



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

Variabilidade Genética de *Dinoponera quadriceps* Santschi
(Hymenoptera: Formicidae): Filogeografia de uma Espécie
Endêmica do Semiárido Nordestino

CÍNTIA BRITO DE SOUZA GALHEIGO

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Zoologia, Universidade
Estadual de Feira de Santana, para
obtenção do título de *Mestre em Zoologia*.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

Variabilidade Genética de *Dinoponera quadriceps* Santschi
(Hymenoptera: Formicidae): Filogeografia de uma Espécie
Endêmica do Semiárido Nordestino

CÍNTIA BRITO DE SOUZA GALHEIGO

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Marcos de Mendonça Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Eddy José Francisco de Oliveira

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Zoologia, Universidade
Estadual de Feira de Santana, para
obtenção do título de *Mestre em Zoologia*.

Feira de Santana-BA
2011

Ficha catalográfica: Biblioteca Central Julieta Carteado

Galheigo, Cíntia Brito de Souza

G155v Variabilidade genética de *Dinoponera quadriceps* Santschi (Hymenoptera: Formicidae): filogeografia de uma espécie endêmica do semiárido nordestino / Cíntia Brito de Souza Galheigo. – Feira de Santana - BA, 2011.

67 f. : il.

Orientador: Gilberto Marcos de Mendonça Santos

Co-orientador: Eddy José Francisco de Oliveira

Dissertação (Mestrado em Zoologia)– Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, 2011.

1. Ponerinae. 2. Caatinga. 3. DNA mitocondrial. I. Santos, Gilberto Marcos de Mendonça. II. Oliveira, Eddy José Francisco de. III. Universidade Estadual de Feira de Santana. IV. Departamento de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 595.796

CÍNTIA BRITO DE SOUZA GALHEIGO

Variabilidade Genética de *Dinoponera quadriceps* Santschi
(Hymenoptera: Formicidae): Filogeografia de uma Espécie
Endêmica do Semiárido Nordestino

Feira de Santana, Bahia, 17/02/2011

Dr. Eddy José Francisco de Oliveira - UEFS
(Examinador – Presidente da Banca)

Dr. Ademilson Espencer Egea Soares
(Examinador)

Dra. Reyjane Patrícia de Oliveira
(Examinadora)

Caminhos do Coração

Há muito tempo que eu saí de casa
Há muito tempo que eu caí na estrada
Há muito tempo que eu estou na vida
Foi assim que eu quis, e assim eu sou feliz

Principalmente por poder voltar
A todos os lugares onde já cheguei
Pois lá deixei um prato de comida
Um abraço amigo, um canto prá dormir e sonhar

E aprendi que se depende sempre
De tanta, muita, diferente gente
Toda pessoa sempre é as marcas
Das lições diárias de outras tantas pessoas

E é tão bonito quando a gente entende
Que a gente é tanta gente onde quer que a gente vá
E é tão bonito quando a gente sente
Que nunca está sozinho por mais que pense estar

É tão bonito quando a gente pisa firme
Nessas linhas que estão nas palmas de nossas mãos
É tão bonito quando a gente vai à vida
Nos caminhos onde bate, bem mais forte o coração

E aprendi ...

Gonzaguinha

*Dedico este trabalho ao meu esposo
Guilherme pelo incentivo, compreensão,
companheirismo e amor.*

AGRADECIMENTOS

- ✓ À Universidade Estadual de Feira de Santana–UEFS e ao PPGZoo-UEFS, pela formação e oportunidades;
- ✓ À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia-FAPESB, pela concessão da minha bolsa de pesquisa e pelo financiamento do projeto “Estudo da Variabilidade Genética de Populações de *Dinoponera quadriceps* uma Espécie Endêmica do Semiárido Nordestino”, através do Edital: FAPESB Edital Semi-árido Pedido N. 8018/2007, coordenado pelo Prof. Dr. Gilberto Marcos de Mendonça Santos (orientador).
- ✓ Ao CNPq, pelo apoio financeiro através do Edital MCT/CNPq/CT-Infra/CT-Petro/Ação Transversal IV Nº 16/2008, Processo: 620021/2008-0 Projeto de Cooperação e Consolidação de Pesquisas em Biologia, Ecologia, Conservação e Sistemática de Insetos Sociais (Hymenoptera) entre grupos de pesquisa em insetos sociais do Programa de Pós-Graduação em Zoologia-PPGZOO (UEFS) e Programa de Pós-Graduação em Zoologia-PPGZOO (USP);
- ✓ Ao Laboratório de Entomologia-LENT, onde realizei o meu trabalho e contei com a amizade, apoio e incentivo dos professores, funcionários e estagiários;
- ✓ Ao Laboratório de Biologia Molecular de Plantas-LAMOL, onde realizei o sequenciamento das amostras, especialmente ao Prof. Dr. Cássio van Den Berg (coordenador), pelo apoio logístico e ao funcionário Ricardo Vilas Boas pela solicitude e por me ensinar as primeiras técnicas moleculares;
- ✓ Aos amigos que enviaram amostras e ajudaram na coleta de *D. quadriceps*: Prof. Yves Quinet, Janete, Emerson, Murilo, Juliano, Leonardo, Patrícia, Mazinho....;
- ✓ Ao meu orientador, Prof. Dr. Gilberto de Mendonça Santos, pela paciência, oportunidades, incentivo e ensinamentos;
- ✓ Ao Prof. Dr. Eddy José Francisco de Oliveira, pela amizade, orientação e treinamento nas técnicas moleculares;
- ✓ Ao Prof. Dr. Carlos Costas Bichara Filho, exemplo de honestidade e ética, foi ele que me acolheu com muito carinho quando fui pedir estágio no LENT, sendo meu orientador durante dois anos, com ele aprendi a amar a Entomologia;
- ✓ À Profa. Dra. Cândida Maria de Aguiar Mendonça, pelos conselhos, oportunidades e capacitação na prática docente;

- ✓ À funcionária Janete Jane Resende pela amizade, por aliviar com palavras certas meus momentos de desespero e angústia e por me contagiar com seu amor pelas formigas;
- ✓ À Geane pela amizade e por enfrentar, junto comigo, momentos difíceis no Laboratório;
- ✓ À Profa. Vinina pelas dicas e ensinamentos durante o tempo que estive no LENT;
- ✓ À funcionária Patrícia Luiza por sua solicitude, amizade e incentivo;
- ✓ Aos alunos e amigos do PPGBot-UEFS, Tarciso, Maria Cristina (Cris) e Paulo Ricardo, pelas dicas e aconselhamentos durante a fase de sequenciamento das amostras;
- ✓ À grande amiga Uiara Catharina, que foi meu anjo da guarda na fase de análise dos dados, me ajudando com os programas de análise filogenética, e também pela amizade e companheirismo desde a graduação;
- ✓ À Monique pela amizade sincera e por compartilhar comigo momentos tensos e felizes na graduação e no mestrado;
- ✓ Aos colegas e amigos de turma do mestrado PPGZoo-UEFS, por todos os momentos que compartilhamos juntos;
- ✓ À Eliomar (Mazinho) pelas fotos da espécime de *D. quadriceps* (operária e macho).
- ✓ E por fim, mas não menos especiais, aos meus pais José e Zorildes, pelo apoio, incentivo, amor incondicional e por terem me ensinado valores tão importantes, como honestidade, persistência e humildade; aos meus irmãos Débora e, especialmente, Volnei que compartilhou comigo todos os momentos que passei desde a graduação e que é para mim é um exemplo de dedicação e esforço; ao meu esposo Guilherme e sua família, por tudo.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	Genética e Conservação	14
1.2	Utilização de marcadores moleculares em estudos populacionais.....	15
1.3	Estudos utilizando marcadores moleculares em Formicidae.....	17
1.4	Aspectos da biologia de <i>Dinoponera quadriceps</i>	19
2	OBJETIVOS	23
2.1	Objetivo Geral.....	23
2.2	Objetivos Específicos.....	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1	Material Biológico	24
3.2	Extração e amplificação do DNA	27
3.3	Digestão do produto de PCR com Enzimas de Restrição	29
3.4	Sequenciamento do DNA	30
3.5	Análises das Sequências.....	31
3.6	Análises populacionais e filogeográficas.....	32
4	RESULTADOS	35
4.1	Amplificação dos genes.....	35
4.2	Variabilidade com a utilização de RFLP+PCR	37
4.3	Variabilidade do Gene COI	39
5	DISCUSSÃO	49
5.1	PCR+RFLP do DNA Mitocondrial	49
5.2	Análises do sequenciamento parcial do gene COI.....	51
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Operária de <i>Dinoponera quadriceps</i> Santschi 1921	20
Figura 2: Distribuição geográfica das 17 populações de <i>D. quadriceps</i>	26
Figura 3: Genes do mtDNA utilizados para verificar a variabilidade genética de <i>D. quadriceps</i>	27
Figura 4: Eletroforese em gel de agarose (2%) mostrando a amplificação diferenciada da região intergênica COI/COII do mtDNA de seis populações de <i>Dinoponera quadriceps</i>	35
Figura 5: Eletroforese em gel de agarose (2%) mostrando a amplificação do fragmento de 500pb do gene COI do mtDNA de quatro populações <i>Dinoponera quadriceps</i>	36
Figura 6: Sítios Variáveis dos 22 haplótipos de <i>D. quadriceps</i> , referentes ao fragmento de 473pb do gene COI.....	41
Figura 7: Rede de Haplótipos do gene COI da espécie <i>D. quadriceps</i>	44
Figura 8: Consenso estrito das 10.000 árvores mais parcimoniosas obtidas através da Máxima Parcimônia (MP) com base nas sequências de COI... ..	46
Figura 9: Consenso de maioria (50%) produzida na Inferência Bayesiana (IB) com base nas sequências de COI.....	45
Figura 10: Gráfico representativo do teste de Mantel das sequências de COI de <i>D. quadriceps</i> : correlação entre as distâncias geográficas e genéticas.	486

