \pm 0,41$ no F8 e de $15,7 \pm 0,64$ no F9. Quando as duas populações foram comparadas, o número de sensila tricóideia é diferente apenas no flagelômero F9 ($F = 0,0335$, $P < 0,05$) (Figura 3A).

Os comprimentos médios de sensilas tricóideia reta foram de $27,1 \pm 0,3$ μm no flagelômero F7; $26,7 \pm 0,26$ μm no F8 e de $25,4 \pm 0,33$ μm no F9 das antenas dos indivíduos da população SM. Nas antenas dos indivíduos da população M os valores foram de $26,6 \pm 0,24$ μm no F7; $26,6 \pm 0,28$ μm no F8 e de $25,5 \pm 0,4$ μm no F9. Os comprimentos das sensilas do F7 e F9 não diferem entre as duas populações (dados não mostrados).

Os números médios de sensilas tricóideia curva por área ($14.870 \text{ mM}^2/\text{flagelômero}$) foram de $56,0 \pm 1,90$ no F7; $50,8 \pm 1,71$ no F8 e de $70,2 \pm 3,35$ no F9 da antena dos indivíduos da população SM. Nas antenas dos indivíduos da população M os valores foram de $59,8 \pm 1,73$ no F7; $57,7 \pm 1,45$ no F8 e de $70,5 \pm 2,39$ no F9. Ao comparar as duas populações observou-se que os números dessas sensilas são diferentes apenas no F8 ($F = 0,00644$, $P < 0,05$) (Figura 3B).

Os comprimentos médios de sensilas tricóide curvada foram de $64,3 \pm 1,25$ μm no F7; $61,5 \pm 1,22$ μm no F8 e de $47,5 \pm 0,93$ μm no F9 das antenas dos indivíduos da população SM. Nas antenas dos indivíduos da população M os valores foram de $62,6 \pm 1,05$ μm no F7; $58,5 \pm 0,96$ μm no F8 e de $44,3 \pm 0,82$ μm no F9. Comparando os flagelômeros entre as duas populações verificou-se que os comprimentos destas sensilas são diferentes apenas no F9 ($F = 0,02148$, $P < 0,05$) (Figura 3C).

