

EVELYZE PINHEIRO DOS REIS

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Atta robusta* BORGMEIER
(HYMENOPTERA: FORMICIDAE) COM O USO DE
MARCADORES MICROSSATÉLITES**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011

EVELYZE PINHEIRO DOS REIS

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Atta robusta* BORGMEIER
(HYMENOPTERA: FORMICIDAE) COM O USO DE
MARCADORES MICROSSATÉLITES**

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

Aprovada: 22 de fevereiro de 2011.

Prof^a Denilce Menezes Lopes

Prof^a. Tânia Maria Fernandes Salomão
(Co-orientadora)

Prof^a Mara Garcia Tavares

“Grandes realizações não são feitas por impulso, mas por uma soma de pequenas realizações.”

Vincent Van Gogh

Aos meus queridos pais e irmãos.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus por estar presente em minha vida, guiando-me sempre em minhas ações.

Aos meus pais e irmãos, minha fortaleza, por todo o carinho e incentivo para que eu continuasse os estudos e serem grandes exemplos de luta e perseverança. Obrigada por toda confiança e conforto que suas palavras me transmitem desde o dia em que me mudei para Viçosa.

Aos meus avós e outros familiares por sempre estarem presentes em minha vida e me incentivarem a seguir meus ideais.

Aos amigos que conheci em Viçosa pelos momentos de descontração, risadas e companheirismo. Vocês foram essenciais durante todos esses anos.

Aos amigos do Laboratório pelo companheirismo e apoio durante a realização deste trabalho.

À Denise, Sabrina e ao Íris que foram ao campo coletar as formigas e possibilitaram a realização deste trabalho.

Às amigas de república pelas inúmeras conversas jogadas fora e momentos de descontração.

Ao Prof. Leonardo por me ajudar com as análises estatísticas no programa GENES.

Ao técnico Manuel do Laboratório de Formigas Cortadeiras que coletou e disponibilizou indivíduos de outras espécies de formigas cortadeiras para serem utilizadas neste trabalho.

À equipe do Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular do Instituto de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Minas Gerais que realizou a genotipagem dos produtos de PCR gerados com os *primers* microssatélites.

À Prof^ª. Mara pela orientação, apoio e sugestões durante a realização deste trabalho. Seus ensinamentos foram essenciais na minha formação durante esses anos.

À Prof^a. Tânia e Prof. Lucio pela co-orientação e sugestões durante a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento pela oportunidade de realizar o Mestrado.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos e à FAPEMIG pelo financiamento do projeto.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. Introdução Geral	1
1.1 Formigas cortadeiras e <i>Atta robusta</i>	1
1.2 Variabilidade genética em formigas.....	3
2. Referências Bibliográficas	9
Capítulo 1	13
1. Introdução	13
2. Material e Métodos	14
3. Resultados	18
4. Referências Bibliográficas	22
Capítulo 2	25
1. Introdução	25
2. Material e Métodos	27
3. Resultados	32
4. Discussão	39
5. Referências Bibliográficas	42
Conclusões Gerais	45
ANEXO I	46
ANEXO II	48

RESUMO

REIS, Evelyze Pinheiro dos, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. **Variabilidade genética de *Atta robusta* Borgmeier (Hymenoptera: Formicidae) com o uso de marcadores microssatélites.** Orientadora: Mara Garcia Tavares. Co-orientadores: Lucio Antonio de Oliveira Campos e Tânia Maria Fernandes Salomão.

Este é o primeiro estudo genético realizado com *Atta robusta* e investigou a variabilidade genética e o nível de estruturação nas populações do Espírito Santo e Rio de Janeiro com o uso de *primers* microssatélites espécie-específicos. Assim, vinte *primers* microssatélites específicos para *A. robusta* foram desenhados, sendo que onze (55%) foram polimórficos. Ao se analisar 80 colônias de *A. robusta*, o número de alelos/loco variou de 7 a 24. A heterozigosidade observada variou de 0,27 a 0,80 nos locos analisados, enquanto a esperada variou de 0,30 a 0,83. Agrupando-se as colônias em duas populações (Espírito Santo e Rio de Janeiro), verificou-se que elas são geneticamente similares. Na população do Espírito Santo, o número de alelos/loco variou de 6 a 22. A heterozigosidade observada variou de 0,22 a 0,70 nos locos analisados, enquanto a esperada variou de 0,30 a 0,85. Na população do Rio de Janeiro, o número de alelos/loco variou de 4 a 17. A heterozigosidade observada variou de 0,32 a 0,97 nos locos analisados, enquanto a esperada variou de 0,29 a 0,81. Por outro lado, considerando-se as colônias amostradas em cada uma das 16 localidades amostradas, como uma subpopulação, verificou-se que elas estão altamente estruturadas. Apesar disto, a análise de agrupamento não evidenciou a formação de clados contendo apenas colônias de localidades geograficamente próximas. Por outro lado, quando se considerou as 80 colônias amostradas, não se verificou estruturação e nem agrupamento de colônias de acordo com a localidade de origem das mesmas. Em conclusão, os resultados obtidos indicam que as colônias amostradas, tanto no Rio de Janeiro como no Espírito Santo, apresentam alta variabilidade genética e que as mesmas não estão estruturadas.

Entretanto, considerando-se o endemismo e a ameaça à extinção de *A. robusta*, para conservá-la será necessário a manutenção do maior número possível de colônias nas regiões de restinga destes dois Estados.

ABSTRACT

REIS, Evelyze Pinheiro dos, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2011. **Genetic variability on *Atta robusta* Borgmeier (Hymenoptera: Formicidae) using microsatellite primers.** Adviser: Mara Garcia Tavares. Co-Advisers: Lucio Antonio de Oliveira Campos and Tânia Maria Fernandes Salomão.

This is the first genetic study on *Atta robusta* to investigate the genetic variability and structure in populations from Espírito Santo and Rio de Janeiro in which microsatellites specific primers were used. Twenty microsatellite primers for *A. robusta* were designed and eleven (55%) were polymorphic. When analyzing 80 colonies of *A. robusta*, the number of alleles/locus ranged from 7 to 24. The observed heterozygosity ranged from 0,27 a 0,80 in the loci analyzed, meanwhile the expected heterozygosity ranged from 0,30 to 0,83. When grouping the colonies within the two targeted populations (Espírito Santo and Rio de Janeiro), it was confirmed that they are genetically similar. In the population from Espírito Santo, the number of alleles/locus ranged from 6 to 22. The observed heterozygosity ranged from 0,22 to 0,70, while the expected heterozygosity ranged from 0,30 to 0,85. In the population from Rio de Janeiro, the number of alleles/locus ranged from 4 to 17. The observed heterozygosity ranged from 0,32 to 0,97, while the expected ranged from 0,29 to 0,81. However, when considering the colonies sampled in each of the 16 localities as a subpopulation, it was confirmed that they are highly structured. However, the UPGMA analysis did not provide accurate evidence that the formation of clades containing only colonies are geographically nearby. When considering the 80 colonies sampled, they weren't structured and did not group colonies geographically adjacent. These results indicate that the colonies of *A. robusta* sampled either in Rio de Janeiro or Espírito Santo have high genetic variability and that they aren't structured. Although, considering the endemism and the threaten to extinction of *A. robusta*, in order to conserve this species will be necessary the maintenance of all possible colonies in the Restinga's region.

1. Introdução Geral

1.1 Formigas cortadeiras e *Atta robusta*

As formigas (Hymenoptera: Formicidae) apresentam cuidado cooperativo com a prole, divisão de trabalho (reprodutores e operárias) e sobreposição de gerações na colônia e são, por isso, conhecidas como insetos eussociais. A rainha tem a função de produzir a população de operárias, machos e outras rainhas, enquanto que os machos participam somente da reprodução, morrendo logo após o vôo nupcial. As operárias, por sua vez, cuidam da cria e participam da defesa, forrageamento e limpeza do ninho (Currie, 2001).

As formigas cortadeiras (Tribo Attini) são consideradas os herbívoros dominantes na região Neotropical, consumindo mais vegetação do que qualquer outro grupo de animal (Holldobler & Wilson, 1990). Essas formigas coletam folhas frescas, flores, frutos e caules de plantas para servir como substrato para o fungo cultivado em seu ninho, com o qual mantêm uma relação de simbiose mutualística (Holldobler & Wilson, 1990; Fowler, 1995; Currie, 2001). As formigas cultivam o fungo, fornecendo condições para seu crescimento (Currie, 2001). Por sua vez, o fungo digere a celulose e outros produtos vegetais normalmente inacessíveis às formigas cortadeiras e compartilha parte de seu produto metabólico com elas (Holldobler & Wilson, 1990).

As formigas cortadeiras do gênero *Atta* e *Acromyrmex* predam a maioria dos tipos vegetais e são, por isso, consideradas pragas agrícolas, podendo causar grandes prejuízos econômicos. Existem 15 espécies conhecidas de *Atta* e 24 de *Acromyrmex*. Apesar dos prejuízos causados, essas formigas possuem um importante papel no ecossistema, uma vez que estimulam o crescimento de novas plantas, quebram materiais vegetais rapidamente e enriquecem o solo (Holldobler & Wilson, 1990).

As colônias de formigas do gênero *Atta* podem ter milhões de operárias, as quais apresentam um alto polimorfismo morfológico (Weber,

1966). A maioria das operárias possui ovários rudimentares que nunca produzem óvulos, mas poucas (operárias pequenas e médias, que acompanham a rainha) ovipositam ovos tróficos para consumo da rainha (Dijkstra et al., 2005).

Estudos a respeito da biologia das formigas deste gênero têm sido realizados mais por causa de sua importância econômica do que pelo seu papel ecológico. Entretanto, espécies que não invadem ecossistemas agrícolas como *Atta robusta* têm sido ignoradas nas pesquisas desenvolvidas (Teixeira et al., 2003) e até o momento não há estudos genéticos com esta espécie.

A. robusta habita somente ambientes de restinga, sendo encontrada do Norte do estado do Espírito Santo até o sul do Rio de Janeiro (Gonçalves, 1960; Teixeira et al., 2003; Teixeira et al., 2004).

Não há registros desta espécie nas restingas ao sul do país e nem nas da Bahia. Provavelmente a Serra do Mar, ao sul do estado do Rio de Janeiro, funcione como uma barreira impedindo a dispersão de fêmeas aladas da espécie para as restingas que ocorrem no sul. Por outro lado, não existe nenhuma barreira física evidente impedindo a dispersão da espécie em direção à Bahia, apesar de não existir registros da espécie nos estudos de levantamento de espécies de formigas neste Estado, incluindo a vegetação de restinga (Teixeira et al., 2003).

A região de restinga é caracterizada por apresentar solo arenoso, planta herbácea e estar localizada a beira-mar. Por causa da ação antrópica, esse ambiente passa por um rápido processo de desmatamento (Holldobler & Wilson, 1990), o que gera a freqüente destruição deste habitat e insere *A. robusta* na Lista da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (Machado et al., 2005).

Em vista à fragmentação dos ambientes de restinga, ao endemismo de *A. robusta* e à ameaça de extinção, um estudo para investigar a variabilidade genética desta espécie é uma importante ferramenta para sua conservação.

Vários estudos de genética de populações e genética da conservação têm utilizado os marcadores microssatélites (Litt & Luty, 1989) para investigar a variabilidade genética de populações (Oliveira et al., 2006; Fakrudin et al., 2006).

A utilidade desses marcadores nestes estudos é devido ao fato deles serem codominantes, altamente reproduzíveis, bem dispersos no genoma (em regiões codificadora e não codificadoras), multialélicos e os locos serem frequentemente conservados entre espécies relacionadas (Oliveira et al., 2006; Fakrudin et al., 2006).

Em formigas, a alta variabilidade genética entre operárias está relacionada ao aumento da resistência da colônia a doenças (Hughes & Boomsma, 2004). Já a baixa variabilidade pode reduzir a habilidade em lidar com mudanças ambientais o que faz com que a expectativa de vida da espécie seja menor (Frankham, 1995).

Os principais fatores que implicam na extinção de uma espécie são a destruição do ambiente, espécies introduzidas e a diversidade no ecossistema, os quais reduzem as espécies a tamanhos populacionais que estão sujeitos a efeitos estocásticos tanto ambientais, catastróficos, demográficos ou genéticos (depressão endogâmica, perda da variação genética e acúmulo de mutações deletérias) (Frankham, 1995).