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Indivíduos de <i>D. quadriceps</i> analisadas e suas respectivas localidades e coordenadas geográficas.....	25
Tabela 2: Condições de PCR e pares de primers testados para a amplificação do mtDNA de <i>Dinoponera quadriceps</i> . São mostrados: par de primers; principais genes contidos no fragmento; temperaturas de anelamento (TA); tamanho aproximado (em pares de bases) do produto amplificado e referências dos primers.....	28
Tabela 3: Enzimas de restrição utilizadas na digestão do mtDNA de <i>D. quadriceps</i> e seus respectivos sítios de restrição (/ indica o local de corte)	29
Tabela 4: Padrões de clivagem das enzimas de restrição* utilizados na digestão da região correspondente ao gene citocromo oxidase I-COI (473pb) de <i>D. quadriceps</i>	37
Tabela 5: Frequência dos haplótipos do fragmento do gene COI em populações de <i>D. quadriceps</i>	40
Tabela 6: Diversidade genética das populações de <i>D. quadriceps</i>	42
Tabela 7: Valores dos testes de neutralidade seletiva calculado entre as populações e para os haplo-grupos I e II de <i>D. quadriceps</i> propostos pela Rede de Haplótipo (Fig.7).	45
Tabela 8: Análise da variância molecular – AMOVA (Excoffier <i>et al.</i> , 1992) considerando como populações os indivíduos agrupados na árvore de IB (Figura 9).	48

RESUMO

Dinoponera quadriceps Santschi 1921 (Formicidae: Ponerinae) é endêmica da região nordeste do Brasil. São formigas relativamente grandes, cujas operárias chegam a medir cerca de 3 cm de comprimento e não apresentam diferenças morfológicas entre as castas. Nesta espécie a reprodução é feita por operárias fertilizadas conhecidas como “gamergates”. Este estudo se propôs a estudar a variabilidade genética através DNA mitocondrial para elucidação do padrão de distribuição geográfica da espécie. Os resultados com PCR+RFLP mostraram baixa variabilidade e não apresentaram consistência para os padrões micro e macrogeográficos. Assim sendo, foram sequenciados 473pb do gene Citocromo Oxidase I (COI) de 34 indivíduos, revelando 31 haplótipos únicos e 93 sítios variáveis. A diversidade nucleotídica encontrada entre todos os indivíduos analisados foi considerada baixa, entretanto a diversidade haplotípica apresentou-se alta. As inferências filogenéticas por Máxima Parcimônia e Bayesiana separaram os indivíduos de *D. quadriceps* em dois grandes clados de acordo com a distribuição geográfica. A hipótese levantada nesse trabalho sobre o nível de diferenciação genética moderada a alta das populações de *D. quadriceps* nas ecorregiões da Caatinga foi aceita, mostrando que as populações possuem uma variabilidade genética alta e uma forte estruturação tanto dentro como entre as ecorregiões analisadas.

Palavras chave: Ponerinae, Caatinga, DNA mitocondrial, COI, Sequenciamento.

ABSTRACT

Dinoponera quadriceps Santschi 1921 (Formicidae: Ponerinae) is endemic in northeastern Brazil. Are relatively large ants, whose workers grow up to 3 cm long and show no morphological differences between castes. In this species the reproduction is performed by workers known as fertilizer "gamergate". This research sets out to study the genetic variability through mitochondrial DNA to elucidate the distribution patterns of the species. The results of PCR + RFLP showed low variability and showed no consistency to the standards micro and macrogeographical. Thus, 473pb were sequenced gene Cytochrome Oxidase I (COI) from 34 individuals, revealing only 31 haplotypes and 93 variable sites. The nucleotide diversity found among all individuals analyzed was considered low, however, the haplotype diversity share was high. The phylogenetic inference by Bayesian and Maximum Parsimony separated the individuals of *D. quadriceps* in two major clades according to geographic distribution. The hypothesis that work on the level of moderate to high genetic differentiation of populations of *D. quadriceps* in the Caatinga ecoregion has been accepted, showing that populations have a high genetic variability and a strong structure both within and between ecoregions analyzed.

Key words: Ponerinae, Caatinga, Mitochondrial DNA, COI, Sequencing.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Genética e Conservação

Os ecossistemas da Região Semiárida, sobretudo a Caatinga, encontram-se em franco processo de desaparecimento. A Caatinga é hoje um dos biomas mais ameaçados e pouco estudados do Brasil e grande parte da sua biodiversidade local e regional está desaparecendo antes mesmo de ser conhecida pela ciência (VELLOSO *et al.* 2001).

A degradação da Caatinga é impulsionada dentre outros fatores, por um pensamento antigo e errôneo que considera esse bioma como um ambiente simplificado e de pouca riqueza biológica (BARBOSA *et al.* 2005). Todavia estudos sobre Avaliações e Ações Prioritárias para a Conservação da Biodiversidade na Caatinga (BARBOSA *et al.* 2005), demonstram que ela é bastante diversa, tanto do ponto de vista de seus recursos naturais como de sua dinâmica social.

Apesar da grande mobilização científica, nos últimos anos, em catalogar a biodiversidade regional, ainda existe uma grande lacuna no conhecimento da fauna, especialmente sobre a estrutura genética das populações animais nas Caatingas nordestinas.

Nesse sentido, as análises moleculares têm contribuído cada vez mais para a caracterização de espécies e de suas populações. Tal potencial para investigação de questões em ecologia, evolução e taxonomia se deve ao fato de que a variação genética pode ser quantificada com grande precisão, mais do que outros tipos de medições ecológicas. Conseqüentemente, esse tipo de análise fornece melhores dados para comparações estatísticas (BRITO, 2008).

Além do mais, a interação entre a genética e a conservação é importante, pois hoje assistimos a um acelerado processo de desmatamento e degradação ambiental, que tem acarretado perda crescente da biodiversidade. A destruição de habitats, causando a extinção de espécies a uma taxa sem precedentes é considerada o principal mecanismo de perda da biodiversidade, e regiões ricas

em espécies endêmicas dominam os padrões globais de extinção (PIMM & ASKKINS, 1995 *apud* MIYAKI & ALVES, 2006).

Várias espécies de formigas vivem em ambientes restritos, os quais vêm sofrendo intensa ocupação humana nas últimas décadas. Devido à redução das populações e/ou de suas áreas de ocorrência, duas espécies de formigas não cortadeiras (*Dinoponera lucida* e *Simopelta minima*) estão na Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção, elaborada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) (SOUZA, 2005). *Dinoponera lucida*, a Formiga Gigante do Corredor Central da Mata Atlântica, está classificada na lista de espécies ameaçadas como “Vulnerável”.

Estudos preliminares de variabilidade genética realizados com apoio do PROBIO/MMA, CNPq, Chicago Zoological Society, Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) e Fundo Nacional do Meio Ambiente (FNMA), mostraram que as populações de *Dinoponera lucida* apresentam-se estruturadas e que a manutenção dos fragmentos de Mata Atlântica será fundamental para a conservação da riqueza genética da espécie (COSTA, 2006). A segunda espécie *Simopelta minima*, de ocorrência restrita ao Estado da Bahia foi extinta sem que sequer fossem realizados estudos básicos de biologia e de variabilidade genética na espécie (SOUZA, 2005).