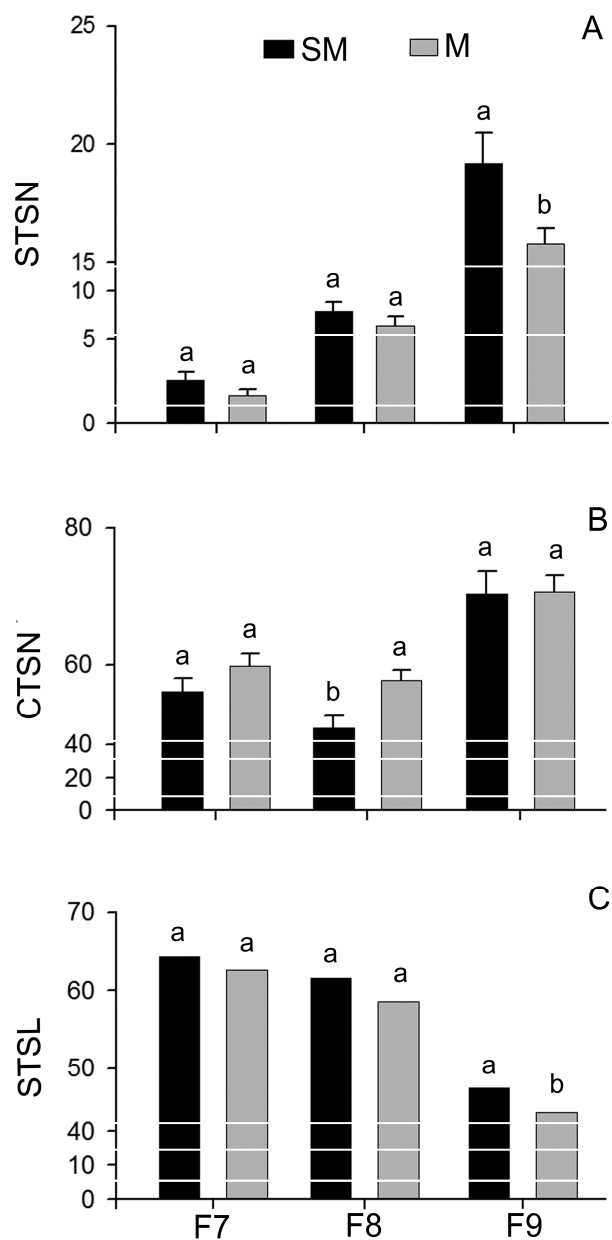


Figura 3: Número de sensilas antenais em uma área de 14.870 mM^2 / flagelômero e comprimento das sensilas nos flagelômeros F7, F8 e F9 de *A. robusta*. A: número de sensilas tricóideas retas (STSN). B: número de sensilas tricóideas curvas (CTS) e C: comprimento das sensilas tricóideas retas (STSL). SM e M: siglas correspondentes às localidades de São Mateus e Maricá respectivamente. Colunas com a mesma letra não diferem estatisticamente pela ANOVA a 5%.

DISCUSSÃO

O formato da antena, e a diversidade de sensilas antenais descritas nos três últimos flagelômeros de *A. robusta* tricóideas curvas e retas, ampuláceas, basicônicas e celocônicas, é comumente relatada para outras espécies de formigas (Kleineidam *et al.* 2000, Ruchty *et al.* 2009, Nakanishi *et al.* 2009, Siddiqui *et al.* 2010). Além destas, outros tipos de sensilas como campaniformes, placóides caeticas, são descritas para outros himenópteros (Hashimoto 1990, Renthall *et al.* 2003, Marques-Silva *et al.* 2006), no entanto, as mesmas não foram detectadas nas antenas de *A. robusta*.

As sensilas tricóideas curvas e retas, a mais abundante na antena de *A. robusta*, podem estar relacionadas com a função de mecanorecepção, uma função atribuída por Baaren *et al.* (2007) a este tipo de sensila. As sensilas basicônicas, foram menos abundante e mais frequentemente detectadas em F9 da antena de *A. robusta*, o que está de acordo com Nakanishi *et al.* (2009) ao relatar que em *Camponotus japonicus* (Formicidae) as sensilas basicônicas representam apenas cerca de 2% das sensilas totais e são encontradas mais frequentemente nos flagelômero distais da antena desta formiga. É possível que as sensilas ampuláceas encontradas somente no final do flagelômero (F9) podem ter, em *A. robusta*, a mesma função relatada por Kleineidam *et al.* (2000) para *Atta sexdens* de detecção da concentração de CO₂ dentro dos ninhos. As sensilas celocônicas, também, encontradas apenas em F9, podem estar associadas à termopercepção, como sugerido para este tipo de sensila de antena de *A. vollenweideri* (Ruchty *et al.* 2009).

A distribuição desigual de sensilas ao longo da antena de *A. robusta*, com maior concentração nos últimos flagelômeros, também foi observada em

Camponotus japonicus (Nakanishi *et al.* 2009). A maior concentração de sensilas nos flagelômeros distais, como observado em *A. robusta*, pode estar relacionada ao comportamento de tatearem o ambiente com a ponta das antenas como fazem as antenas em geral. Renthal *et al.* (2003) relata que a sensila basicônica localiza-se no lado da antena que é usado pelas formigas para tocar superfícies, sugerindo para estas sensilas a função de quimiorreceptores de contato.

As populações de *A. robusta* avaliadas neste estudo diferem em termos de número e comprimento dos órgãos sensoriais analisados. Yang *et al.* (2004) relataram que a formiga *Pheidole morrissi* apresenta plasticidade fenotípica quando suas populações estão associadas a diferentes condições ambientais. Assim, é possível que estas diferenças no número e no comprimento dos órgãos sensoriais analisados em *A. robusta* sejam resultados de adaptações dessa formiga a diferentes condições ambientais.

Em outros grupos de insetos como em Triatominae a variação no comprimento e número de sensilas em populações sob diferentes condições ambientais foi relatada (Esteban *et al.* 2005). Segundo estes autores, estas diferenças sugerem que as populações *Rhodnius prolixus* avaliadas foram isoladas geograficamente possuindo cada população um padrão diferenciado quanto ao número e comprimento de sensilas.

Segundo Catalá *et al.* (2004), diferenças morfológicas nas estruturas sensoriais podem ser resultados das adaptações para as necessidades sensoriais de acordo com diferentes condições ambientais. Além disso, diferenças morfológicas entre populações são, supostamente, relacionadas com plasticidade fenotípica, uma vez que os organismos geneticamente semelhantes podem ter diferentes fenótipos de acordo com as variáveis ambientais (Carreira *et al.* 2006, Marteleto *et al.* 2009).