1.2 Variabilidade genética em formigas

O sexo na ordem Hymenoptera é determinado pelo sistema haplodiplóide: os machos se desenvolvem a partir de ovos não fecundados (partenogênese arrenótoca), sendo, portanto, haplóides, enquanto as fêmeas (diplóides) se originam de ovos fecundados. Adicionalmente, a determinação sexual em Hymenoptera depende da composição alélica no loco sexual (*single locus complementary sex determination* ou sl-CSD). Indivíduos haplóides (hemizigotos) ou diplóides homozigotos para o loco sexual são machos, enquanto indivíduos heterozigotos são fêmeas (Wilgenburg et al., 2006).

Os machos diplóides são frequentemente inférteis ou menos viáveis e, assim, eles se tornam uma carga genética nas populações (Wilgenburg et al., 2006). Um estudo realizado por Krieger et al (1999) identificou a origem de fêmeas triplóides infertéis em *Solenopsis invicta* em populações poligínicas que produziam machos diplóides. A maioria dos machos nessas populações era estéril, entretanto uma pequena parte possuía os tratos reprodutivos funcionais e produziam espermatozóides diploides que fecundavam ovúlos produzindo fêmeas triploides infertéis.

A variabilidade genética em insetos sociais é fortemente influenciada pelo número de rainhas presentes na colônia, pelo número de acasalamentos da rainha e também pela recombinação genética, a qual é maior nos Hymenoptera altamente sociais do que nos outros animais superiores e pode aumentar a diversidade genotípica entre as operárias (Sirviö et al., 2006; Oldroyd & Fewell, 2007). A poliginia e a poliandria resultam em grandes diferenças alélicas entre as operárias, enquanto que a recombinação genética origina um grande número de genótipos com novas ou raras combinações alélicas do genoma materno (Sirviö et al., 2006).

Estudos realizados com marcadores microssatélites têm demonstrado que rainhas dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* apresentam poliandria, ou seja, se acasalam com mais de um macho (Fjerdingstad et al., 1998; Villesen et al., 2002; Baer & Boomsma, 2003; Helmkampf et al., 2008).

Em formigas cortadeiras, a mudança do estado de monandria para a poliandria está associada com o aumento na complexidade da colônia e no seu tamanho (Villesen et al., 2002). Colônias com rainhas que acasalam com mais de um macho tipicamente são maiores, possuem operárias polimórficas e um alto grau de divisão de trabalho, como observado em algumas espécies de *Atta* (Fjerdingstad et al., 1998; Fjerdingstad & Boomsma, 2000; Murakami et al., 2000).

O acasalamento múltiplo é um mecanismo que proporciona uma maior diversidade genética na colônia (Strassmann, 2001), podendo

resultar em: 1) colônias com um maior sucesso reprodutivo em relação às colônias mais uniformes (Baer & Schmid-Hempel, 1999); 2) operárias geneticamente mais diversas e resistentes à doenças (Baer & Schmid-Hempel, 1999), 3) maior taxa de crescimento da colônia (Wiernasz et al., 2004; Helmkamp et al., 2008) e 4) maior divisão de trabalho entre as operárias (Fjerdingstad et al., 1998).

Estudos utilizando marcadores microssatélites têm sido realizados com formigas. Por exemplo, Giraud et al. (2002) quantificaram a variabilidade genética e analisaram os padrões de agressão de *Linepithema humile*, espécie originária da Argentina e que foi introduzida na Europa. Ao comparar populações nativas e introduzidas, os autores verificaram uma menor variabilidade genética, nos locos microssatélites, nas populações introduzidas. Esta diminuição poderia ter resultado na perda da capacidade de reconhecimento após a introdução, pois em ambientes exóticos, esta espécie possui uma estrutura social incomum do tipo unicolonial, na qual indivíduos de ninhos fisicamente diferentes se misturam. Por outro lado, populações nativas apresentam multicolonialidade, a estrutura social mais comum, com agressão entre operárias de ninhos diferentes.

Gyllenstrand & Seppä (2003) estudaram um sistema populacional fragmentado, isolado e pequeno da formiga poligínica *Formica lugubris* e avaliaram o impacto genético da estrutura populacional sobre a manutenção e conservação de suas populações. Para isso, foram analisadas duas populações: uma geograficamente isolada de outras populações e fragmentada da Inglaterra e outra, para comparação, similarmente fragmentada, porém não isolada da Finlândia. Os autores esperavam que o isolamento e fragmentação da população inglesa ocasionassem um decréscimo na variabilidade genética quando comparado com a população da Finlândia. Entretanto, os autores encontraram um alto tamanho efetivo na população na Inglaterra, o que ajudou a manter a variabilidade nesta população. Apesar do aparente isolamento, a variabilidade genética encontrada na população isolada foi

similar a da população não isolada. Além disso, a ausência de endogamia e a alta variabilidade sugeriram que a população isolada não apresenta depressão endogâmica. A análise de isolamento por distância mostrou que colônias relacionadas se agrupam, o que sugere que novos ninhos são fundados por brotamento e permanecem próximos do ninho natal.

Sanetra & Crozier (2003) estudaram a diferenciação genética dentro e entre três populações distantes de uma espécie de formiga endêmica da Austrália, *Nothomyrmecia macrops*, utilizando nove locos microssatélites e quatro marcadores mitocondriais. Esta espécie é conhecida por ter características comportamentais e morfológicas primitivas. As fêmeas produzidas apresentam asas curtas e, por isso, não se dispersam muito. Já os machos possuem as asas normais e podem ter ampla dispersão no ambiente. Como *N. macrops* possui fêmeas filopátricas (o acasalamento ocorre próximo ao ninho natal) e os machos são dispersores, espera-se que a estrutura genética estimada seja diferente entre marcadores nucleares e mitocondriais. A diferenciação detectada pelo marcador mitocondrial foi alta, sendo indicativo de que as fêmeas desta espécie possuem baixa dispersão. Por outro lado, os locos microssatélites analisados geraram altos níveis de variabilidade genética nas três populações (a heterozigosidade observada foi 0,81) e indicaram que as populações apresentam moderada diferenciação genética, o que indica que ocorre fluxo gênico por meio da dispersão dos machos.

DeHeer & Herbers (2004), utilizando marcadores microssatélites, estudaram a organização social da espécie *Formica podzolica*, que pode apresentar colônias com uma rainha (monogínicas) acasalada com um macho e, colônias com mais de uma rainha (poligínicas) vivendo em simpatria. O F_{is} (parâmetro da estatística F de Wright que mede os desvios das frequências alélicas em nível de indivíduo dentro da subpopulação) foi significativamente negativo ao se considerar as colônias com as duas formas sociais e também as colônias monogínicas isoladamente. Já o F_{it} (parâmetro que mede os desvios das frequências alélicas em relação à população total) não foi significativo considerando

as duas formas sociais ou as colônias monogínicas; entretanto, foi maior que zero nas colônias poligínicas. Os autores não encontraram nenhuma diferenciação genética significativa entre as formas sociais e a diferenciação entre as populações não parece ser afetada pela organização social da colônia.

Mäki-Petäys et al. (2005) analisaram o efeito da fragmentação florestal e a variabilidade genética das espécies poligínicas *Formica aquilonia* e *F. lugubris*. A destruição do habitat levou ao declínio e redistribuição espacial das populações com um efeito maior em *F. aquilonia* (altamente poligínica), uma vez que subpopulações se tornaram extintas ou colonizaram novas áreas. A diversidade genética encontrada foi similar em ambas as espécies e, suas subpopulações apresentaram moderada diferenciação genética.

Bernasconi et al. (2005) estudaram a diversidade e estrutura genética de duas populações de *Formica lugubris*, em uma reserva florestal, empregando sete *primers* microssatélites desenhados para *F. lugubris* e *F. exsecta*. A população 1 estava localizada em um habitat onde foram observados pouca densidade de ninhos, o que indica que essa área não estava saturada. Por outro lado, a população 2 possuía uma grande densidade de ninhos, o que demonstrava que o local estava mais saturado. Assim, os autores esperavam que essas populações apresentassem diferentes estruturas genéticas. As análises indicaram que ocorre endogamia nas populações e que as diferenças genéticas estão correlacionadas com a distância geográfica, o que significa que dois ninhos próximos são geneticamente mais similares do que dois distantes. Adicionalmente, as análises demonstraram que o fluxo gênico entre as duas populações é restrito (o parâmetro F_{st} que mede os desvios das frequências alélicas entre subpopulações foi de 0,156).

Helmkamp et al. (2008) investigaram a variabilidade genética intra e inter populacional em *Atta colombica*, a partir de *primers* microssatélites construídos para a espécie. As populações foram amostradas na zona do canal do Panamá, incluindo populações de ilha, penínsulas em terra firme

e áreas de um Parque Nacional. Todas as populações estudadas apresentaram alta variabilidade genética nos quatro locos microssatélites analisados. Como não foi detectada nenhuma diferenciação genética entre as populações de ilha e de terra firme, sugeriu-se que o Canal do Panamá não representa nenhuma barreira física na dispersão de fêmeas reprodutivas da espécie.

Até o momento, nenhum estudo genético foi realizado com a formiga *Atta robusta*. Assim, com o presente estudo investigou-se a variabilidade genética e o nível de estruturação em populações desta espécie com o uso de *primers* microssatélites espécie-específicos. Os dados deste trabalho poderão ser usados como ferramenta para elaboração de planos de conservação da espécie, uma vez que seu habitat está sendo constantemente degradado e *A. robusta* está ameaçada de extinção.

2. Referências Bibliográficas

BAER, B. & BOOMSMA, J. J. **Male reproductive investment and queen mating-frequency in fungus-growing ants.** *Behav. Ecol.*, 15 (3): 426 – 432, 2003.

BAER, B. & SCHIMID-HEMPEL, P. **Experimental variation in polyandry affects parasite loads and fitness in a bumble-bee.** *Nature*, 397: 151-154. 1999.

BERNASCONI, C; MAEDER, A.; CHERIX, D.; PAMILO, P. **Diversity and genetic structure of the Wood ant *Formica lugubris* in unmanaged forests.** *Ann. Zool. Fennici*, 42: 189 – 199, 2005.

CURRIE, C. R. A. **Community of Ants, Fungi, and Bacteria: A Multilateral Approach to Studying Symbiosis.** *Annu. Rev. Microbiol.*, 55: 357 – 380, 2001.

DEHEER, C.J. & HERBERS, J. M. **Population genetics of the socially polymorphic ant *Formica podzolica*.** *Insect. Soc.*, 51: 309 – 316, 2004.

DIJKSTRA, M. B. & BOOMSMA, J. J. **Are workers of *Atta* leafcutters ants capable of reproduction?** *Insect. Soc.*, 53: 136 – 140, 2005.

FAKRUDIN, B; VIJAYKUMAR; KAMBALPALLY, K. B.; PATIL, B. V.; KURUVINASHETTI, M. S. **DNA – based marker systems and their utility in entomology.** *Entomol. Fennica* 17: 21 – 33, 2006.

FJERDINGSTAD, E. J. & BOOMSMA, J. J. **Queen mating frequency and relatedness in young *Atta sexdens* colonies.** *Insect. Soc.*, 47: 354 – 356, 2000.

FJERDINGSTAD, E. J., BOOMSMA, J. J. & THORÉN, P. A. **Multiple paternity in the leafcutter ant *Atta colombica* – a microsatellite DNA study.** *Heredity*, 80: 118 – 126, 1998.

FOWLER, H.G. **The population status of the endangered Brazilian endemic leaf-cutting ant *Atta robusta* (Hymenoptera: Formicidae).** Ecol. Lett., 74: 347-350, 1995.

FRANKHAM, R. **Conservation Genetics.** Annu. Rev. Genetics, 29: 305 – 327, 1995.

GIRAUD, T.; PEDERSEN, J. S.; KELLER, L. **Evolution of supercolonies: The argentine ants of southern Europe.** PNAS, 99 (9) 6075 – 6079, 2002.

GONÇALVES, C. R. **Distribuição, biologia e ecologia das saúvas.** Div. Agron., 1: 2 – 10, 1960.