1.2 Utilização de marcadores moleculares em estudos populacionais

Atualmente vários marcadores moleculares são empregados em estudos populacionais, e/ou voltados para a conservação, dentre eles destacam-se: a tradicional eletroforese de proteínas, que deu início a boa parte dos estudos genéticos em populações naturais; estudos com RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”); estudos com seqüenciamento do mtDNA e de genes nucleares; “DNA fingerprinting” utilizando sondas para regiões de minissatélite; RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”); e polimorfismos em regiões de microsatélites (AVISE, 1994).

A descrição de marcadores moleculares baseados na PCR (Polymerase Chain Reaction – reação em cadeia de Polimerase) tais como RAPD,

PCR+RFLP, microssatélites, sequenciamento de genes espaçadores, entre outros, aumentou a eficiência na detecção de polimorfismo no nível do DNA traduzida em redução de tempo de execução dos experimentos, do seu custo e da sua complexidade (MATIOLI & PASSOS-BUENO, 2001).

Atualmente, grande ênfase é colocada em estudos do DNA mitocondrial como marcador de diversidade genética, sendo este de extrema utilidade para investigações sobre relações filogenéticas entre diferentes taxa e identificação de subdivisão geográfica entre unidades populacionais (EIZIRIK, 1996). Desde as décadas de 70-80 a molécula do DNA mitocondrial passou a fazer parte de muitos, senão da maioria dos estudos envolvendo estrutura populacional, relações filogenéticas e o entendimento de vários aspectos biológicos e evolutivos de uma grande variedade de organismos, pois apresenta características genéticas e estruturais extremamente peculiares e únicas, tais como: herança materna; ausência de recombinação; conteúdo gênico conservado; regiões intergênicas pequenas ou ausentes; ausências de íntrons; de DNA repetitivo, de pseudogenes, de elementos transponíveis; e alta taxa de evolução (AVISE *et al.* 1987; MORITZ *et al.* 1986; AVISE, 1994). Sendo a herança do mtDNA materna, mutações acumuladas não são dispersas por meio de recombinação (AVISE *et al.* 1987). Tal característica permite que diferenças acumuladas entre matrilineas sejam usadas para inferências de genealogias de genes.

Estudos envolvendo a comparação de sequências gênicas mitocondriais tornaram-se um poderoso meio para inferir antigas relações evolutivas, pois os rearranjos parecem ser únicos, geralmente eventos raros que são improváveis de ocorrer independentemente em linhagens evolutivas isoladas (BOORE, 1999). Muitos trabalhos, também, abordam as relações filogenéticas com base na variação do mtDNA tanto em nível intra quanto inter-populacional, correlacionando-as com as distribuições geográficas dos clados. Juntos, estes elementos constituem a filogeografia (AVISE *et al.* 1987; AVISE, 2000).

Mais recentemente, pesquisadores vêm utilizando um fragmento de aproximadamente 650 pares de base (pb), a partir da base 58 da extremidade

do gene citocromo oxidase I (COI) do mtDNA (HEBERT *et al.* 2003) para identificação e separação de espécies animais. Esse marcador é denominado de *DNA barcode*, pois sequências desse gene funcionam como um código de barras, permitindo que cada táxon seja identificado por apresentar uma sequência única de DNA (HEBERT *et al.* 2003).

Inicialmente está sendo criado um banco de sequências de *DNA barcode* para todas as espécies existentes. Preferencialmente utilizando amostras depositadas em museus ou outras instituições e previamente identificadas por taxonomistas (RATNASINGHAM & HEBERT, 2007). Esse banco de dados, denominado de BOLD (*The DNA Barcode of Life Data System* - <http://www.barcodinglife.org>) permite associar outros tipos de dados às amostras, possibilitando também, a comparação de certas sequências de interesse, com sequências lá depositadas.

Uma novidade é o banco de dados de DNA barcode específico para formigas (IBOL - The International Barcode of Life Project/ <http://www.formicidaebol.org/>) que já consta com 8606 sequências de DNA *barcode* desses organismos depositadas.

1.3 Estudos utilizando marcadores moleculares em Formicidae

Em formigas, o avanço nos estudos sobre estrutura genética de populações tem sido crescente em diversos países da Europa (GOROPHSHNAYA *et al.* 2001; 2004; FOURNIER *et al.* 2002; 2004), nos Estados Unidos (SCHILDER *et al.* 1999; INGRAM & PALUMBI, 2002; RUPPELLI *et al.* 2003), na Índia (DOUMS *et al.* 2002; VIRGINIER *et al.* 2004), na Malásia (DRESCHER *et al.* 2007) e na Austrália (CROZIER *et al.* 1984). Todavia estudos sobre diversidade genética e dinâmica do fluxo gênico em formigas Neotropicais ainda são escassos. Dentre os estudos existentes, destacam-se os trabalhos realizados com a espécie brasileira *Gnamptogenys striatula* Mayr (GIRAUD *et al.* 2000) no sul do estado da Bahia, além de *Linepithema humile* Mayr, nativa do Brasil e da Argentina (BUCZOWSKI *et al.* 2004; INGRAM & PALUMBI, 2002). Na maioria destes estudos, foi utilizada a técnica de microssatélites para a detecção de polimorfismos. Trabalhos

utilizando a técnica de RFLP começam a se destacar, como o trabalho sobre padrões de diferenciação geográfica em populações de *Dinoponera lucida* Emery (Formicidae: Ponerinae), espécie endêmica do sul da Bahia e norte do Espírito Santo, estimado por meio de análises de PCR-RFLP (COSTA, 2006); estudos filogeográficos utilizando sequências de genes do mtDNA de *Solenopsis invicta* Buren (AHRENS, 2005) e *Dinoponera lucida* (RESENDE *et al.* 2008) e Investigação da história geográfica e diversificação de formigas do gênero *Crematogaster* Lund (QUEK *et al.* 2007).

Em um dos estudos com a espécie *D. lucida*, foi analisado o padrão de distribuição geográfica e a estrutura populacional através do sequenciamento dos genes COI/COII e CytB, e sendo evidenciados os níveis de diversidade haplotípica, além da presença de 6 haplótipos exclusivos em populações remanescentes do corredor central da Mata Atlântica, evidenciando isolamento por distância, barreiras do fluxo gênico e perda de haplótipos intermediários. Estes resultados trouxeram importantes informações para a elaboração de estratégias de conservação para esta espécie (RESENDE *et al.* 2008).

Utilizando sequência dos genes COI e COII do mtDNA, QUEK *et al.* (2007) investigaram a história geográfica e o contexto de diversificação de formigas do gênero *Crematogaster* das florestas equatoriais do sudoeste da Ásia. As análises permitiram aos autores reconstruir o tempo de diversificação e expansão demográfica, e identificar áreas que podem ter sido refúgios ou centros de diversificação para estas formigas. Sequências de Cytb e COI foram utilizadas por AZUMA *et al.* (2006) para estudar a filogeografia da formiga *Oecophylla smaragdina* Emery na Ásia, permitindo aos autores inferir as relações entre a estrutura filogeográfica destas formigas com evidências geológicas da distribuição de continentes, ilhas e mares durante os períodos glaciais.

Muitos trabalhos vêm sendo publicados sobre variabilidade, estrutura populacional e filogenia do gênero *Solenopsis*, devido a sua importância ecológica e econômica. A maioria desses trabalhos envolve incertezas taxonômicas, pois a alta diversidade de *Solenopsis* na América do Sul e o

número reduzido de caracteres diagnósticos acarretam na dificuldade de delimitação entre elas (PITTS *et al.* 2005). Dentre os trabalhos realizados, merecem destaque a análise filogenética realizada por SHOEMAKER *et al.* (2006) para o grupo de espécies *Solenopsis saevissima* Wheeler, baseada em sequências do mtDNA de amostras provenientes da América do Sul (parte do Brasil e da Argentina); ROSS *et al.* (2009) que analisaram 68 marcadores genéticos para distinguir diferentes linhagens de *S. saevissima*; e AHRENS *et al.* (2005), que também utilizaram sequências mitocondriais COI e COII e puderem constatar altos níveis de estruturação genética e isolamento por distância em *S. invicta*.

1.4 Aspectos da biologia de *Dinoponera quadriceps*

As formigas do gênero Neotropical *Dinoponera* Roger (1861) (Formicidae: Ponerinae) estão entre as maiores formigas da família Formicidae, com operárias que atingem até 4 centímetros de comprimento. Morfologicamente e fisiologicamente, todas as espécies do gênero são bastante similares, com operárias de coloração preta e de grande porte, com diferenças morfológicas discretas, porém nítidas. As seis espécies conhecidas do gênero (*D. australis* Emery, *D. gigantea* Perty, *D. longipes* Emery, *D. lucida* Emery, *D. mutica* Emery e *D. quadriceps* Santschi) ocorrem na América do Sul, abrangendo o sudeste da Colômbia, leste do Peru, todo o Brasil, leste da Bolívia, Paraguai e nordeste da Argentina (KEMPF, 1971; PAIVA & BRANDÃO, 1995).