Desta forma, as variações encontradas no número e no comprimento de sensilas antenais de *A. robusta* pode ser resultado de respostas do organismo às exigências para adaptações ambientais.

A variação no número e a plasticidade fenotípica dos órgãos sensoriais podem, de fato, estarem contribuindo para a adaptação das populações de *A. robusta* avaliadas, a possíveis variações ambientais, pois as sensilas antenais são importantes órgãos sensoriais de comunicação dos insetos e estão em contato constante com o meio ambiente.

Agradecimentos: A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão das bolsas de estudos. Ao senhor Iris Raimundo Stanciola e Sabrina Simon pelo apoio nas expedições de campo e auxílio nas coletas. Ao professor Marcos Teixeira pelo auxílio nas coletas e indicação das áreas de ocorrência desta espécie. Ao IBAMA pela autorização das coletas das amostras. Ao núcleo de microscopia da Universidade Federal de Viçosa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baaren J, Boivin G, Bourdais D, Roux O (2007) Antennal sensilla of hymenopteran parasitic wasps: variations linked to host exploitation behavior. *Modern Research and Educational Topics in Microscopy* 1: 345-352.
- Billen J (2006) Signal variety and communication in social insects. *Proceedings of the Netherlands Entomological Society Meeting* 17: 9-25.
- Carreira VP, Soto IM, Hasson E, Fanara JJ (2006) Patterns of variation in wing morphology in the cactophilic *Drosophila buzzatii* and its sibling *D. koepferae*. *European Society For Evolutionary Biology* 19: 1275-1282.
- Catalá SS, Maida DM, Caro-Riaño H, Jaramillo N, Moreno J (2004) Changes associated with laboratory rearing in antennal sensilla patterns of *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, and *Rhodnius pallescens* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 99: 25-30.
- Chapman RF (1998) *The insects: structure and function*. Cambridge University Press. 770p.
- Esteban L, Angulo VM, Feliciangeli MD, Catalá S (2005) Analysis of antenal sensilla patterns of *Rhodnius prolixus* from Colombia and Venezuela. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 100: 909-914.
- Evison SF, Ratnieks FW (2007) New role for majors in *Atta* leafcutter ants. *Ecological Entomology* 32: 451-454.
- Hashimoto Y (1990) Unique features of sensilla on the antennae of Formicidae (Hymenoptera). *Applied Entomology and Zoology* 25: 491-501.
- Hashimoto Y (1991) Phylogenetic study of the family Formicidae based on the sensillum structures on the antennae and labial palpi (Hymenoptera, Aculeata). *Japanese Journal of Entomology* 59: 125-140.

- Kleineidam C, Romani R, Tautz J, Isidoro N (2000) Ultrastructure and physiology of the CO₂ sensillum ampullaceum in the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. *Arthropod Structure & Development* 29: 43-55.
- Marques-Silva S, Matiello-Guss CP, Delabie JHC, Mariano CSF, Zanuncio JC, Serrão JE (2006) Sensilla and secretory glands in the antennae of a primitive ant: *Dinoponera lucida* (Formicidae: Ponerinae). *Microscopy Research and Technique* 69:885-890.
- Marteleteo PB, Lomônaco C, Kerr W (2009) Respostas fisiológicas, morfológicas e comportamentais de *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) (Coleoptera: Bruchidae) Associadas ao consumo de diferentes variedades de feijão (*Phaseolus vulgaris*). *Neotropical Entomology* 38:178-185.
- Nakanishi A, Nishino H, Watanabe H, Yokohari F, Nisshikawa M (2009) Sex-specific antennal sensory system in the ant *Camponotus japonicus*: structure and distribution of sensilla on the flagellum. *Cell and Tissue Research* 338: 79-97.
- Onagbola EO, Meyer WL, Boina DR, Stelinski LL (2008) Morphological characterization of the antennal sensilla of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), with reference to their probable functions. *Micron* 39: 1184-1191.
- Ozaki M, Wada-Katsumata A, Fujikawa K, Iwasaki M, Yokohari F, Satoji Y, Nisimura T, Yamaoka R (2005) Ant nestmate and non-nestmate discrimination by a chemosensory sensillum. *Science* 309: 311-313.
- Renthal R, Velasquez D, Olmos D, Hampton J, Wergin WP (2003) Structure and distribution of antennal sensilla of the red imported fire ant. *Micron* 34: 405–413.