GYLLENSTRAND, N. & SEPPA, P. **Conservation genetics of the wood ant, *Formica lugubris*, in a fragmented landscape.** Mol. Ecol., 12: 2931-2940, 2003.

HELMKAMPF, M.; GADAU, J. & FELDHAAR, H. **Population and sociogenetic structure of the leaf-cutter ant *Atta colombica* (Formicidae, Myrmecinae).** Insect. Soc., 55: 434 – 442, 2008.

HOLLDÖBLER, B & WILSON, E. O. **The Ants.** Belknap Press, Cambridge, 732 pp., 1990.

HUGHES, W. O. H. & BOOMSMA, J. J. **Genetic diversity and disease resistance in leaf-cutting ant societies.** Evolution, 58 (6) 1251 – 1260, 2004.

KRIEGER, M. J. B.; ROSS, K. G.; CHANG, C. W. Y.; KELLER, L. **Frequency and origin of triploidy in the fire ant *Solenopsis invicta*.** Heredity, 82: 142- 150.

LITT, M. & LUTY, A. J. **A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene.** Am. J. Hum. Genet., 44: 397: 401, 1989.

MACHADO, A. B. M.; MARTINS, C. S.; DRUMMOND, G. M. **Lista da Fauna Ameaçada de Extinção: Incluindo as Listas das Espécies Quase Ameaçadas e Deficientes em Dados.** Belo Horizonte. Fundação Biodiversitas, 160 pp, 2005.

MÄKI-PETAYS, H.; ZAKHAROV, A.; VILJAKAINEN, L.; CORANDER, J.; PAMILO, P. **Genetic changes associated to declining populations of *Formica* ants in fragmented forest landscape.** Mol. Ecol., 14: 733 – 742, 2005.

MURAKAMI, T.; HIGASHI, S. & WINDSOR, D. **Mating frequency, colony size, polyethism and sex ratio in fungus-growing ants (Attini).** Behav. Ecol. Sociobiol., 48: 276 – 284, 2000.

OLDROYD, B. P. & FEWELL, J. H. **Genetic diversity promotes homeostasis in insect colonies.** Trends in Ecol. and Evol., 22 (8): 408:413, 2007.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I., VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M. L. C. **Origin, evolution and genome distribution of microsatellites.** Genetics and Molecular Biology, 29 (2): 294 – 307, 2006.

SANETRA, M. & CROZIER, R. H. **Patterns of population subdivision and gene flow in the ant *Nothomyrmecia macrops* reflected in microsatellite and mitochondrial DNA markers.** Mol. Ecol., 12: 2281 – 2295, 2003.

SIRVIÖ, A.; GADAU, J.; RUEPPELL, O.; LAMATSCH, D.; BOOMSMA, J. J.; PAMILO, P.; PAGE, R. E. **High recombination frequency creates genotypic diversity in colonies of the leaf-cutting ant *Acromyrmex echinator*.** J. Evol. Biol., 19: 1475 – 1485, 2006.

STRASSMANN, J. **The rarity of multiple mating by females in the social Hymenoptera.** Insect. Soc., 48: 01 – 13, 2001.

TEIXEIRA, M.C.; SCHOEREDER, J.H.; MAYHÉ-NUNES, A. J. **Geographic Distribution of *Atta robusta* Borgmeier (Hymenoptera: Formicidae)**. Neotrop. Entomol., 32 (4): 719-721, 2003.

TEIXEIRA, M.C.; SCHOEREDER, J.H.; LOUZADA, J.N.C.; LOUZADA, J.N.C. **Occurrence of *Atta robusta* Borgmeier (Hymenoptera: Formicidae) in the North of Espírito Santo State**. Neotrop. Entomol., 33 (2): 265-266, 2004.

VILLESEN, P.; Murakami, T.; Schultz, T. R.; Boomsma, J. J. **Identifying the transition between single and multiple mating of queens in fungus-growing ants**. Proc. R. Soc. Lond., 269: 1541:1548, 2002.

WEBER, N. A. **Fungus growing ants**. Science, Vol. 153 (3736): 587 – 604, 1966.

WIERNASZ, D. C.; PERRONI, C. L.; COLE, B. J. **Polyandry and fitness in the western harvester ant, *Pogonomyrmex occidentalis***. Mol. Ecol. 13: 1601-1606, 2004.

WILGENBURG, E. V.; DRIESSEN, G.; BEUKEBOOM, L. W. **Single locus complementary sex determination in Hymenoptera: an “unintelligent” design?** Front. Zool., 3 (1) 1 – 15, 2006.

Capítulo 1

Caracterização de *primers* microssatélites para *Atta robusta* Borgmeier (Hymenoptera: Formicidae)

1. Introdução

Atta robusta é uma formiga cortadeira (Tribo Attini) que não invade ecossistemas agrícolas sendo, por isso, ignorada nas pesquisas desenvolvidas (Teixeira et al., 2003) e até o momento não há estudos genéticos com esta espécie.

Esta espécie habita somente ambientes de restinga, sendo encontrada do Norte do estado do Espírito Santo até o sul do Rio de Janeiro (Gonçalves, 1960; Teixeira et al., 2003; Teixeira et al., 2004). Entretanto, por causa da ação antrópica, a restinga passa por um rápido processo de desmatamento (Holldobler & Wilson, 1990), o que gera a freqüente destruição deste habitat e insere *A. robusta* na Lista da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (Machado et al., 2005).

Os microssatélites (Litt & Luty, 1989) têm sido aplicados em vários estudos envolvendo a genética da conservação, genética de populações, melhoramento molecular e testes de paternidade (Oliveira et al., 2006; Fakrudin et al., 2006). Até o momento, já foram desenhados *primers* microssatélites para duas espécies de formigas cortadeiras: *Acromyrmex echinator* (Ortius-Lechner et al., 2000) e *Atta colombica* (Fjerdingstad et al., 1998; Helmkampf et al., 2008).

O uso de *primers* não-específicos para uma espécie (*primers* heterólogos) pode ser usado como estratégia em estudos populacionais (Doums, 1999; Peters, 1997). Entretanto, o uso destes *primers* pode resultar na amplificação de poucos locos, gerar menor polimorfismo e

alelos nulos, o que justifica o investimento no desenvolvimento de *primers* espécie-específicos.

Os alelos nulos são gerados a partir da mutação na seqüência de DNA complementar aos *primers*, o que pode inibir ou impedir completamente a ligação destes, resultando tanto em redução como em perda completa do produto de PCR (Callen et al., 1993). Como conseqüência, indivíduos heterozigotos que possuem um alelo nulo serão genotipados como homozigotos e, conseqüentemente, a variabilidade genética observada diminui. Assim, o desenho de *primers* espécie-específicos geralmente produz maior número de locos polimórficos, maior número de alelos/loco e maior heterozigosidade.

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi desenhar *primers* microssatélites específicos para *A. robusta*, visando a obtenção de dados sobre a variabilidade, estrutura genética e social de populações desta espécie.

2. Material e Métodos

a) Amostras

Para o desenho dos *primers* espécie-específicos foram utilizados o DNA de duas operárias. Para a caracterização dos *primers* espécie específicos foram utilizadas 20 operárias de *A. robusta* (uma operária por colônia) provenientes de uma população.

Foram analisadas também, cinco indivíduos de cada uma das seguintes espécies/subespécies de formigas cortadeiras: *Atta sexdens rubropilosa*, *A. laevigata*, *Acromyrmex subterraneus molestans*, *A. subterraneus brunneus*, *A. subterraneus niger* e *A. subterraneus subterraneus*, para se verificar se os *primers* microssatélites desenhados especificamente para *A. robusta* poderiam ser utilizados em estudos populacionais envolvendo outras espécies de formigas.

As formigas coletadas foram fixadas em etanol absoluto em campo. No laboratório, o álcool absoluto foi trocado e as amostras foram armazenadas à -80°C até o momento da extração do DNA.

b) Extração e quantificação de DNA

O DNA total das amostras foi extraído conforme o protocolo descrito por Waldschmidt et al. (1997). A cabeça e o abdômen de cada indivíduo foram macerados em nitrogênio líquido em *ependorf* de 1,5 mL. Foi adicionado 1000 µL de tampão de extração (CTAB 2%; NaCl 1,4 M; Tris-HCl 20 mM pH 8,0; EDTA 100 mM pH 8,0; e protease 40 µg/mL). As amostras foram incubadas a 65° C por 30 minutos. Foram realizadas duas desproteínizações com clorofórmio. O DNA extraído foi precipitado com um volume de isopropanol e incubado em freezer a - 20° C por pelo menos 2 horas. Os *pellets* de DNA obtidos foram lavados duas vezes com etanol 70% (200 µL) e secos à temperatura ambiente por uma hora. Em seguida o DNA de cada indivíduo foi ressuspenso em 100 µL de TE e armazenado a 4° C por 2 a 4 horas. A quantificação e a verificação da integridade do DNA extraído foram realizadas após a eletroforese em gel de agarose a 0,8%.

c) Isolamento de primers microssatélites para Atta robusta

Para o desenho dos *primers* espécie-específicos foi utilizada a metodologia proposta por Nest et al. (2000), que se baseia na amplificação de seqüências localizadas entre dois microssatélites inversamente orientados (ISSR - *Inter-simple sequence repeats*). As amplificações com os *primers* ISSR foram realizadas em um termociclador PTC-100® (MJ Research) utilizando-se dois indivíduos de *A. robusta*. Foram testados noventa e nove primers ISSR e destes, treze (UBC 807, 809, 823, 834, 836, 840, 845, 853, 855, 888, 889, 890 e 891) foram

escolhidos para serem utilizados nas amplificações, por apresentarem mais de cinco bandas bem evidentes e facilmente distinguíveis entre os dois indivíduos utilizados nos testes.

O programa de amplificação consistiu de um passo inicial de desnaturação a 94 °C (3 min), seguido por 39 ciclos a 92 °C (1 min), 50 °C (2 min) e 72 °C (2 min) com uma extensão final a 72 °C (7 min). As amplificações foram conduzidas em volumes de 25 µL, consistindo de 0,2 µM de primer, 8 µM de dNTP, 0,5 U Taq DNA polimerase (Promega), 1X do tampão de PCR e cerca de 20 ng de DNA genômico.

Os fragmentos ISSR foram purificados com a enzima ExoSAP e ligados no vetor pGEM T-Easy (Promega), segundo instruções do fabricante.

Células ultra-competentes foram produzidas segundo protocolo descrito por Inoue et al. (1990), e então 100 µL destas células foram transformadas com 10µL da reação de ligação contendo os fragmentos ISSR ligados ao vetor. As bactérias foram plaqueadas em meio seletivo LB/Ampicilina/Xgal/IPTG e incubadas em meio sólido para crescimento das colônias. Colônias que apresentaram coloração branca, indicativa de clone recombinante, foram selecionadas para incubação em meio ágar LB+Ampicilina a 37 °C. As colônias individuais foram inoculadas em caldo LB + Ampicilina e incubadas no *shaker* a 150 rpm *overnight*.

Para verificar a presença do inserto (plasmídeo recombinante) foi feita uma lise rápida de colônia de colônias brancas e azuis e o produto foi aplicado em gel de agarose 0,8%. As colônias azuis serviram como controle. Finalmente, o DNA plasmidial das células transformadas foi extraído utilizando-se o *PureLink HiPure Plasmid DNA Purification Kit* da Invitrogen, segundo instruções do fabricante.

Os clones positivos foram sequenciados segundo a técnica de terminação em cadeia por dideoxinucleotídeos (ddNTPs) descrita por Sanger et al. (1977) utilizando um sequenciador automático modelo “ABI 3730XL” na empresa “Macrogen Korea” e as seqüências *forward* e *reverse* foram analisadas utilizando-se o programa *Chromas Pro* e

PhredPhrap. Pares de *primers* foram desenhados utilizando-se o programa *OligoExplorer* 1.2 para as seqüências que apresentaram microssatélites.

d) Amplificação das regiões microssatélites

Foram desenhados 20 pares de *primers* microssatélites para *A. robusta*. O *primer forward* (F) foi marcado com a cauda M13 em sua extremidade final 5'. A cauda M13 permite o pareamento da extremidade 5' do *primer* F com o *primer* universal M13 marcado com fluorescência FAM (6-carboxi-fluoresceína) ou HEX (hexacloro-6-carboxi-fluoresceína), gerando fragmentos marcados que são detectados pelo laser no sequenciador automático *MegaBace 1000*.