O gênero *Dinoponera* está inserido no grupo das formigas poneromorfas, cujo sistema de reprodução diverge do sistema clássico de reprodução dos himenópteros sociais. Estas formigas não apresentam castas morfológicamente distintas e a reprodução é garantida por uma operária que comportamentalmente e funcionalmente se diferencia em reprodutora que, ao ser fertilizada, recebe o nome de *gamergate* (PEETERS, 1993; PAIVA & BRANDÃO, 1995). As fêmeas são ápteras e diplóides enquanto os machos são alados, haplóides, e de menor tamanho que as fêmeas (HANSKIN & ZAHL, 1971; KEMPF, 1971).

A espécie *Dinoponera quadriceps* Santschi 1921 (Figura 1) é endêmica da região nordeste do Brasil. O tamanho e as medidas das operárias de *Dinoponera quadriceps* têm proporção pouco menor do que de *Dinoponera gigantea*. O termo *quadriceps* é dito para diferir da *Dinoponera mutica*, no abdômen menos brilhante e na forma peculiar do pecíolo, que tem sua extremidade anterior marcante e estreitamente arredondada e, sua extremidade posterior amplamente arredondada (KEMPF, 1971).

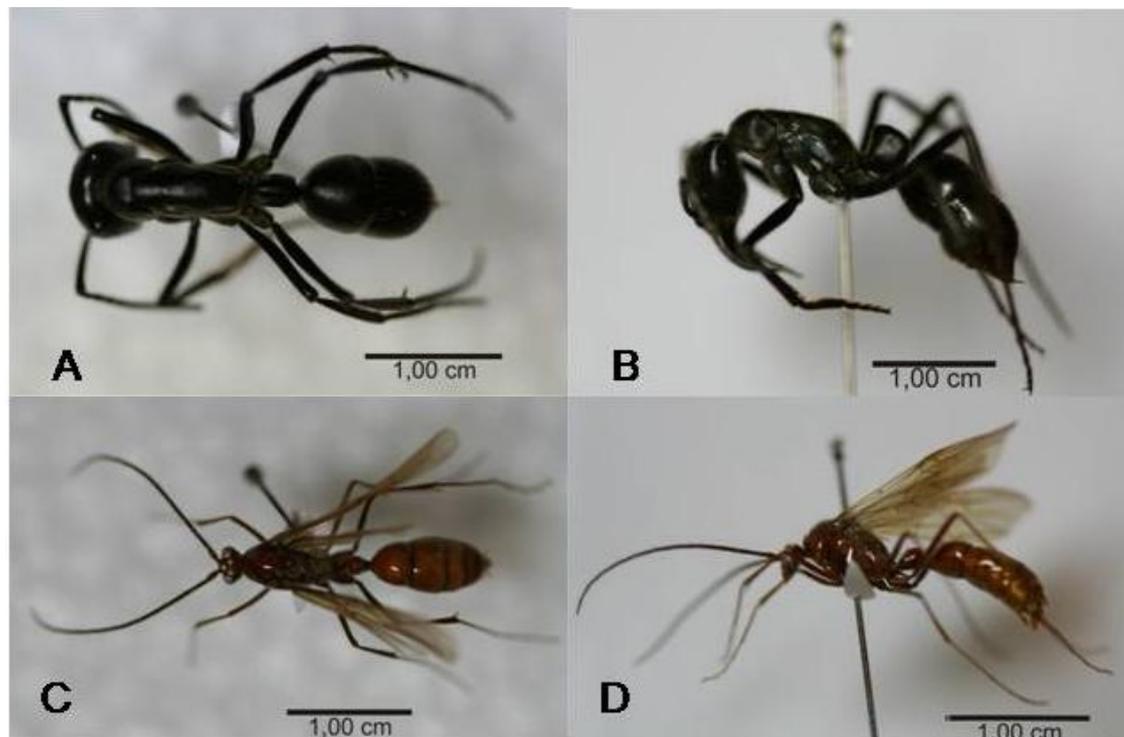


Foto: Eliomar Menezes

Figura 1: *Dinoponera quadriceps* Santschi 1921. A e B: fêmea; C e D: macho.

São formigas relativamente grandes, cujas operárias chegam a medir cerca de 3 centímetros de comprimento, mas como as outras espécies, não apresentam diferenças morfológicas de castas. Toda operária é capaz de reproduzir, mas apenas uma se torna a *gamergate* e monopoliza a reprodução na colônia. Em um estudo realizado por DANTAS DE ARAÚJO & JAISSON (1994), foi relatada ocorrência de 10 *gamergates* em alguns ninhos, mas de

acordo com MONNIN & PEETERS (1999), esse caso de poliginia parece ser mais uma exceção e que essa espécie deve ser caracterizada como monogênica.

Como já mencionado, *Dinoponera quadriceps* é uma espécie sem a casta da rainha morfológicamente especializada, conseqüentemente todas as operárias são capazes de reproduzir. Todavia, sua reprodução está sob controle hierárquico, operárias com postos de dominância diferentes têm perfis comportamentais distintos e o posto se correlaciona com a atividade de postura de ovos (MONNIN & PEETERS, 1999). Ao contrário de outras espécies, a alfa virgem de *Dinoponera quadriceps* não exhibe qualquer postura de chamado sexual, visto que ela é a única operária atrativa para os machos; entretanto, ela provavelmente também libera feromônios sexuais. Os machos quando aptos a reproduzir, saem dos seus ninhos e voam em direção a outro, onde copulam com a operária próxima à entrada do ninho. Durante o acasalamento, a fêmea corta o gaster do macho e a genitália masculina fica presa por certo tempo, bloqueando qualquer tentativa de cópula por outros machos. Os machos morrem logo após o primeiro acasalamento (MONNIN & PEETERS, 1998).

A presença de uma operária sexualmente atrativa em colônias de *Dinoponera quadriceps* não é regulada sazonalmente, pois a operária beta alcança o posto alfa depois da morte da *gamergate* (denominação da operária alfa após a reprodução), antes ou depois da fissão da colônia e, somente assim pode acasalar (MONNIN & PEETERS, 1998). A *gamergate* provavelmente vive de um a dois anos. Em uma colônia estabelecida ela é a mãe de todas as operárias e, estas por sua vez são irmãs completas (MONNIN & PEETERS, 1999).

Estudos sobre a distribuição e arquitetura de ninhos e revoada de machos de *D. quadriceps* por VASCONCELLOS *et al.* (2004), mostraram que seus ninhos possuem distribuição regular. Encontram-se constituídos por até 16 câmaras, e sua arquitetura apresenta variações de acordo com o hábitat. Cada população varia de 12 a 97 operárias adultas por ninho e os machos estão continuamente presentes durante quase todos os meses do ano, sugerindo que

a produção e a revoada são mais influenciadas pelos mecanismos que regulam a atividade sexual das operárias do que pelos elementos climáticos.

Analisando *D. quadriceps* citologicamente, MARIANO *et al.* (2005) detectaram nessa espécie um número de cromossomos de $2n=92$; valor inferior ao encontrado em *D. lucida* ($2n=120$). O autor sugere que para cada espécie existe um ciclo de fissão-inversão e até fusão dos cromossomos, resultando em cariótipos distintos com histórias evolutivas separadas. Isso mostra também que, filogeneticamente, *Dinoponera* é um “bom” gênero: as espécies compartilham caracteres morfológicos, reprodutivos e de nidificação, mas as populações estudadas mostram claramente que seguem um processo evolutivo por vicariância (MARIANO *et al.* 2005).