- Rocha L, Moreira GRP, Redaelli LR (2007) Systematics morphology and distribution of antennal sensilla of *Gryon gallardoi* (Brethes) (Hymenoptera: Scelionidae) females. *Neotropical Entomology* 36: 721-728.
- Ruchty M, Romani R, Kuebler LS, Ruschioni S, Roces F, Isidoro N, Kleineidam CJ (2009) The thermo-sensitive sensilla coeloconica of leaf-cutting ants (*Atta vollenweideri*). *Arthropod Structure & Development* 38: 195-205.
- Siddiqui MI, Mashaly AMA, Ahmed AM, Al-Mekhlafi FA, Al-Khalifa MS (2010) Ultrastructure of antennal sensillae of the samsun ant, *Pachycondyla sennaarensis* (Hymenoptera:Formicidae). *African Journal of Biotechnology* 9: 6956-6962.
- Silva CCA, Capdeville G, Moraes MCB, Falcão R, Solino LF, Laumann RA, Silva JP, Borges M (2010) Morphology, distribution and abundance of antennal sensilla in three stink bug species (Hemiptera: Pentatomidae). *Micron* 41: 289-300.
- Spaethe J, Brockmann A, Halbig C, Tautz J (2007) Size determines antennal sensitivity and behavioral threshold to odors in bumblebee workers. *Naturwissenschaften* 97: 733-739.
- Stort AC, Moraes-Alves MMB (1999) Differences in the number of antennal sensory structures of *males* of three honey bee types. *Revista Brasileira de Biologia* 59: 161-166.
- Teixeira MC, Santos IA, Schoederer JH (2008) *Atta robusta*: endemismo, extinção ou ausência de estudo? In: Insetos sociais: da biologia à aplicação. In: Santos IA, Vilela EF, Schoederer HH, Lino Neto J, Campos LAO and Serrão JE (eds) *Insetos Sociais: da Biologia à Aplicação*. 1ª edição. Editora UFV, Viçosa, MG, Brasil, pp 359-367.

Yang AS, Martin CH, Nijhout F (2004) Geographic variation of caste structure among ant populations. *Current Biology* 14: 514-519.

CONCLUSÕES GERAIS

- O mtDNA (COI-COII) de *A. robusta* apresenta uma alta concentração de bases (A + T), principalmente na região intergênica.
- A população de *A. robusta* estudada apresenta baixa variabilidade genética e alta estruturação populacional.
- *Atta robusta* apresenta um padrão filogeográfico típico de espécies que sofreram gargalo populacional e tiveram posterior expansão.
- *Atta robusta* é uma espécie monofilética e derivada em relação às outras espécies do gênero.
- O ancestral comum mais recente de *A. robusta* surgiu por volta de 7,8 milhões de anos.
- *Atta robusta* apresenta variabilidade fenotípica nas sensilas antenais das duas populações estudadas.

ANEXO

Tabela 1: Número, espécies, localidade de coleta, e acesso de indivíduos no Genbank dos quais foram utilizadas sequências do gene mitocondrial (COI-IGS-tRNA^{Leu}-COII) e gene nuclear (EF1 α) para a filogenia e estimativa do ancestral comum mais recente