Amplificações testes foram realizadas para se determinar a melhor temperatura de amplificação. A mistura de reação de 10 µL consistiu de: 0,1 mM de cada desoxirribonucleosídeo trifosfatado (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 2,5 µM de cada *primer*; 0,5 unidade de *Taq* polimerase em tampão 1x e cerca de 10 ng de DNA total. A mistura foi incubada em termociclador modelo PTC – 100 (MJ Research). O programa de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida de 40 ciclos a 92°C (30 seg), pareamento com temperatura específica para cada *primer* (1 min) (Tabela 1) e 72°C (30 seg). Foi feito ao final desses ciclos, um passo extra de alongação a 72°C por 5 min.

Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante 8%. Após a eletroforese, os géis foram submetidos à coloração com nitrato de prata 0,2%. Para isso, primeiramente o gel foi fixado por 10 minutos, em uma solução de etanol 10% e ácido acético 0,5%. Em seguida, o gel foi corado com solução de nitrato de prata 0,2%, durante 10 minutos. Após esse tempo foi feita uma lavagem em água destilada por um minuto e o gel submetido à revelação em solução reveladora (NaOH 3% e formol 0,6%), até o aparecimento das bandas. O revelador foi descartado e o fixador adicionado para

interromper a revelação. Todas as etapas foram feitas sob leve agitação. Em seguida, os géis foram plastificados e a melhor temperatura de amplificação de cada *primer* foi determinada.

Posteriormente, foram realizadas amplificações do DNA utilizando-se 20 indivíduos de uma localidade, segundo a metodologia proposta por Schuelke (2000), com modificações. Esta etapa foi importante para se detectar os locos microssatélites mais polimórficos. Os eletroferogramas obtidos foram analisados utilizando o programa MegaBACE *Fragment Profiler*.

A mistura de reação de 10 μ L consistiu de: 200 μ M de cada desoxirribonucleosídeo trifosfatado (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 0,1 μ M do primer F; 1,0 μ M do primer R; 1,0 μ M do primer M13; 1,5mM de MgCl₂; 0,5 unidades de *Taq* polimerase em tampão 1x e 10 ng de DNA total. O programa de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C por 3min, seguida por 10 ciclos a 94°C (15s), pareamento com temperatura específica para cada *primer* (20s) e 72°C (30s), e, posteriormente, 25 ciclos a 89°C (15s), 53°C (20s) e 72°C (30s). Foi feito ao final desses ciclos, um passo extra de alongação a 72°C por 30 min.

e) *Análises estatísticas*

O programa Popgene versão 1.32 (Yeh et al., 1999) foi utilizado para calcular os seguintes estimadores de diversidade genética: frequência alélica, porcentagem de locos polimórficos (P), número médio de alelos por loco (A), heterozigosidades observada (H_o) e esperada não-viesada de Nei (Nei, 1973) (H_e). Para cada loco foi testado o Equilíbrio de Hardy Weinberg (EHW) ao nível de 0,05 de significância.

3. Resultados

No total, vinte e oito plasmídeos recombinantes foram sequenciados. Com as sequências obtidas foram desenhados vinte pares

de *primers* que flanqueiam as regiões microssatélites. Estes foram testados e a melhor temperatura para amplificação de cada *primer* foi determinada.

Dos 20 *primers* desenhados, 11 (55%) foram polimórficos (Atro1, Atro3, Atro6, Atro7, Atro8, Atro9, Atro11, Atro15, Atro16, Atro17 e Atro18). Na Tabela 1 estão apresentadas as características dos mesmos, quanto à seqüência dos *primers*, tipo de repetição microssatélite, temperatura de amplificação, tamanhos dos fragmentos gerados, número de alelos e heterozigosidades observada (H_o) e esperada (H_e).

O número de alelos nos locos variou de três (loco Atro1) a nove (locos Atro6, Atro7, Atro9 e Atro15). Os valores da heterozigosidade observada (H_o) variaram de 0,44 a 1,00. Sete locos (Atro1, Atro7, Atro8, Atro9, Atro15, Atro16 e Atro18) se diferenciaram estatisticamente do esperado para o equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P < 0,05$). A baixa heterozigosidade observada em alguns locos em relação à esperada e o desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg pode ser devido à amostragem em subpopulações estruturadas que possuem diferentes frequências alélicas. A presença de alelos nulos não é considerada, uma vez que foram utilizados *primers* microssatélites específicos para *A. robusta*.

Os resultados do presente trabalho também indicaram que, dos 11 pares de *primers* desenhados para *A. robusta*, dez geraram produtos de amplificação em *Atta laevigata* e *Acromyrmex subterraneus brunneus*, nove em *Atta sexdens rubropilosa*, *Acromyrmex subterraneus molestans* e *A. subterraneus niger* e cinco em *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Tabela 2). Portanto, estes dados indicam que eles poderão ser utilizados em estudos genéticos com espécies próximas, em casos onde não haja *primers* espécie-específicos.

Assim, uma informação detalhada sobre o número de acasalamentos das rainhas, comportamento social e estrutura genética de *A. robusta* e outras espécies de formigas cortadeiras poderão ser obtidos com o uso desses onze *primers* microssatélites.

Tabela 1: Caracterização dos onze *primers* microssatélites polimórficos de *Atta robusta*

Loco	Sequências dos <i>primers</i> (5'-3')	SSR	T (°C)	Tamanho dos alelos	N _a	H _o	H _e
Atro1	F: 5'-GCAGCGCATCCCATTATATC-3' R: 5'-GTAGTGCAACAACGAAACGC-3'	(TA) ₃ TAAT(TA) ₃	65	91 - 241	3	0,84	0,57
Atro3	F: 5'-CACATAAGTCCCGAACGATG-3' R: 5'-GCGCTAAAATAAGCATCTCG-3'	(T ₈)C(T ₄)CC(ATA) ₃	65	81 - 243	8	0,47	0,48
Atro6	F: 5'-CTTCCAAGCAAGCGATTAGG-3' R: 5'-GACGAATAGAGCTTTCGTGC-3'	AT(A ₇)	57	128 - 225	9	0,75	0,76
Atro7	F: 5'-AGCGATTAGGAACAGGCAGG-3' R: 5'-AGAGCTTTCGTGCTCTAACG-3'	AT(A ₇)	60	80 - 174	9	0,89	0,69
Atro8	F: 5'-GCTCTCCCCCTTCCCTCTCG-3' R: 5'-AGGAAGGAGCCCGTTCGAGG-3'	(TG) ₃ CTG	62	100 - 207	5	0,74	0,53
Atro9	F: 5'-TAATTACGACAGCGTAAGCG-3' R: 5'-GGCTAAGAAAGTTAATCGAC-3'	(AT) ₃ AGT	60	105 - 199	9	0,80	0,75
Atro11	F: 5'-CGAATAGAGCTTTCGTGCTC-3' R: 5'-AATGAACTTCCAAGCAAGCG-3'	(T ₇)AT	60	103 - 198	6	0,45	0,39
Atro15	F: 5'-GGAAAGGAAAACGGGAGAGA-3' R: 5'-ATGATTGGTGCCGCGATATC-3'	(CT) ₃	68	90 - 259	9	0,44	0,62
Atro16	F: 5'-TGGAGCGAATGAACGTATAC-3' R: 5'-TCTCGCAGAGACACGAAAAG-3'	(TG) ₃	60	84 - 172	7	1,00	0,72
Atro17	F: 5'-CGCGCGACGCACGGTGCAAG-3' R: 5'-GCGAGAAAGCGTGCGGCAGC-3'	(TA) ₄ CG(TA) ₃	82	65 - 161	6	1,00	0,69
Atro18	F: 5'-TCGACGATACTGCAGCATAC-3' R: 5'-ACCCTATCTATTGTCGGCTC-3'	(AG) ₃	61	81 - 222	6	1,00	0,71
Média						0,76	0,63

T: temperatura de anelamento do primer; N_a: número de alelos; H_o: heterozigosidade observada; H_e: heterozigosidade esperada

Tabela 2: Resultado da amplificação cruzada com os onze *primers* microssatélites desenvolvidos para *A. robusta* em outras espécies de formigas cortadeiras. O X indica amplificação com o *primer* microssatélite na espécie testada e entre parênteses está o número de alelos observados em cada loco

Loco	<i>Atta sexdens rubropilosa</i>	<i>Atta laevigata</i>	<i>Acromyrmex subterraneus molestans</i>	<i>Acromyrmex subterraneus brunneus</i>	<i>Acromyrmex subterraneus niger</i>	<i>Acromyrmex subterraneus subterraneus</i>
Atro1	X (1)	X (1)	X (2)	X (1)	X (1)	X (1)
Atro3	X (1)	X (2)	X (2)	X (2)	X (1)	X (1)
Atro6	X (1)	X (2)	X (1)	X (1)		
Atro7	X (1)	X (1)	X (1)	X (1)	X (1)	
Atro8	X (2)	X (2)	X (1)	X (1)	X (1)	
Atro9	X (2)	X (2)	X (4)	X (4)	X (1)	X (1)
Atro11	X (1)	X (1)	X (1)	X (1)	X (1)	X (1)
Atro15				X (1)		
Atro16	X (1)	X (1)		X (1)	X (1)	
Atro17		X (1)	X (1)		X (1)	
Atro18	X (2)	X (1)	X (2)	X (2)	X (1)	X (2)

4. Referências Bibliográficas

CALLEN, D. F.; THOMPSON, A. D.; SHEN, Y.; PHILLIPS, H. A.; RICHARDS, R. I.; MULLEY, J. C.; SHUTHERLAND, G. R. **Incidence and origin of “null” alleles in the (AC)_n microsatellite markers.** Am. J. Hum. Genet., 52: 922 – 927, 1993.

DOUMS, C. **Characterization of microsatellite loci in the queenless Ponerine ant *Diacamma cyaneiventre*.** Mol. Ecol., 8: 1957-1969, 1999.

FJERDINGSTAD, E. J., BOOMSMA, J. J. & THORÉN, P. A. **Multiple paternity in the leafcutter ant *Atta colombica* – a microsatellite DNA study.** Heredity, 80: 118 – 126, 1998.

FAKRUDIN, B; VIJAYKUMAR; KAMBALPALLY, K. B.; PATIL, B. V.; KURUVINASHETTI, M. S. **DNA – based marker systems and their utility in entomology.** Entomol. Fennica, 17: 21 – 33, 2006.

GONÇALVES, C. R. **Distribuição, biologia e ecologia das saúvas.** Div. Agron., 1: 2 – 10. 1960.

HELMKAMPF, M.; GADAU, J. & FELDHAAR, H. **Population and sociogenetic structure of the leaf-cutter ant *Atta colombica* (Formicidae, Myrmecinae).** Insect. Soc., 55: 434 – 442, 2008.

HOLLDÖBLER, B & WILSON, E. O. **The Ants.** Belknap Press, Cambridge, 732 pp., 1990.

INOUE, H.; NOJIMA, H.; OKAYAMA, H. **High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids.** Gene, 96(1) 23-28, 1990

LITT, M.; LUTY, A. J. **A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene.** Am. J. Hum. Genet., 44: 397: 401, 1989.

MACHADO, A. B. M.; MARTINS, C. S.; DRUMMOND, G. M. **Lista da Fauna Ameaçada de Extinção: Incluindo as Listas das Espécies Quase Ameaçadas e Deficientes em Dados.** Belo Horizonte. Fundação Biodiversitas, 160 pp, 2005.

NEI, M. **The theory and estimation of genetic distance.** In: Genetic Structure of Populations. University Hawaii Press, Honolulu. 1973.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I., VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M. L. C. **Origin, evolution and genome distribution of microsatellites.** Genet. Mol. Biol., 29 (2): 294 – 307, 2006.

ORTIUS-LECHNER, D.; GERTSCH, P. J.; BOOMSMA, J. J. **Variable microsatellite loci for the leafcutter ant *Acromyrmex echinator* and their applicability to related species.** Mol. Ecol., 9 (1):114-6, 2000.

PETERS, J. M. **Microsatellite loci for *Pseudomyrmex pallidus* (Hymenoptera: Formicidae).** Mol. Ecol., 6: 887-888, 1997.