A partir do que foi descrito acima sobre as peculiaridades da biologia de *D. quadriceps*, como distribuição restrita, dispersão limitada e fertilização de fêmeas próximas às colônias originais (PAIVA & BRANDÃO, 1995; MONNIM & PEETERS, 1999), a hipótese desse trabalho prediz que o conjunto de populações desta espécie apresente baixo fluxo gênico entre populações que vivem em diferentes ecorregiões do Bioma Caatinga, com a possibilidade de que estas populações apresentem diferenciação genética moderada a alta, uma vez que as Ecorregiões da Caatinga apresentam pouca conectividade. Assim, estudos de variabilidade populacional tornam-se importantes para fornecer subsídios para futuros planos de manejo de conservação da espécie.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Averiguar, através da análise de DNAm, a variabilidade genética e a distribuição desta diversidade em populações naturais da formiga *Dinoponera quadriceps*, visando obter informações que poderão auxiliar na melhor compreensão dos processos e eventos históricos envolvidos no padrão atual da sua distribuição geográfica, na estimativa do nível de fluxo gênico e no grau de diferenciação genética entre as populações de uma espécie típica da região Nordeste do Brasil.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar a adequação da técnica de RFLP-PCR para estudos de variabilidade genética populacional da formiga *Dinoponera quadriceps*;
- ✓ Verificar os padrões e níveis de diferenciação populacional na espécie estudada e ocorrência de fluxo gênico entre as populações;
- ✓ Identificar os haplótipos mitocondriais existentes nas áreas estudadas através dos fragmentos dos genes citocromo oxidase I (COI), região intergênica (COI/COII) e 16S;
- ✓ Caracterizar a diversidade nucleotídica dos fragmentos dos genes COI, COI/COII e 16S.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Biológico

Foram coletadas operárias de *D. quadriceps* de 45 colônias, provenientes de 17 localidades diferentes, as quais se encontram descritos na Tabela 1. A maioria dos espécimes são provenientes de áreas de reconhecida importância ecológica do Semiárido Nordestino e representam ecorregiões do Bioma Caatinga (sensu VELLOSO, 2001) (Figura 2). A localização de cada ninho amostrado foi obtida com GPS. Para os ninhos onde não foi possível a exata marcação do ponto de georeferência, foram utilizadas as coordenadas geográficas do município como estimativas.

Em campo, as formigas eram armazenadas em álcool absoluto e ao chegar ao laboratório foram mantidas em freezer (-20°) até a extração do DNA. Apenas um indivíduo por colônia foi genotipado para evitar haplótipos idênticos atribuídos à estrutura familiar da colônia e cada colônia foi considerada como sendo uma população.

Os espécimes foram identificados pelo Prof. Dr. Jacques Hubert Charles Delabie (CEPEC/CEPLAC) e depositados na Coleção de Mirmecologia do CEPEC/CEPLAC (Comissão Executiva de Pesquisa da Lavoura Cacaueira) em Itabuna, Bahia e na Coleção Entomológica Prof. Johann Becker do Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia.

Alguns indivíduos já foram depositados no banco de dados AntWeb (<http://www.antweb.org/>), código CASENT0195393 a CASENT0195396. E os demais já foram enviados e estão em processo de validação.

Tabela 1: Quantidade de colônias de *D. quadriceps* analisadas e suas respectivas localidades e coordenadas geográficas.

	Localidades	Abreviações das localidades	Quantidade de colônias	Coordenadas
1	Baixa Grande - BA	BGE	2	S11 ⁰ 57' 38"/ W40 ⁰ 10' 04"
2	Serra do Ramalho - BA	SRA	2	S13 ⁰ 34' 19" / W43 ⁰ 35' 52"
3	Banzaê - BA	BAN	2	S10 ⁰ 34'37"/ W38 ⁰ 36' 54"
4	Senhor do Bonfim - BA	SBO	5	S10 ⁰ 27' 46" W40 ⁰ 11' 27"
5	Pilão Arcado - BA	PAR	2	S10 ⁰ 00' 10"/W42 ⁰ 30' 14"
6	Feira de Santana - BA	FSA	9	S12 ⁰ 16' 01"/ W38 ⁰ 58' 01"
7	Morro do Chapéu - BA	MCA	3	S11 ⁰ 33' 00"/W41 ⁰ 09' 21"
8	Santa Maria da Vitória - BA	SMV	1	S13 ⁰ 23' 52"/W44 ⁰ 11' 52"
9	Milagres – BA	MIL	2	S12 ⁰ 52' 12"/W39 ⁰ 51' 32"
10	Ichú - BA	ICH	1	S11 ⁰ 44' 56"/W39 ⁰ 11' 31"
11	Fortaleza – CE	FOR	3	S03 ⁰ 43' 01"/W38 ⁰ 32' 34"
12	João Pessoa - PB	JPE	2	S07 ⁰ 8' 18.42"/W34 ⁰ 50' 48"
13	São José dos Cordeiros – PB	SJC	1	S07 ⁰ 23' 27"/W36 ⁰ 48' 28"
14	São Cristovão - SE	SCR	2	S11 ⁰ 00' 54"/W37 ⁰ 12' 21"
15	Pindobaçú - BA	PIN	6	S10 ⁰ 45' 00"/ W40 ⁰ 21' 00"
16	Caetité – BA	CTE	1	S14 ⁰ 04'08"/W42 ⁰ 28' 30"
17	Manoel Vitorino –BA	MVT	1	S13 ⁰ 56'31,2"/W40 ⁰ 38'12,0"
		Total de colônias	45	

Mapa das localidade amostradas das populações de *Dinoponera quadriceps*

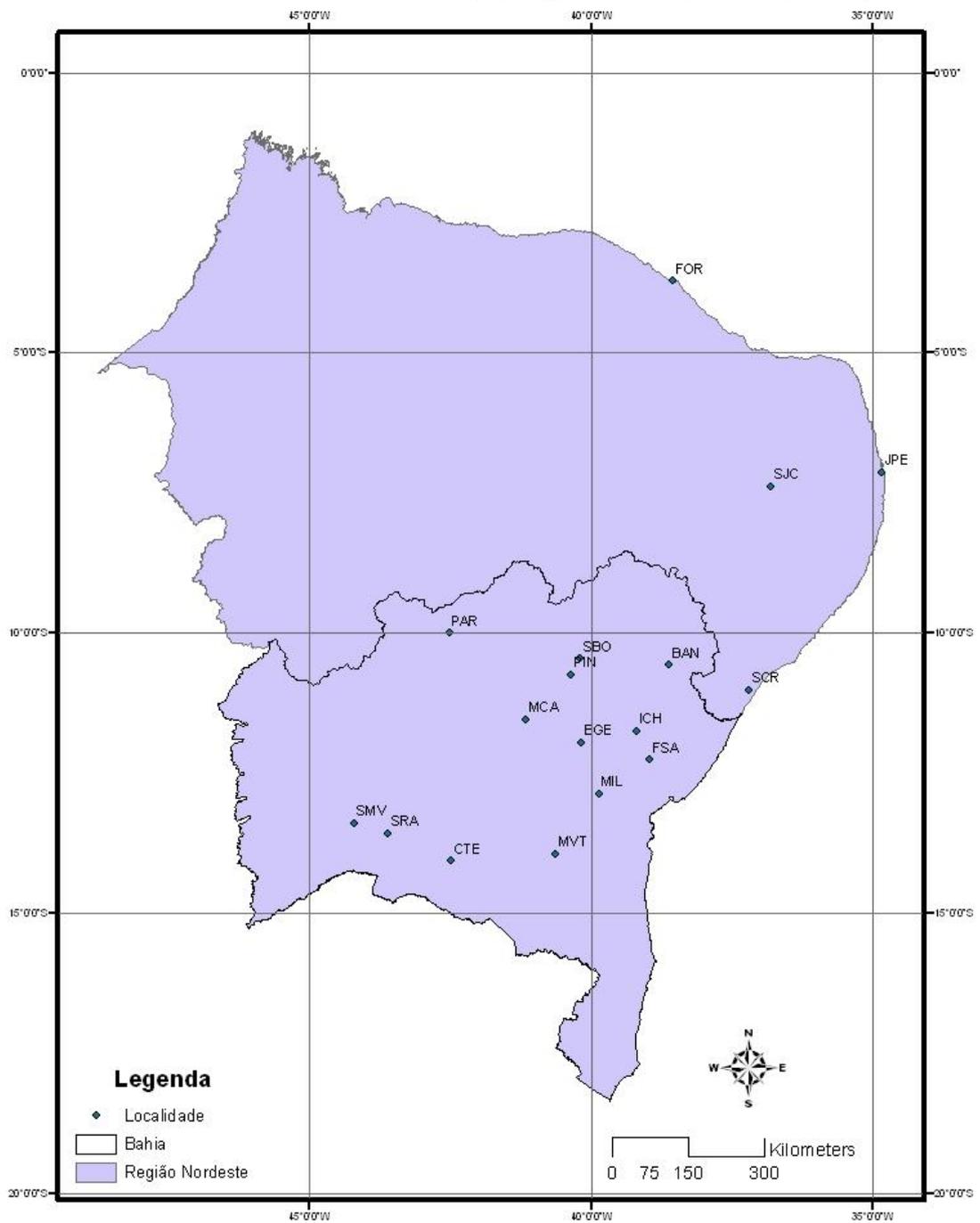


Figura 2: Distribuição geográfica das 17 populações de *D. quadriceps* amostradas, segundo a Tabela 1.

3.2 Extração e amplificação do DNA

Em laboratório, foi realizada a extração do DNA total do tórax de 45 dos indivíduos coletados nas diferentes localidades amostradas, usando o protocolo fenol-clorofórmio modificado de BRODA (1985) (Anexo 1).