| N | Espécies | Acesso Genbank | | |
|----|---------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|----------|
| | | Localidade coletada | COI-IGS-tRNA ^{Leu} -COII | EF1/F1 |
| 1 | 02_08 <i>Atta robusta</i> | Aracruz | - | - |
| 2 | 03_07 <i>Atta robusta</i> | São Mateus | - | - |
| 3 | 04_04 <i>Atta robusta</i> | Itapemirim | - | - |
| 4 | 05_01 <i>Atta robusta</i> | Rio das Ostras | - | - |
| 5 | 07_02 <i>Atta robusta</i> | Araruama | - | - |
| 6 | 09_08 <i>Atta robusta</i> | Linhares | - | - |
| 7 | 10_01 <i>Atta robusta</i> | Marataízes | - | - |
| 8 | 11_07 <i>Atta robusta</i> | Presidente Kennedy | - | - |
| 9 | 12_03 <i>Atta robusta</i> | São Francisco de Itabapoana | - | - |
| 10 | 13_05 <i>Atta robusta</i> | São João da Barra | - | - |
| 11 | 14_01 <i>Atta robusta</i> | Campos de Goytacazes | - | - |
| 12 | 15_01 <i>Atta robusta</i> | Quissamã | - | - |
| 12 | <i>Atta sexdens piriventris</i> | - | FJ599547 | FJ599514 |
| 13 | <i>Atta sexdens piriventris</i> | - | FJ599548 | FJ599515 |
| 14 | <i>Atta sexdens rubropilosa</i> | - | FJ599552 | FJ599516 |
| 15 | <i>Atta sexdens rubropilosa</i> | - | FJ599553 | FJ599517 |
| 16 | <i>Atta sexdens sexdens</i> | - | FJ599554 | FJ599532 |
| 17 | <i>Atta sexdens sexdens</i> | - | FJ599555 | FJ599533 |
| 18 | <i>Atta opaciceps</i> | - | FJ599557 | FJ599537 |
| 19 | <i>Atta robusta</i> | - | FJ599560 | FJ599518 |
| 20 | <i>Atta capiguara</i> | - | FJ599560 | FJ599519 |
| 21 | <i>Atta capiguara</i> | - | FJ599562 | FJ599520 |
| 22 | <i>Atta laevigata</i> | - | FJ599565 | FJ599528 |
| 23 | <i>Atta laevigata</i> | - | FJ599566 | FJ599529 |
| 24 | <i>Atta laevigata</i> | - | FJ599568 | FJ599522 |
| 25 | <i>Atta vollenweideri</i> | - | FJ599569 | FJ599524 |
| 26 | <i>Atta bisphaerica</i> | - | FJ599570 | FJ599525 |
| 27 | <i>Atta bisphaerica</i> | - | FJ599571 | FJ599526 |
| 28 | <i>Atta laevigata</i> | - | FJ599572 | FJ599527 |
| 29 | <i>Atta columbica</i> | - | FJ599573 | FJ599538 |
| 30 | <i>Atta texana</i> | - | FJ599575 | FJ599539 |
| 31 | <i>Atta insularis</i> | - | FJ599583 | FJ599531 |
| 32 | <i>Atta mexicana</i> | - | FJ599584 | FJ599541 |
| 33 | <i>Acromyrmex octospinosus</i> | - | FJ599587 | FJ599544 |
| 34 | <i>Acromyrmex octospinosus</i> | - | FJ599588 | FJ599545 |

Tabela 2. Composição de nucleotídeos das sequências 5`-3` de COI, IGS, tRNA^{Leu} e COII de *Atta robusta*, *Atta sexdens* e *Atta bisphaerica*.

| Gene | % A | % C | % G | % T | % A +T |
|-------------------------|------|------|-----|------|--------|
| <i>Atta robusta</i> | | | | | |
| COI | 35,9 | 19,3 | 6,8 | 38,0 | 73,9 |
| IGS | 33,5 | 13,8 | 0,6 | 52,1 | 85,6 |
| tRNA ^{Leu} | 44,0 | 9,3 | 9,3 | 37,3 | 81,3 |
| COII | 33,2 | 17,3 | 5,8 | 43,8 | 77,0 |
| COI-COII | 35,2 | 15,7 | 5,0 | 44,0 | 79,2 |
| <i>Atta sexdens</i> | | | | | |
| COI | 33,7 | 20,3 | 6,7 | 39,3 | 73,0 |
| IGS | 33,5 | 15,8 | 0,7 | 50,0 | 83,5 |
| tRNA ^{Leu} | 44,3 | 8,9 | 8,9 | 38,0 | 82,3 |
| COII | 33,6 | 18,6 | 5,8 | 42,0 | 75,6 |
| COI-COII | 36,3 | 15,9 | 5,5 | 42,3 | 78,6 |
| <i>Atta bisphaerica</i> | | | | | |
| COI | 33,9 | 21,2 | 7,6 | 37,3 | 71,2 |
| IGS | 32,9 | 10,8 | 0,0 | 56,3 | 89,2 |
| tRNA ^{Leu} | 45,5 | 9,1 | 9,1 | 36,4 | 81,9 |
| COII | 33,2 | 16,4 | 5,8 | 44,7 | 77,9 |
| COI-COII | 37,2 | 14,4 | 5,6 | 43,7 | 80,1 |