PROGRAMA **CHROMAS** **PRO** disponível em
www.technelysium.com.au/ChromasPro.html.

PROGRAMA **OLIGOEXPLORER** **1.2** disponível em
<http://www.genelink.com/tools/gl-oe.asp>.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 5463-5467, 1977.

SHUELKE, M. **An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments.** Nat. Biotechnol., 8: 233 – 234, 2000.

TEIXEIRA, M.C.; SCHOEREDER, J.H.; MAYHÉ-NUNES, A. J. **Geographic Distribution of *Atta robusta* Borgmeier (Hymenoptera: Formicidae).** Neotrop. Entomol., 32 (4): 719-721, 2003.

TEIXEIRA, M.C.; SCHOEREDER, J.H.; LOUZADA, J.N.C.; LOUZADA, J.N.C. **Occurrence of *Atta robusta* Borgmeier (Hymenoptera: Formicidae) in the North of Espírito Santo State.** Neotrop. Entomol., 33 (2): 265-266, 2004.

NEST, M. A.; STEENKAMP, E. T.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. **Development of simple sequence repeat (SSR) markers in *Eucalyptus* from amplified inter-simple sequence repeats (ISSR).** Plant breed., 119: 433 – 436, 2000.

WALDSCHMIDT, A.M.; SALOMÃO, T.M.F.; BARROS, E.G.; CAMPOS, L.A.O. **Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae).** Braz. J. Genet., 20:421-423, 1997.

YEH, F.C.; YANG, R.; BOYLE T. **POPGENE Version 1.32 Microsoft Windows-based freeware for populations genetic analysis.** Quick user Guide, 1999.

Capítulo 2

Variabilidade genética em populações da espécie endêmica e ameaçada de extinção *Atta robusta* Borgmeier (Hymenoptera: Formicidae)

1. Introdução

As formigas cortadeiras do gênero *Atta* predam a maioria dos tipos vegetais e são, por isso, consideradas pragas agrícolas, podendo causar grandes prejuízos econômicos. Conseqüentemente, estudos a respeito da biologia das formigas deste gênero têm sido realizados mais por causa de sua importância econômica do que pelo seu papel ecológico no ecossistema (Holldobler & Wilson, 1990). Conseqüentemente, estudos genéticos com as espécies deste gênero são extremamente raros.

O único estudo de genética de populações envolvendo uma espécie de *Atta* foi realizado por Helmkampf et al. (2008). Estes autores investigaram a variabilidade genética intra e inter populacional em *Atta colombica*, utilizando *primers* microssatélites construídos especificamente para a espécie.

Atta robusta é uma espécie de formiga cortadeira que não invade ecossistemas agrícolas e habita somente ambientes de restinga, sendo encontrada do Norte do estado do Espírito Santo até o sul do Rio de Janeiro (Gonçalves, 1960; Texeira et al., 2003; Teixeira et al., 2004).

A região de restinga é caracterizada por apresentar solo arenoso, plantaço herbácea e estar localizada a beira-mar. Por causa da ação antrópica, esse ambiente passa por um rápido processo de desmatamento (Holldobler & Wilson, 1990), o que gera a freqüente destruição deste habitat e insere *A. robusta* na Lista da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (Machado et al., 2005).

Até o momento, entretanto, nenhum estudo genético foi realizado com a formiga *Atta robusta*. Assim, com o presente estudo investigou-se a variabilidade genética e o nível de estruturação em populações desta espécie com o uso de *primers* microssatélites espécie-específicos.

2. Material e Métodos

a) Amostras

Foram coletadas operárias de *A. robusta* em 80 colônias situadas em ambientes de restinga do litoral do estado do Espírito Santo (48 colônias) e do Rio de Janeiro (32 colônias) (Tabela 1). No total foram visitadas 14 localidades, sendo 6 no Espírito Santo e 8 no Rio de Janeiro (Figura 1).

As formigas coletadas foram fixadas em etanol absoluto em campo. No laboratório, o álcool absoluto foi trocado e as amostras foram armazenadas a -80°C até o momento da extração do DNA.

Tabela 1: Localidades amostradas e número de colônias de *A. robusta* analisadas no presente estudo

Estado	Localidade	Número de colônias
	Aracruz	9
	São Mateus	10
	Itapemirim	9
	Linhares	9
	Marataízes	3
	Presidente Kennedy	8
Total		48
Rio de Janeiro	São Francisco de Itabapoana	5
	São João da Barra	5
	Campos de Goytacases	2
	Rio de Janeiro	11
	Rio das Ostras	2
	Cabo Frio	3
	Araruama	2
	Maricá	2
Total		32

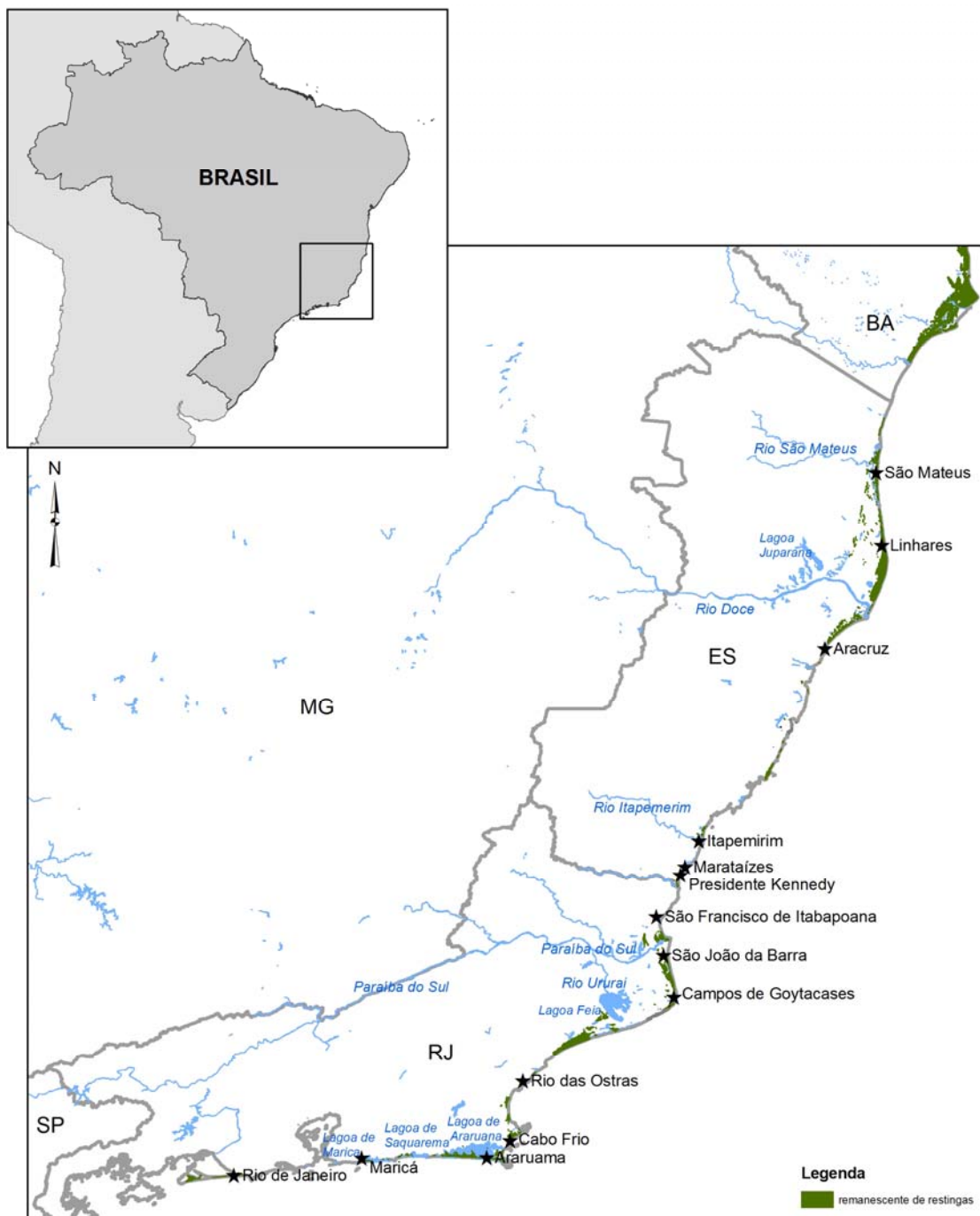


Figura 1: Localização geográfica das 14 localidades nos estados do Espírito Santo (ES) e Rio de Janeiro (RJ) onde foram coletadas amostras de *A. robusta*.

b) *Extração e quantificação de DNA*

O DNA total de operárias de *A. robusta* amostradas em cada colônia foi extraído conforme o protocolo descrito por Waldschmidt et al. (1997). A cabeça e o tórax de cada indivíduo foram macerados em nitrogênio líquido em *ependorf* de 1,5 mL. Foi adicionado 1000 µL de tampão de extração (CTAB 2%; NaCl 1,4 M; Tris-HCl 20 mM pH 8,0; EDTA 100 mM pH 8,0; e protease 40 µg/mL). As amostras foram incubadas a 65° C por 30 minutos. Foram realizadas duas desproteinizações com clorofórmio. O DNA extraído foi precipitado com um volume de isopropanol e incubado em freezer a – 20° C por pelo menos 2 horas. Os *pellets* de DNA obtidos foram lavados duas vezes com etanol 70% (200 µL) e secos à temperatura ambiente por uma hora. Em seguida o DNA de cada indivíduo foi ressuspendido em 100 µL de TE e armazenado a 4° C por 2 a 4 horas. A quantificação e a verificação da integridade do DNA extraído foram realizadas após a eletroforese em gel de agarose a 0,8%.

d) *Amplificação das regiões microsatélites*

Para a análise da variabilidade genética dos indivíduos amostrados de *A. robusta* (tabela 1) foram selecionados oito pares de *primers* microsatélites (Atro1, Atro3, Atro6, Atro7, Atro8, Atro9, Atro11 e Atro18). O *primer forward* (F) foi marcado com a cauda M13 em sua extremidade final 5'. A cauda M13 permite o pareamento da extremidade 5' do *primer F* com o *primer* universal M13 marcado com fluorescência FAM (6-carboxi-fluoresceína) ou HEX (hexacloro-6-carboxi-fluoresceína), gerando fragmentos marcados que são detectados pelo laser no sequenciador automático *MegaBace 1000*.

O DNA dos 80 indivíduos amostrados (um por colônia) ao longo da faixa de distribuição da espécie foi amplificado, segundo a metodologia proposta por Schuelke (2000) com modificações. Os eletroferogramas

obtidos foram analisados utilizando o programa MegaBACE *Fragment Profiler*.

A mistura de reação de 10 μ L consistiu de: 200 μ M de cada desoxirribonucleosídeo trifosfatado (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 0,1 μ M do primer F; 1,0 μ M do primer R; 1,0 μ M do primer M13; 1,5mM de MgCl₂; 0,5 unidades de *Taq* polimerase em tampão 1x e 10 ng de DNA total. O programa de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C por 3min, seguida por 10 ciclos a 94°C (15s), pareamento com temperatura específica para cada *primer* (20s) (Tabela 1) e 72°C (30s), e, posteriormente, 25 ciclos a 89°C (15s), 53°C (20s) e 72°C (30s). Foi feito ao final desses ciclos, um passo extra de alongação a 72°C por 30 min.