Após a extração, utilizou-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para ampliação de genes específicos do DNA mitocondrial, incluindo o gene 16S (570pb), uma porção inicial do gene citocromo oxidase c subunidade I (COI) de 500pb e a região intergênica CO-I/CO-II, que compreende os genes citocromo c oxidase I, RNAt^{Leu} e citocromo c oxidase II (Figura 3). Esses fragmentos foram escolhidos por serem constantemente utilizados em estudo de variabilidade populacional em Hymenoptera, especialmente em abelhas do gênero *Apis* (GARNERY *et al.* 1993; FRANCK *et al.* 2000) e em abelhas sem ferrão (FRANCISCO *et al.* 2001; FERNANDES-SALOMÃO *et al.* 2002; WEINLICH *et al.* 2004; MORETO & ARIAS *et al.* 2005; ASSIS, 2010) e na formiga *D. lucida* (COSTA *et al.* 2006).

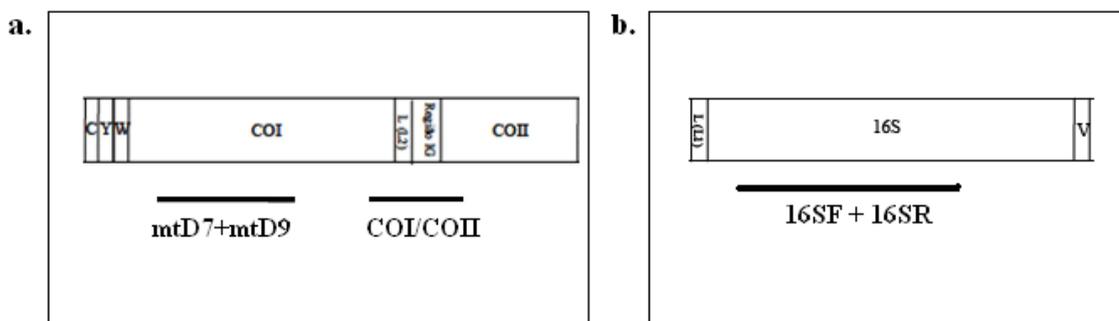


Figura 3: Genes do mtDNA utilizados para verificar a variabilidade genética de *D. quadriceps*. (a) COI/COII - região intergênica COI/COII; mtD7/mtD9 - fragmento da porção inicial do citocromo oxidase c. (b) Gene 16S; 16SF+16SR – fragmento da porção inicial do 16S. Figura modificada de SILVESTRE (2002).

Para amplificação das regiões do DNA mitocondrial, foram escolhidos de acordo com a literatura revisada, *primers* derivados de *Apis mellifera* (HALL & SMITH, 1991) e *primers* Universais para este genoma (SIMON *et al.* 1994) (Tabela 2).

Tabela 2: Condições de PCR e pares de primers testados para a amplificação do mtDNA de *Dinoponera quadriceps*. São mostrados: par de *primers*; principais genes contidos no fragmento; temperaturas de anelamento (TA); tamanho aproximado (em pares de bases) do produto amplificado e referências dos *primers*.

Par de primers	Principais genes	Sequência do oligonucleotídico- 5'-> 3'	TA° C
COI-IIF ^(a)	tRNA ^{Leu} , COII	TCTATACCACGACGTTATTC	42
COI-IIR ^(a)		GATCAATATCATTGATGACC	
mtD7 ^(b)	COI	GGATCACCTGATATAGCATTCCC	42
mtD9 ^(b)		GGATCACCTGATATAGCATTCCC	
16SF ^(a)	16S	CACCTGTTTATCAAAAACATGTCC	44
16SR ^(a)		CGTCGATTTGAACTCAAATCATG	

(a) HALL E SMITH, 1991

(b) SIMON *et al.* 1994

As reações de PCR foram realizadas em volume total de 25µl contendo 3µl de tampão Taq 10x com (NH₄)₂SO₄; 1µl de dNTP mix 2,5mM; 1µl de MgCl₂ 25mM; 1µl de cada *primer* 20mM; 0,3µl (1U) de Taq DNA polimerase (LGC Biotecnologia ®); 16,7µl de água ultra-pura e 1µl de DNA total. A amplificação foi conduzida em termociclador (Biocycler® – MJ96G) usando o seguinte programa: um ciclo de desnaturação a 94 °C com duração de 5 minutos, seguido de 35 ciclos de: desnaturação a 94°C por 1min, anelamento por 1min e 20 segundos a 42°C e extensão por 1 min a 72°C e um ciclo de extensão final a 72°C por 20 min.

Os fragmentos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio (25µg/µl). Foi utilizado na corrida de eletroforese um marcador de peso molecular de 100 pares de base (pb) Ladder (GE Healthcare®). Os fragmentos foram visualizados em transluminador e fotografados.

3.3 Digestão do produto de PCR com Enzimas de Restrição

As regiões amplificadas foram submetidas a testes de digestão simples com três enzimas de restrição (Tabela 3), para obtenção dos haplótipos mitocondriais.

Tabela 3: Enzimas de restrição utilizadas na digestão do mtDNA de *D. quadriceps* e seus respectivos sítios de restrição (/ indica o local de corte)

Enzimas	Sítio de restrição
Dra I	TTT/AAA
Ssp I	AAT/ATT
Hae III	GG/CC

As digestões foram realizadas num volume total de 20 µl, contendo 2 µl de tampão, 0.4 µl da enzima, 5 µl do produto de PCR e 12.6 µl de água ultra-pura. Para ocorrer a reação enzimática, as amostras foram colocadas no termociclador, a 37 °C, durante um período de dezesseis horas. Em seguida foi realizada a inativação da enzima a 65°C. O produto de PCR digerido foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com Brometo de Etídio e o padrão de bandas resultante foi visualizado com transluminador e depois fotografado. Utilizou-se marcador de peso molecular 100bp *ladder* para estimar o tamanho dos fragmentos.

Como não houve sucesso com as enzimas de restrição em laboratório e tendo em posse as sequências obtidas do gene COI (primer mtd7/mtD9),

verificou-se se existe sítios de restrição no gene COI para as enzimas que testamos em laboratório *DraI*, *SspI*, *HaeIII* e mais três enzimas comumente utilizada na literatura para investigar variabilidade genética em Hymenoptera: *Hinfl*, *Mbol* e *RsaI*, para isso, utilizamos a ferramenta WEBCUTTER 2.0 (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>).

3.4 Sequenciamento do DNA

Para o estudo das populações de *D. quadriceps* amostrada, foi sequenciado o fragmento da porção inicial do COI de 500pb (*primers* mtD7/mtD9) de 38 amostras, sendo um indivíduo por colônia.

Devido a problemas na amplificação da porção inicial do gene COI de algumas populações, dentre elas, Morro do Chapéu-BA; São Cristovão-SE; uma população de João Pessoa-PB e uma população de Banzaê-BA, o número de amostras submetidas para sequenciamento foi menor do que o número de colônia amostradas (Tabela 1), ficando assim distribuídas:

09 colônias de Feira de Santana – BA

01 colônia de Banzaê – BA

03 colônias de Fortaleza – CE

02 colônias de Serra do Ramalho – BA

02 colônias de Pilão Arcado – BA

01 colônia de João Pessoa – PB

01 colônia de São José dos Cordeiros – PB

02 colônias de Milagres – BA

06 colônias de Pindobaçú – BA

02 colônias de Baixa Grande – BA

05 colônias de Senhor do Bonfim – BA

01 colônia de Ichú-BA

01 colônia de Caetité-BA

01 colônia de Manoel Vitorino-BA

01 colônia de Santa Maria da Vitória-BA

Os produtos da amplificação parcial dos genes foram purificados com o protocolo de precipitação de DNA com PEG a 20% (Anexo 2). Seguiu-se então as reações de sequenciamento direto, em ambas as direções – *forward* (mtD7) e *reverse* (mtD9) – contendo: 50ng de produto de PCR purificado, 1,0 μ L de tampão de seqüenciamento (Save Money 5X), 0,5 μ L de BigDye v3.1 (Applied Biosystems[®]), 0,25 μ L do oligonucleotídeo (pmol/ μ L) iniciador e quantidade de água bi-destilada estéril para completar 10 μ L. Ao término da reação de sequenciamento, que consistiu de 35 ciclos compostos por uma etapa a 96 °C por 15 s, uma etapa a 52 °C por 10 s e uma etapa de polimerização a 60 °C por 4 min., as amostras foram mantidas a 4 °C até o momento do uso. Em seguida, 80 μ L de isopropanol foram adicionados a cada amostra. Após 15 min. a temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm, em centrífuga de placas Rotanta 46R (Hettich[®]) com rotor para microplacas, por 45 min. a 20 °C. Após precipitação do DNA, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram lavadas, duas vezes, com 200 μ L de etanol 70% seguido de centrifugação a 4.000 rpm por 15 min. a 20 °C, na mesma centrífuga. As amostras foram secas a vácuo, ressuspendidas em 10 μ L de formamida, desnaturadas por 5 minutos a 95 °C e submetidas ao sequenciamento em um sequenciador automático ABI 3100 conforme metodologia sugerida pelo fabricante do equipamento (Applied Biosystems[®]).