Tabela 1: Temperatura de anelamento dos oito pares de *primers* microssatélites utilizados neste estudo

Loco	Sequências dos <i>primers</i> (5'-3')	SSR	T (°C)
Atro1	F: 5'-GCAGCGCATCCCATTATATC-3' R: 5'-GTAGTGCAACAACGAAACGC-3'	(TA) ₃ TAAT(TA) ₃	65
Atro3	F: 5'-CACATAAGTCCCGAACGATG-3' R: 5'-GCGCTAAAATAAGCATCTCG-3'	(T ₈)C(T ₄)CC(ATA) ₃	65
Atro6	F: 5'-CTTCCAAGCAAGCGATTAGG-3' R: 5'-GACGAATAGAGCTTTCGTGC-3'	AT(A ₇)	57
Atro7	F: 5'-AGCGATTAGGAACAGGCAGG-3' R: 5'-AGAGCTTTCGTGCTCTAACG-3'	AT(A ₇)	60
Atro8	F: 5'-GCTCTCCCCCTTCCCTCTCG-3' R: 5'-AGGAAGGAGCCCGTTCGAGG-3'	(TG) ₃ CTG	62
Atro9	F: 5'-TAATTACGACAGCGTAAGCG-3' R: 5'-GGCTAAGAAAGTTAATCGAC-3'	(AT) ₃ AGT	60
Atro11	F: 5'-CGAATAGAGCTTTCGTGCTC-3' R: 5'-AATGAACTTCCAAGCAAGCG-3'	(T ₇)AT	60
Atro18	F: 5'-TCGACGATACTGCAGCATAC-3' R: 5'-ACCCTATCTATTGTCGGCTC-3'	(AG) ₃	61

e) Análises estatísticas

O programa Popgene versão 1.32 (Yeh et al., 1999) foi utilizado para calcular os seguintes estimadores de diversidade genética: porcentagem de locos polimórficos (P), número de alelos por loco,

heterozigosidades observada (H_o) e esperada não-viesada de Nei (Nei, 1973) (H_e). Estas análises foram realizadas considerando-se todas as 80 colônias amostradas e, posteriormente, agrupando-as em duas populações (Espírito Santo e Rio de Janeiro) ou 16 subpopulações (cada localidade amostrada). Para cada localidade foi testado o Equilíbrio de Hardy Weinberg (EHW) ao nível de 0,05 de significância.

O programa Popgene também foi utilizado para calcular a distância genética de Nei entre pares de colônias (Nei, 1978) e para analisar a estrutura genética das populações por meio da estatística F de Wright (Wright, 1978), considerando-se duas (Espírito Santo e Rio de Janeiro) ou 16 subpopulações (cada localidade amostrada).

As matrizes de distância genética obtidas foram submetidas a uma análise de agrupamento, utilizando-se o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages*) (programa GENES – Cruz, 2008). Adicionalmente, as matrizes foram submetidas a uma análise de variância molecular – AMOVA (Excoffier et al., 1992) para estudar a diversidade entre e dentro de populações em dois e três níveis hierárquicos. Os dois níveis hierárquicos possibilitaram o cálculo da variação entre e dentro de populações (colônias amostradas no Espírito Santo e no Rio de Janeiro). Os três níveis hierárquicos possibilitaram a análise de variação entre populações, entre subpopulações (colônias coletadas em cada localidade) dentro de populações, e dentro das subpopulações.

3. Resultados

Todos os oito locos analisados (Atro1, Atro3, Atro6, Atro7, Atro8, Atro9, Atro11 e Atro18) foram polimórficos e apresentaram alta variabilidade genética. As freqüências alélicas para os oito locos, nas duas populações e catorze subpopulações analisadas, encontram-se nos Anexos I e II, respectivamente. Ao se analisar as 80 colônias de *A. robusta* em conjunto, o número de alelos/loco variou de 7 a 24. A heterozigosidade observada variou de 0,27 a 0,80 nos locos analisados, enquanto a esperada variou de 0,30 a 0,83 (Tabela 2).

Tabela 2: Variabilidade genética estimada considerando-se as 80 colônias de *Atta robusta* analisadas

Loco	Número de alelos	H _o	H _e
Atro1	7	0,32	0,37
Atro3	24	0,43	0,81
Atro6	16	0,33	0,49
Atro7	14	0,78	0,72
Atro8	19	0,52	0,73
Atro9	26	0,61	0,83
Atro11	12	0,27	0,30
Atro18	13	0,80	0,76
Média	16,38	0,51	0,62

Agrupando-se as colônias em duas populações (Tabela 3), verificou-se que, na população do Espírito Santo, o número de alelos/loco variou de 6 a 22. Todos os oito locos se diferenciaram estatisticamente do esperado no equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P < 0,05$). A heterozigosidade observada variou de 0,22 a 0,70 nos locos analisados, enquanto a esperada variou de 0,30 a 0,85. Na população do Rio de Janeiro, o número de alelos/loco variou de 4 a 17. Cinco locos (Atro3, Atro7, Atro8, Atro9 e Atro18) se diferenciaram estatisticamente do esperado no equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P < 0,05$). A heterozigosidade observada variou de 0,32 a 0,97 nos locos analisados, enquanto a esperada variou de 0,29 a 0,81. A heterozigosidade média observada, quando se agrupou as colônias amostradas por localidade, pode ser observada na Tabela 3.

Tabela 3: Variabilidade genética estimada para as 80 colônias de *Atta robusta*, considerando-se os Estados do Espírito Santo e Rio de Janeiro em separado

População	Loco	N° alelos	H _o	H _e
ES	Atro1	6	0,29	0,39
	Atro3	17	0,47	0,79
	Atro6	10	0,30	0,49
	Atro7	11	0,70	0,72
	Atro8	17	0,57	0,78
	Atro9	22	0,61	0,85
	Atro11	6	0,22	0,30
	Atro18	9	0,64	0,72
Média		12,25	0,48	0,63
RJ	Atro1	4	0,38	0,32
	Atro3	13	0,38	0,81
	Atro6	12	0,37	0,50
	Atro7	9	0,88	0,70
	Atro8	10	0,44	0,63
	Atro9	17	0,60	0,77
	Atro11	7	0,32	0,29
	Atro18	9	0,97	0,76
Média		10,13	0,54	0,60

Tabela 4: Heterozigosidade média observada (H_o) e esperada (H_e) considerando-se as 16 subpopulações de *Atta robusta* analisadas

Subpopulação	H _o	H _e
(1) Aracruz	0,33	0,59
(2) São Mateus	0,48	0,52
(3) Itapemirim	0,46	0,61
(4) Linhares	0,58	0,58
(5) Marataízes	0,67	0,48
(6) Presidente Kennedy	0,49	0,53
(7) São Francisco de Itabapoana	0,34	0,22
(8) São João da Barra	0,58	0,47
(9) Campos de Goytacases	0,69	0,52
(10) Rio de Janeiro	0,42	0,48
(11) Rio das Ostras	0,56	0,45
(12) Cabo Frio	0,63	0,52
(13) Araruama	0,50	0,42
(14) Maricá	0,94	0,55

As análises de diferenciação genética considerando-se duas populações (Rio de Janeiro e Espírito Santo) revelaram baixo valor de F_{st} (0,01) sugerindo que as mesmas são geneticamente semelhantes. Isso pode ser também confirmado pelo valor de identidade (I : 0,97) e distância genética (D : 0,03). Os valores positivos de F_{is} (0,17) e de F_{it} (0,18) revelaram uma deficiência de heterozigotos em relação à população total (Tabela 5).

Tabela 5: Estimativa da estatística F de Wright considerando-se as duas populações de *Atta robusta*

Loco	F_{is}	F_{it}	F_{st}
Atro1	0,07	0,08	0,01
Atro3	0,47	0,47	0,01
Atro6	0,32	0,32	0,00
Atro7	-0,01	-0,10	0,01
Atro8	0,28	0,29	0,01
Atro9	0,25	0,26	0,01
Atro11	0,08	0,09	0,01
Atro18	-0,08	-0,06	0,02
Média	0,17	0,18	0,01

Tabela 6: Estimativa da estatística F de Wright considerando-se as 16 subpopulações de *Atta robusta* analisadas

Loco	F_{is}	F_{it}	F_{st}
Atro1	-0,34	-0,08	0,20
Atro3	0,27	0,55	0,38
Atro6	0,09	0,29	0,23
Atro7	-0,29	-0,05	0,19
Atro8	-0,15	0,11	0,23
Atro9	-0,10	0,16	0,24
Atro11	-0,49	-0,08	0,27
Atro18	-0,37	-0,05	0,24
Média	-0,15	0,14	0,25

Por outro lado, a avaliação da estatística F de Wright considerando-se as 14 subpopulações de *A. robusta* analisadas, revelou um alto valor de F_{st} (0,25) indicando que estas subpopulações são geneticamente diferentes (Tabela 6). O valor negativo de F_{is} (-0,15)

revelou um excesso de heterozigotos em relação às subpopulações. O positivo de F_{it} (0,14) indica uma deficiência de heterozigotos em relação à população total.

A análise de variância molecular (AMOVA) em dois níveis revelou que 2,80% da variação genética é devido a variações entre as populações do Espírito Santo e do Rio de Janeiro, enquanto que a restante (97,17%) é devido a variações existentes dentro das populações. A AMOVA em três níveis, por sua vez, indicou que 6,06% da variação genética total é explicada pela diversidade existente entre as populações; 12,95% é por causa da variação entre subpopulações dentro das populações e a maior parte da variação (80,98%) é devido a variações existentes entre colônias dentro das subpopulações.

O dendrograma, considerando-se as dezesseis subpopulações de *A. robusta* analisadas, não demonstrou a existência de grupos de acordo com a localização geográfica das colônias (Espírito Santo e Rio de Janeiro) (Figura 2). Observou-se, entretanto, a formação de um clado principal composto pelas colônias provenientes de Marataízes/ES, São João da Barra/RJ, Aruarama/RJ, Maricá/RJ, Presidente Kennedy/ES, São Francisco de Itabapoana/RJ, Linhares/ES e Rio de Janeiro/RJ. Vale ressaltar a proximidade genética detectada entre as colônias provenientes de Presidente Kennedy e São Francisco de Itabapoana, que são duas localidades geograficamente próximas, localizadas entre as divisas dos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo. As colônias provenientes de São Mateus e Itapemirim, ambas do Espírito Santo também apresentaram grande proximidade genética, formando um clado próximo ao clado principal.

O agrupamento obtido com base nas distâncias genéticas entre as 80 colônias amostradas, também não evidenciou a formação de clados de acordo com a proximidade geográfica das mesmas (localidade amostrada), o que indica que as colônias não estão estruturadas geograficamente. Entretanto, como no caso da análise anterior, observou-se a formação de quatro clados maiores. O clado 1 foi formado por

algumas das colônias provenientes de Linhares/ES, São Mateus/ES, Maricá/RJ, Araruama/RJ, Itapemirim/ES, Marataízes/ES, Aracruz/ES, Rio de Janeiro/RJ, São João da Barra/ RJ, Campos de Goytacases/RJ, Cabo Frio/RJ, São Francisco de Itabapoana/RJ e Presidente Kennedy/ES. O clado 2, geneticamente mais próximo de 1, é formado por colônias provenientes de Aracruz/ES, Itapemirim/ES, Rio de Janeiro/RJ, São Mateus/ES. O clado 3, mais próximo de 2, é formado por colônias do Rio de Janeiro/RJ, Aracruz/ES, Presidente Kennedy/ES e São Mateus/ES. O clado 4 agrupou colônias provenientes de Aracruz/ES, Rio das Ostras/RJ, Itapemirim/ES, Presidente Kennedy/ES, São Francisco de Itabapoana/RJ, Marataízes/ES e São Mateus/ES. O clado 5, mais distante, agrupou as demais colônias provenientes de Aracruz/ES, São Mateus/ES, São João da Barra/RJ e Rio de Janeiro/RJ. Esses agrupamentos com colônias do Espírito Santo e Rio de Janeiro no mesmo clado indicam a similaridade genética entre as colônias existentes nesses dois Estados.