3.5 Análises das Sequências

As sequências diretas e reversas de cada amostra foram comparadas, corrigidas e editadas, criando-se uma única sequência consenso para cada amostra, usando o pacote Staden (STADEN *et al.* 1999) e posteriormente alinhadas através do programa Muscle versão 3.6 (EDGAR,2004).

A busca por sequências semelhantes às obtidas neste trabalho foi realizada através do programa BLAST (ALTSCHUL *et al.* 1990) no banco de dados do NCBI *GenBank*TM (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Confirmando a homologia com o gene COI publicadas de *Dinoponera gigantea* (número de acesso DQ353322.1 - *Dinoponera gigantea* voucher RA0350 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial – 1034pb), cujo fragmento da sequência foi utilizada nas análises como grupo externo.

3.6 Análises populacionais e filogeográficas

O programa DNASP 5.10 (ROZAS *et al.* 2003) foi utilizado para estimar uma série de estatísticas de variabilidade, tais como: diversidade haplotípica (H), diversidade nucleotídica (π) e o número médio de diferenças nucleotídicas (K) (NEI, 1987).

Os testes de neutralidade de D de Tajima e teste Fs de Fu, considerados mais sensíveis para detectar flutuações populacionais (RAMOS-ONSINS & ROZAS, 2002) foram calculados no programa Arlequin versão 3.1 (EXCOFFIER *et al.* 2007).

O teste de neutralidade seletiva D de Tajima se baseia no modelo dos sítios infinitos sem recombinação (KIMURA, 1969), apropriado para sequências curtas de DNA. O modelo dos sítios infinitos assume que os sítios ao longo de uma sequência de DNA sofrem mutações independentes e irregulares e que a probabilidade de um mesmo sítio sofrer mutações duas vezes é infinitamente pequena (EPPERSON, 2003). O teste D de Tajima calcula a diferença entre theta (θ) estimada do número de sítios segregantes (θ_s) e theta estimada da média da divergência das sequências par a par (θ_π). A estatística D de Tajima é definida como: $D = \theta_\pi - \theta_s / \sqrt{\text{var}(\theta_\pi - \theta_s)}$ (TAJIMA, 1989). Eventos como expansão populacional, efeito “gargalo de garrafa” ou heterogeneidade nas taxas de mutação podem gerar tais valores significativos (TAJIMA, 1993).

Já o teste Fs de Fu (FU, 1997), também baseado no modelo dos sítios infinitos sem recombinação. Este teste leva em consideração o fator temporal das mutações que geram sítios polimórficos, classificando-as como antigas e recentes. Fu (1997) notificou que a estatística Fs tende a apresentar valores

significativamente negativos quando existe um excesso de alelos raros, fornecendo evidências contra a neutralidade de mutações.

Algumas populações apresentaram uma única sequência, o que impossibilitou aplicarmos os testes de neutralidade seletiva de D de Tajima e F_s de F_u intrapopulacionalmente. Assim, calculamos os testes de neutralidade seletiva de mutações entre todas as populações e entre os haplo-grupos (I e II) propostos pela Rede de Haplótipos (Figura 7).

Com o objetivo de visualizar parâmetros histórico-demográficos foi utilizado o programa NETWORK, versão 4.1 (BANDELT, 1999), com o qual foi construída uma rede de haplótipos (Network) utilizando-se o algoritmo *median-joining* que identifica os haplótipos mais proximamente relacionados e introduz a hipótese de um ancestral.

O programa GenAlex 6.0 (PEAKALL & SMOUSE, 2006), foi utilizado para realizar o teste de Mantel que estima a correlação entre as distâncias genéticas e geográficas das colônias.

Foram feitos cálculos de estrutura populacional através da análise de variância molecular (AMOVA) (EXCOFFIER *et al.* 1992), o qual usa a Estatística F convencional baseada em análises de variância nas frequências genéticas, bem como os índices de fixação F_{st} , F_{ct} e F_{sc} , utilizando o programa Arlequin versão 3.1 (EXCOFFIER *et al.* 2007).

O F_{st} é definido como a correlação entre pares de haplótipos aleatórios dentro das populações, relativo a pares aleatórios de haplótipos extraídos de toda amostragem, o F_{ct} como a correlação entre pares de haplótipos aleatórios dentro de um dos grupos propostos *a priori* relativos a pares aleatórios de haplótipos extraídos de toda amostragem, e o F_{sc} como a correlação entre pares de haplótipos dentro das populações, relativo a pares aleatórios de haplótipos extraído dos grupos (EXCOFFIER *et al.* 1992).

Análises de Máxima Parcimônia (MP) foram realizadas no PAUP* 4b10 (SWOFFORD, 2002) para o fragmento seqüenciado do COI. Para a MP foi utilizada busca heurística partindo de uma árvore *stepwise*, com as seguintes

opções: (1) *addseq*, (2) 2.000 replicações, (3) rearranjo por TBR (*tree-bisection-reconnection*) e (4) *bootstrap* com 1000 replicações.

Árvores filogenéticas foram construídas por meio de Inferência Bayesiana (IB) com 3.500.000 gerações para a cadeia de MCMC utilizando o programa MRBAYES 3.0b4 (HUELSENBECK & RONQUIST, 2001). Para tal análise, foi calculado o modelo evolutivo (HKY+G) com o auxílio do programa MrModeltest (NYLANDER, 2004).

4 RESULTADOS

4.1 Amplificação dos genes

Os protocolos utilizados e os *primers* testados (Tabela 2) possibilitaram a amplificação da região intergênica (COI/COII), a qual apresentou dois padrões de bandas bem distintos. Fragmentos de aproximadamente 600pb nas populações de Baixa Grande-BA, Banzaê-BA, Sr. do Bonfim-BA e Pindobaçu-BA e um outro padrão de tamanho de banda de aproximadamente 800pb nas demais populações (Figura 4). Indicando, já nessa etapa do estudo, variabilidade entre algumas populações de *D. quadriceps*.

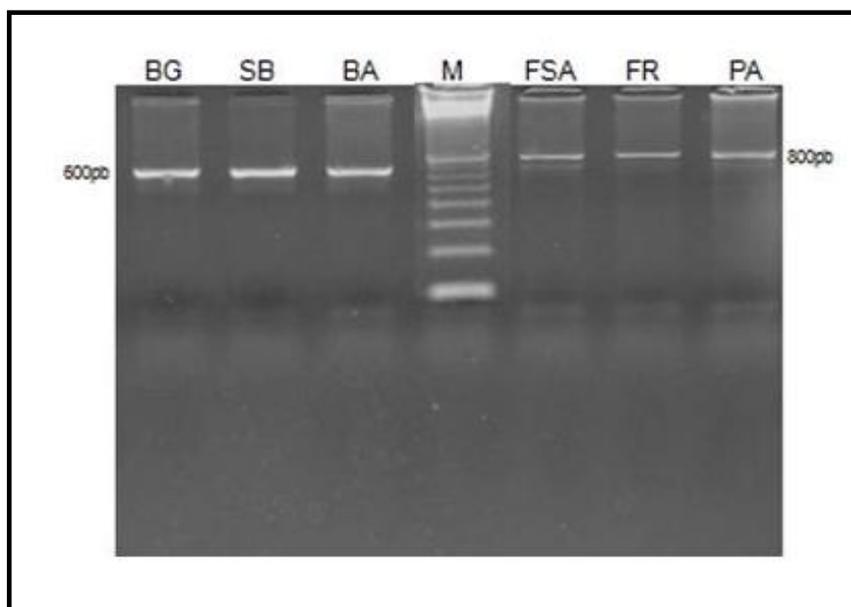


Figura 4: Eletroforese em gel de agarose (2%) mostrando a amplificação diferenciada da região intergênica COI/COII do mtDNA de seis populações de *Dinoponera quadriceps*. BG – Baixa Grande-BA, SB – Senhor do Bonfim-BA, BA – Banzaê-BA, FSA – Feira de Santana-BA, FR – Fortaleza-CE, PA – Pilão Arcado-BA e M – marcador 100pb.

O fragmento do gene da porção inicial COI apresentou tamanho aproximado de 500pb (Figura 5). Para esse gene obteve-se sucesso na amplificação da maioria das populações analisadas e por esse motivo ele foi escolhido para o sequenciamento.