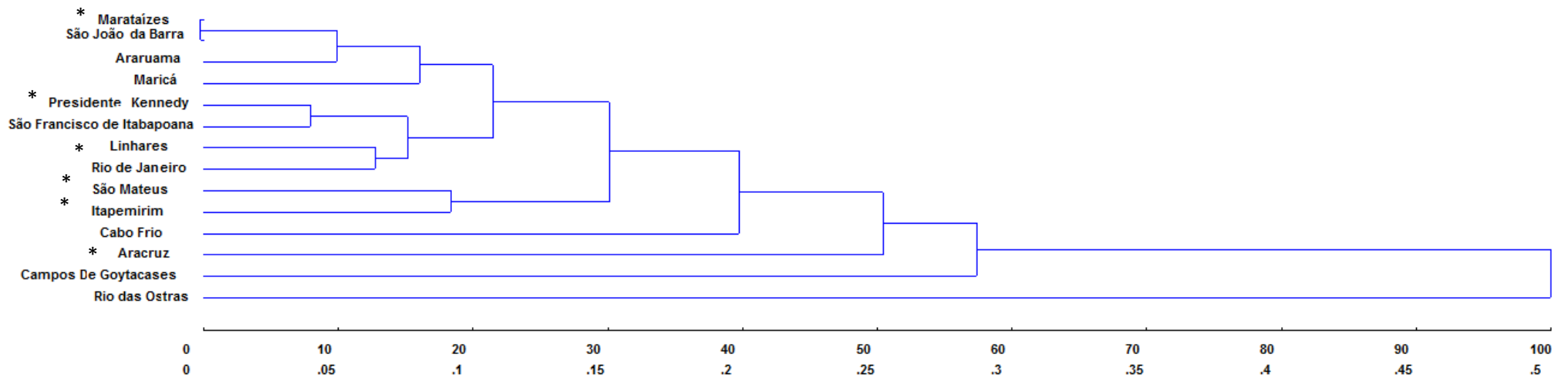


Figura 2: Dendrograma gerado por UPGMA com base nas distâncias genéticas de Nei (1978) entre as 14 subpopulações de *Atta robusta* analisadas. As localidades amostradas no Espírito Santo estão com um asterisco.

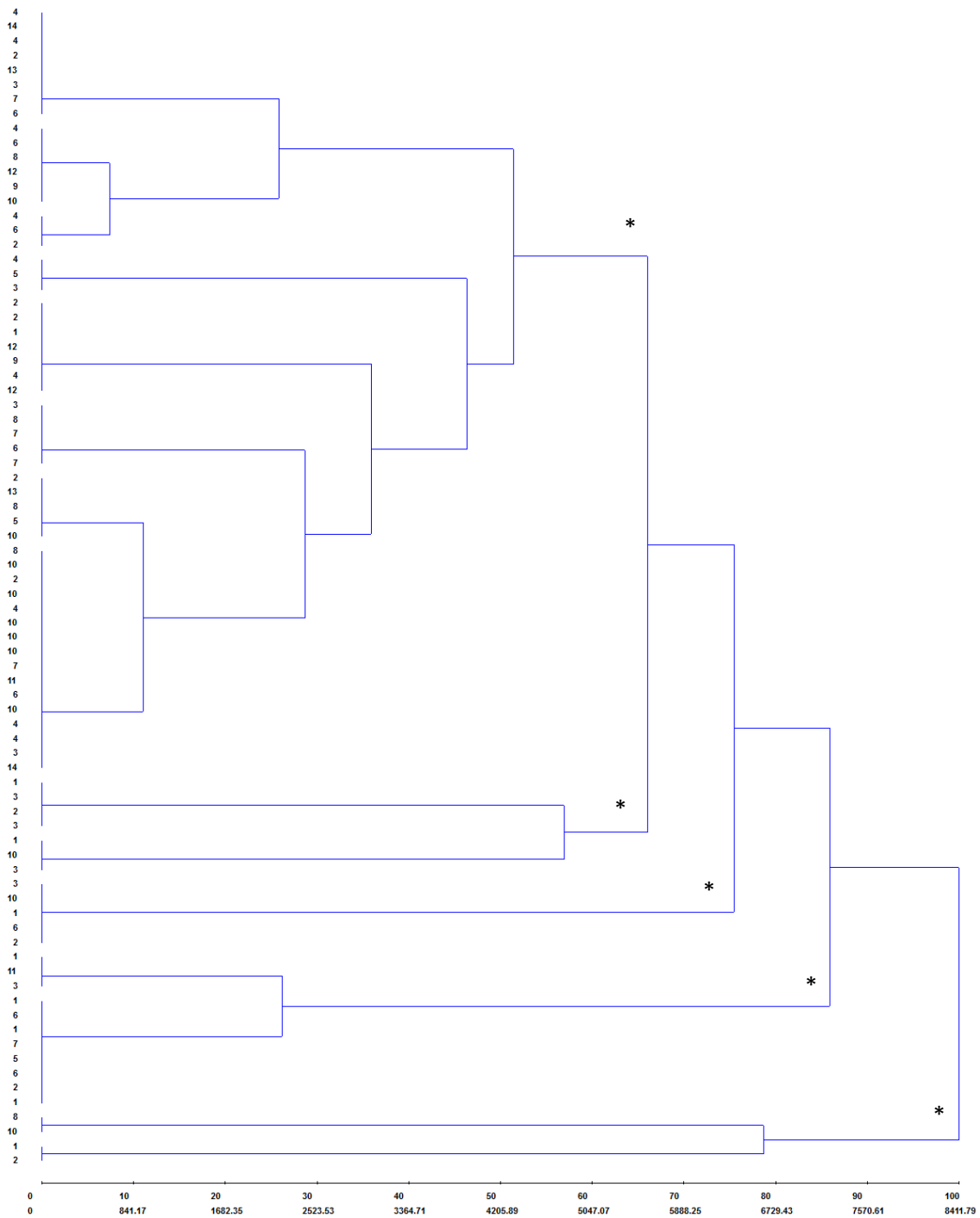


Figura 3: Dendrograma, gerado por UPGMA, com base nas distâncias genéticas de Nei (1978) entre as 80 colônias de *A. robusta* analisadas (1 – Aracruz; 2 – São Mateus; 3 – Itapemirim; 4 – Linhares; 5 – Marataízes; 6 – Presidente Kennedy; 7 – São Francisco de Itabapoana; 8 – São João da Barra; 9 – Campos de Goytacases; 10 – Rio de Janeiro; 11 – Rio das Ostras; 12 – Cabo Frio; 13 – Araruama; 14 – Maricá). Os asteriscos indicam os cinco clados principais formados.

*

4. Discussão

As populações do Espírito Santo e Rio de Janeiro de *A. robusta* estudadas apresentaram uma alta variabilidade genética, o que pode ser devido ao uso de *primers* microssatélites espécie-específicos. Com relação ao número de alelos por loco, os valores obtidos no presente trabalho se assemelham àqueles encontrados por Helmkampf et al. (2008) e Gyllenstrand & Seppä (2003) para *A. colombica* e *Formica lugubris*, respectivamente, em trabalhos que também utilizaram *primers* microssatélites específicos. Já a heterozigosidade média observada (0,51) foi menor do que a encontrada por Helmkampf et al. (2008) ao estudar *A. colombica* (0,81). Assim, os resultados obtidos indicam que *A. robusta*, uma espécie ameaçada e endêmica, apresenta diversidade genética comparável a de *A. colombica*, que é uma espécie relacionada não ameaçada, com grande tamanho populacional.

As análises realizadas também evidenciaram desvios nas frequências alélicas esperadas, para todos os locos. Isto evidencia, juntamente com os valores de F_{is} que estas populações apresentam um excesso de homozigotos. Estes desvios podem ser explicados pelo pequeno tamanho amostral, o que levou a não detecção de alguns alelos e combinações genotípicas, uma vez que se utilizou um indivíduo/colônia amostrada, ao longo da faixa de distribuição de *A. robusta*.

Considerando-se as colônias amostradas em cada uma das 14 localidades, como uma subpopulação, verificou-se que elas estão altamente estruturadas devido à diversidade genética entre os indivíduos amostrados. As localidades amostradas em um mesmo estado apresentaram diferentes números de alelos em cada loco e, ao se comparar os tipos de alelos observados/loco, verificou-se que elas compartilham poucos alelos entre si.

Apesar disto, a análise de agrupamento não evidenciou a formação de clados contendo apenas colônias de localidades geograficamente

próximas, o que pode ser explicado pelo fato de colônias provenientes tanto do Rio de Janeiro como do Espírito Santo compartilharem alelos.

Por outro lado, quando se considerou as 80 colônias amostradas, não se verificou estruturação (F_{ST} : 0,01) e nem agrupamento de colônias de acordo com a localidade de origem das mesmas. Isto confirma que geneticamente as populações do Espírito Santo e Rio de Janeiro são homogêneas.

Adicionalmente, a AMOVA confirmou, nas duas análises, que a maior parte da variabilidade genética encontrada era devido às diferenças entre indivíduos dentro das subpopulações.

Apesar da fragmentação do habitat e da deriva genética contribuir para aumentar a diferenciação genética entre as subpopulações (Viginier et al., 2004), os resultados obtidos no presente trabalho indicam que a fragmentação da restinga, por enquanto, não teve o efeito de estruturar as colônias amostradas. Entretanto, torna-se preocupante a conservação deste habitat uma vez que os principais fatores que contribuem para extinção estão direta ou indiretamente relacionados aos impactos humanos (Frankham et al., 2008).

A restinga do Rio de Janeiro, por exemplo, tem sido degradada de diversas formas como a remoção da vegetação para desenvolvimento imobiliário, o estabelecimento de espécies vegetais exóticas, alteração do substrato original e a coleta seletiva de espécies vegetais de interesse paisagístico (Rocha et al., 2007). Esta fragmentação pode levar à perda da variabilidade genética e ocasionar um declínio no tamanho populacional, aumentando a endogamia (Sanetra & Crozier, 2003; Mäki-Petäys et al., 2005). Estes fatores em conjunto podem levar à extinção de espécies, uma vez que ocasionam uma redução em sua habilidade de se adaptar e evoluir às mudanças ambientais (Frankham et al., 2008).

Em conclusão, os resultados obtidos indicam que as colônias de *A. robusta* amostradas, tanto no Rio de Janeiro como no Espírito Santo, apresentam alta variabilidade genética e que as mesmas não estão estruturadas. Entretanto, considerando-se o endemismo e a ameaça à

extinção de *A. robusta*, para conservá-la será necessário a manutenção do maior número possível de colônias nas regiões de restinga destes dois Estados.

5. Referências Bibliográficas

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. **Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data.** Genetics, 131: 479 – 491, 1992.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos da Genética da Conservação.** Ribeirão Preto, Editora Sociedade Brasileira de Genética, 280 p., 2008.

CRUZ, C. D. **Programa Genes - Diversidade Genética.** 1. ed. Viçosa, Editora UFV, v. 1., 278 p., 2008.

GONÇALVES, C. R. **Distribuição, biologia e ecologia das saúvas.** Div. Agron., 1: 2 – 10, 1960.

GYLLENSTRAND, N.; SEPPA, P. **Conservation genetics of the wood ant, *Formica lugubris*, in a fragmented landscape.** Mol. Ecol., 12: 2931-2940, 2003.

HELMKAMPF, M.; GADAU, J.; FELDHAAR, H. **Population and sociogenetic structure of the leaf-cutter ant *Atta colombica* (Formicidae, Myrmecinae).** Insect. Soc., 55: 434 – 442, 2008.

HOLLDÖBLER, B; WILSON, E. O. **The Ants.** Belknap Press, Cambridge, 732 pp., 1990.

MACHADO, A. B. M.; MARTINS, C. S.; DRUMMOND, G. M. **Lista da Fauna Ameaçada de Extinção: Incluindo as Listas das Espécies Quase Ameaçadas e Deficientes em Dados.** Belo Horizonte. Fundação Biodiversitas, 160 pp., 2005.

MÄKI-PETAYS, H.; ZAKHAROV, A.; VILJAKAINEN, L.; CORANDER, J.; PAMILO, P. **Genetic changes associated to declining populations of**

***Formica* ants in fragmented forest landscape.** Mol. Ecol., 14: 733 – 742, 2005.

NEI, M. **The theory and estimation of genetic distance.** In: Genetic Structure of Populations. University Hawaii Press, Honolulu. 1973.

NEI, M. **Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals.** Genetics, 89: 583 – 590, 1978.

ROCHA, C. F. D.; BERGALLO, H. G.; VAN SLUYS, M.; ALVES, M.A.S.; JAMEL, C. E. **The remnants of restinga habitats in the brazilian Atlantic Forest of Rio de Janeiro state, Brazil: Habitat loss and risk of disappearance.** Braz. J. Biol., 67 (2): 263 – 273, 2007.

SANETRA, M. & CROZIER, R. H. **Patterns of population subdivision and gene flow in the ant *Nothomyrmecia macrops* reflected in microsatellite and mitochondrial DNA markers.** Mol. Ecol., 12: 2281 – 2295, 2003.

SCHUELKE, M. **An economic method for the fluorescence labeling of PCR fragments.** Nat. Biotechnol., v.18, 233:234, 2000.

TEIXEIRA, M.C.; SCHOEREDER, J.H.; MAYHÉ-NUNES, A. J. **Geographic Distribution of *Atta robusta* Borgmeier (Hymenoptera: Formicidae).** Neotrop. Entomol., 32 (4): 719-721, 2003.

TEIXEIRA, M.C.; SCHOEREDER, J.H.; LOUZADA, J.N.C.; LOUZADA, J.N.C. **Occurrence of *Atta robusta* Borgmeier (Hymenoptera: Formicidae) in the North of Espírito Santo State.** Neotrop. Entomol., 33 (2): 265-266, 2004.

WALDSCHMIDT, A.M.; SALOMÃO, T.M.F.; BARROS, E.G.; CAMPOS, L.A.O. **Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae).** Braz. J. Genet., 20:421-423, 1997.

WRIGHT, S. **Variability within and among natural populations.** The University of Chicago Press, Chicago, 1978.

YEH, F.C.; YANG, R., BOYLE T. **POPGENE Version 1.32 Microsoft Windows-based freeware for populations genetic analysis.** Quick user Guide, 1999.

Conclusões Gerais

- Onze dos vinte pares de *primers* microssatélites desenhados para *Atta robusta* foram altamente polimórficos;
- As populações de *A. robusta* analisadas apresentaram alta variabilidade genética;
- As populações do Espírito Santo e Rio de Janeiro são geneticamente similares;
- Considerando-se o endemismo e a ameaça à extinção de *A. robusta*, para conservá-la será necessária a manutenção do maior número possível de colônias nas regiões de restinga do Espírito Santo e Rio de Janeiro.

ANEXO I

Tabela 1: Alelos observados e suas frequências em cada loco microssatélite analisado na população do estado do Espírito Santo. Os alelos exclusivos desta população estão marcados com um asterisco

Loco								
Alelos	Atro1	Atro3	Atro6	Atro7	Atro8	Atro9	Atro11	Atro18
A	0,06*	0,23	0,01	0,05	0,04*	0,03*	0,04*	
B	0,07	0,03	0,01	0,38	0,02	0,06*		0,38
C	0,04					0,02		0,20
D		0,02		0,02*	0,02*	0,02	0,02*	0,01
E	0,77		0,01*	0,05	0,03*	0,03		0,01*
F		0,03*	0,02*	0,07	0,02	0,02		0,02*
G	0,03*				0,04*	0,03	0,02*	
H	0,03*			0,01*		0,05	0,04*	0,30
I			0,01*		0,02*	0,03		
J		0,02*	0,70		0,03*			0,02*
K		0,03*	0,13	0,01	0,02*	0,02*		
L		0,09*	0,01*	0,02*	0,02		0,83*	
M		0,02	0,07	0,36	0,02	0,03	0,05*	0,05
N		0,02*	0,03	0,02*	0,07	0,02		0,01*
O				0,01*	0,43			
P					0,02	0,02*		
Q		0,02			0,14	0,05		
R		0,03*			0,03*	0,11*		
S		0,02*			0,03*	0,03		
T		0,03*				0,02*		
U		0,38						
V		0,01*				0,34		
W		0,01*				0,02		
X						0,03*		
Y						0,01*		
Z		0,01*				0,01*		

ANEXO I

Tabela 2: Alelos observados e suas frequências em cada loco microssatélite analisado na população do estado do Rio de Janeiro. Os alelos exclusivos desta população estão marcados com um asterisco

Loco								
Alelos	Atro1	Atro3	Atro6	Atro7	Atro8	Atro9	Atro11	Atro18
A		0.24	0.01	0.08				0.15*
B	0.02	0.15	0.01	0.28	0.03		0.03*	0.23
C	0.15	0.02*	0.02*		0.03*	0.04		0.12
D	0.02*	0.10	0.02*			0.02		0.02
E	0.81	0.03*		0.02		0.02	0.05*	
F				0.06	0.06	0.02	0.02*	
G		0.02*	0.03*	0.02*		0.02		0.02*
H		0.02*	0.02*		0.05*	0.02		0.38
I		0.02*		0.02*		0.04	0.02*	0.01*
J			0.70	0.03*		0.04*	0.02*	
K			0.08	0.04				
L					0.03	0.02*	0.84	0.01*
M		0.02	0.05	0.45	0.03	0.04		0.06
N			0.02		0.05	0.02	0.02*	
O		0.02*	0.02*		0.58	0.02*		
P		0.03*	0.02*		0.03			
Q		0.02			0.11	0.06		
R								
S						0.06		
T								
U		0.31				0.06*		
V						0.46		
W						0.04		
X								
Y								
Z								

ANEXO II

Tabela 3: Alelos observados e suas freqüências em cada loco microsatélite analisado nas 14 subpopulações de *A. robusta*

Subpopulação	Loco							
	Atro1	Atro3	Atro6	Atro7	Atro8	Atro9	Atro11	Atro18
Aracruz	A: 0,29 B: 0,14 E: 0,43 H: 0,14	F: 0,25 L: 0,50 U: 0,25	I: 0,06 J: 0,56 K: 0,13 L: 0,06 M: 0,06 N: 0,13	A: 0,08 B: 0,50 F: 0,07 H: 0,07 L: 0,07 M: 0,07 N: 0,07 O: 0,07	A: 0,08 E: 0,08 N: 0,08 O: 0,42 Q: 0,08 R: 0,17 S: 0,09	A: 0,06 B: 0,06 C: 0,06 G: 0,13 H: 0,06 K: 0,06 R: 0,19 V: 0,31 Z: 0,07	L: 1,00	B: 0,69 C: 0,13 D: 0,06 H: 0,12
São Mateus	C: 0,07 E: 0,86 G: 0,07	A: 0,60 N: 0,10 Q: 0,10 U: 0,10 W: 0,10	J: 0,89 K: 0,05 M: 0,06	B: 0,38 D: 0,12 E: 0,12 M: 0,38	G: 0,25 L: 0,13 M: 0,12 O: 0,38 Q: 0,12	R: 0,25 V: 0,25 X: 0,50	G: 0,25 L: 0,75	B: 0,30 C: 0,40 H: 0,20 M: 0,10
Itapemirim	C: 0,07 E: 0,93	A: 0,30 B: 0,20 R: 0,20 S: 0,10 U: 0,20	B: 0,08 F: 0,09 J: 0,58 K: 0,25	A: 0,06 B: 0,38 E: 0,13 K: 0,06 L: 0,06 M: 0,31	A: 0,10 E: 0,10 I: 0,10 K: 0,10 N: 0,20 O: 0,30 Q: 0,10	B: 0,08 F: 0,08 H: 0,17 M: 0,17 N: 0,08 Q: 0,08 T: 0,09 V: 0,25	A: 0,17 L: 0,83	B: 0,42 C: 0,33 H: 0,17 M: 0,08

Tabela 2: Continuação

Subpopulação	Loco							
	Atro1	Atro3	Atro6	Atro7	Atro8	Atro9	Atro11	Atro18
Linhares	C: 0,07 E: 0,93	A: 0,33 L: 0,06 M: 0,05 U: 0,56	A: 0,06 J: 0,69 K: 0,13 M: 0,12	A: 0,05 B: 0,28 F: 0,11 M: 0,56	F: 0,10 J: 0,20 O: 0,40 P: 0,10 Q: 0,20	A: 0,07 B: 0,07 D: 0,07 I: 0,14 P: 0,07 Q: 0,14 V: 0,29 W: 0,07 Y: 0,08	D: 0,08 H: 0,17 L: 0,67 M: 0,08	B: 0,25 C: 0,17 F: 0,08 H: 0,42 M: 0,08
Marataízes	B: 0,50 E: 0,50	D: 0,17 K: 0,33 U: 0,33 Z: 0,17	J: 0,67 K: 0,16 M: 0,17	B: 0,50 F: 0,17 M: 0,33	O: 0,50 Q: 0,50	R: 0,50 V: 0,50	L: 1,00	B: 0,50 H: 0,50
Presidente Kennedy	B: 0,10 E: 0,80 G: 0,10	J: 0,09 L: 0,08 T: 0,17 U: 0,58 V: 0,08	E: 0,10 J: 0,70 K: 0,10 M: 0,10	A: 0,06 B: 0,38 F: 0,06 M: 0,50	B: 0,09 D: 0,09 N: 0,08 O: 0,58 Q: 0,08 S: 0,08	B: 0,08 E: 0,17 R: 0,08 S: 0,17 V: 0,50	L: 0,86 M: 0,14	B: 0,15 C: 0,07 E: 0,07 H: 0,57 J: 0,07 N: 0,07
São Francisco de Itabapoana	B: 0,17 E: 0,83	B: 0,30 D: 0,10 E: 0,20 P: 0,10 U: 0,30	J: 0,75 M: 0,13 N: 0,12	B: 0,40 F: 0,10 M: 0,50	L: 0,17 N: 0,16 O: 0,67	F: 0,10 L: 0,10 Q: 0,10 S: 0,20 U: 0,10 V: 0,40	E: 0,10 L: 0,90	A: 0,30 C: 0,20 D: 0,10 H: 0,40

Tabela 2: Continuação

Subpopulação	Loco							
	Atro1	Atro3	Atro6	Atro7	Atro8	Atro9	Atro11	Atro18
São João da Barra	C: 0,25 E: 0,75	A: 0,20 B: 0,10 C: 0,10 D: 0,20 G: 0,10 O: 0,10 U: 0,20	J: 0,88 O: 0,12	B: 0,30 F: 0,10 G: 0,10 K: 0,10 M: 0,40	O: 0,50 Q: 0,50	Q: 0,25 V: 0,75	L: 1,00	A: 0,10 B: 0,30 C: 0,10 H: 0,40 M: 0,10
Campos de Goytacases	C: 0,25 E: 0,75	U: 1,00	A: 0,25 B: 0,25 J: 0,50	B: 0,25 J: 0,50 M: 0,25	B: 0,25 N: 0,25 O: 0,50	C: 0,25 M: 0,25 U: 0,25 V: 0,25	B: 0,50 L: 0,50	A: 0,25 C: 0,25 H: 0,50
Rio de Janeiro	C: 0,06 D: 0,06 E: 0,88	A: 0,44 D: 0,19 P: 0,06 Q: 0,06 U: 0,25	G: 0,10 J: 0,85 K: 0,05	A: 0,23 B: 0,18 F: 0,05 M: 0,54	F: 0,17 M: 0,08 O: 0,75	C: 0,06 E: 0,05 G: 0,06 M: 0,05 N: 0,06 O: 0,05 V: 0,56 W: 0,11	F: 0,05 L: 0,90 N: 0,05	A: 0,09 B: 0,32 C: 0,09 G: 0,05 H: 0,32 I: 0,04 M: 0,09

Tabela 2: Continuação

Subpopulação	Loco							
	Atro1	Atro3	Atro6	Atro7	Atro8	Atro9	Atro11	Atro18
Rio das Ostras	C: 0,25 E: 0,75	B: 1,00	J: 0,50 K: 0,50	B: 0,25 K: 0,25 M: 0,50	C: 0,50 P: 0,50	D: 0,25 H: 0,25 I: 0,50	I: 0,25 L: 0,75	A: 0,25 C: 0,25 H: 0,50
Cabo Frio	C: 0,17 E: 0,83	A: 0,50 M: 0,17 U: 0,33	J: 0,83 P: 0,17	B: 0,50 K: 0,17 M: 0,33	H: 0,50 O: 0,25 Q: 0,25	J: 0,50 S: 0,25 V: 0,25	B: 0,50 L: 0,50	A: 0,33 B: 0,17 H: 0,50
Araruama	E: 1,00	A: 0,50 H: 0,25 U: 0,25	D: 0,25 J: 0,50 M: 0,25	B: 0,50 I: 0,25 M: 0,25	O: 0,50 Q: 0,50	V: 1,00	E: 0,25 L: 0,75	B: 0,50 H: 0,25 L: 0,25
Maricá	C: 0,25 E: 0,75	B: 0,25 I: 0,25 U: 0,50	H: 0,25 J: 0,25 K: 0,25 M: 0,25	F: 0,50 M: 0,50	O: 0,50 Q: 0,50	Q: 0,50 V: 0,50	E: 0,50 L: 0,50	B: 0,50 H: 0,25 M: 0,25