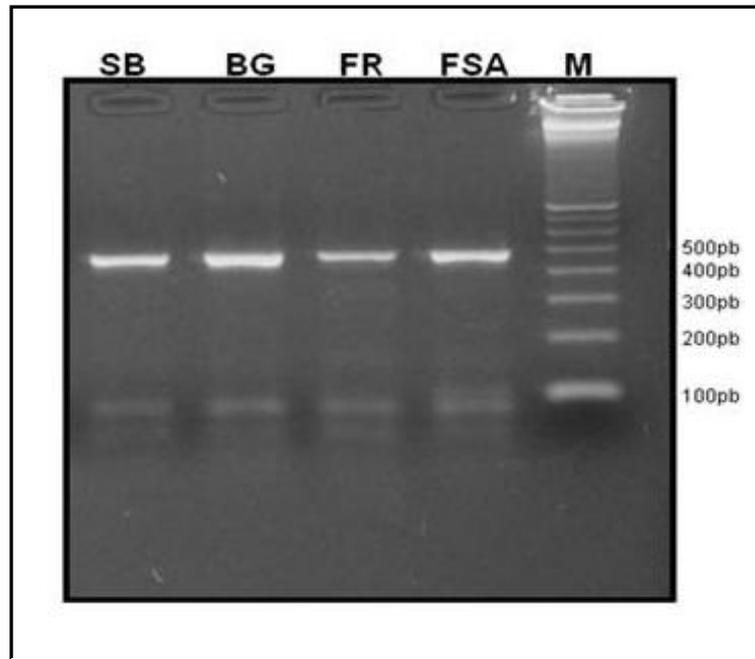


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose (2%) mostrando a amplificação do fragmento de 500pb do gene COI do mtDNA de quatro populações *Dinoponera quadriceps*. SB – Senhor do Bonfim-BA, FR – Fortaleza-CE, BG – Baixa Grande-BA, FSA – Feira de Santana-BA e M – marcador 100pb.

O gene 16S não foi amplificado utilizando-se os *primers* 16SF/16SR para *D. quadriceps*, possivelmente uma mutação na região do *primer* dificultou o anelamento e conseqüentemente não houve amplificação.

4.2 Variabilidade com a utilização de RFLP+PCR

As enzimas Dra I, Ssp I e Hae III não se mostraram eficientes para verificar variabilidade genética em *D. quadriceps*, uma vez que não apresentaram sítios de restrição ou a quantidade deles gerou dúvidas quanto ao padrão de bandas e, desta forma, os resultados não foram informativos em nenhuma população analisada. Desta forma, sequenciamos os genes COI de todas as populações, visto que o sequenciamento tem a vantagem de permitir uma maior possibilidade na detecção de variação e, por isso, a identificação de haplótipos, se existentes, é facilitada.

Os resultados utilizando a ferramenta WEBCUTTER 2.0 mostraram que apenas a enzima Ssp I não reconheceu sítios de restrição no fragmento estudado. A Tabela 4 mostra as demais enzimas e seus respectivos sítios de corte. A enzima Rsa I gerou 3 padrões de sítios de corte ; seguido pela enzima Dra I e Hae III com 8 padrões de clivagem cada, Hinf I com 10 e Mbo I com 11.

Tabela 4: Padrões de clivagem das enzimas de restrição* utilizados na digestão da região correspondente ao gene citocromo oxidase I-COI (473pb) de *D. quadriceps*. Tamanho dos fragmentos em pares de base (PB).

População/Enzimas	<i>Dra</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Hinf</i> I	<i>Mbo</i> I	<i>Rsa</i> I
BAN1	241 - 468	452	43 – 197	292 – 369 – 396 – 414	-
BGE1	241	-	43 – 196	291 – 368 – 395 – 413	-
BGE2	241	-	43 – 196	291 – 368 – 395 – 413	-
CAT1	-	-	40	210 – 288 – 365 – 392 – 410	2
FOR1	238	-	34 – 40	288 – 392 – 410	-
FOR2	238	-	40	288 – 392 – 410	2
FOR3	240	-	36 – 42	290 – 394 – 412	-
FSA1	241 – 468	-	40 – 193	288 – 365 – 392 – 410	-
FSA10	238	-	40	288 – 365 – 392 – 410	-
FSA2	238	-	40	288 – 365 – 392 – 410	-
FSA3	237	448	40 – 193	288 – 365 – 392 – 410	-
FSA4	241	451	42 – 196	291 – 368 – 395 – 413	-
FSA8	238	448	40 – 193	288 – 365 – 392 – 410	-
FSA9	238	-	40 – 193	288 – 365 – 392 – 410	-
ICH1	238	-	40 – 193	288 – 365 – 392 – 410	-
JPE1	234	443	36	284 – 361 – 388 – 406	-
MIL1	238	-	40	210 – 288 – 365 – 392 – 410	-
MIL2	238	447	40	210 – 288 – 365 – 392 – 410	-
PIN1	238	-	40 – 193	288 – 365 – 392 – 410	-
PIN2	238	-	40 – 193	288 – 365 – 392 – 410	-
PIN3	238	2	40 – 193	288 – 365 – 392 – 410	3
PIN4	238	448	40 – 193	288 – 365 – 392 – 410	-
PIN5	238	2	40 – 193	288 – 365 – 392 – 410	-
PIN6	238	2	40 – 193	288 – 365 – 392 – 410	-
PR1	241	-	43	291 – 345 – 368 – 395 – 413	-
SBO1	240	-	42 – 195	290 – 367 – 394 – 412	-
SBO2	240	-	42 – 195	290 – 367 – 394 – 412	2
SBO3	240	-	42 – 195	290 – 367 – 394 – 412	2
SBO5	240	2	42 – 195	290 – 367 – 394 – 412	-
SBO6	23 – 240	-	42 – 195	290 – 367 – 394 – 412	-
SBO7	238	-	40 – 193	288 – 365 – 392 – 410	-
SJC1	241 – 468	-	40	292 – 369 – 396	-
SMV1	238	448	40	288 – 342 – 365 – 392	-

* Sítios de cortes das Enzimas de Restrição: *Dra*I (ttt/aaa); *Hae*III (gg/cc); *Hinf*I (g/antc); *Mbo*I (/gatc); *Rsa*I (gt/ac).

4.3 Variabilidade do Gene COI

Das 38 amostras sequenciadas apenas quatro não tiveram condições de análise, mesmo depois de sucessivas tentativas, sendo dois indivíduos de Feira de Santana-BA; um indivíduo de Pilão Arcado-BA e um indivíduo de Manoel Vitorino-BA. Segue-se então, os resultados das 34 sequencias obtidas.

Cada fragmento de gene COI de 500pb, ficou após o alinhamento e edição das sequências com um tamanho consenso de 473pb. O conjunto de dados gerou 380 sítios monomórficos e 76 sítios polimórficos. Dentre os sítios variáveis, 25 foram únicos e 51 foram informativos para parcimônia.

Foram encontrados 31 haplótipos (Tabela 5), descritos por 93 posições variáveis (Figura 6). A maioria dos haplótipos foram exclusivos, exceto o haplótipo H8 que foi compartilhado entre os indivíduos de Pindobaçu (1 e 2) e o H9 que está presente nos indivíduos de Pindobaçu 6, Senhor do Bonfim 2 e Senhor do Bonfim 3. A existência de muitos haplótipos exclusivos entre e dentro das populações justifica os altos índices de diversidade haplotípica mostrados na Tabela 6.

Na Tabela 6 também são apresentados os índices de diversidade nucleotídica (π) e o número médio de diferenças nucleotídicas (k) do fragmento do gene COI para cada população e também a diversidade interpopulacional de *D. quadriceps* nas áreas amostradas. A diversidade nucleotídica (π) foi baixa tanto dentro como entre as populações, sendo que os valores de π apresentam-se muito menores (variando de $\pi=0$ até $\pi=0,024$) dentro das populações do que entre as populações ($\pi=0,036$).

Tabela 4: Frequência dos haplótipos do fragmento do gene COI em populações de *D. quadriceps*

Haplótipos	FSA	BA N	FO R	SR A	PA R	JPE	SJC	MIL	PIN	BG E	SM V	ICH	CAT	SB O	Total
H1	1														1
H2		1													1
H3			1												1
H4			1												1
H5			1												1
H6				1											1
H7					1										1
H8									2						2
H9									1					2	3
H10									1						1
H11										1					1
H12														1	1
H13									1						1
H14										1					1
H15														1	1
H16														1	1
H17									1						1
H18								1							1
H19						1									1
H20							1								1
H21								1							1
H22	1														1
H23	1														1
H24	1														1
H25	1														1
H26											1				1
H27	1														1
H28	1														1
H29													1		1
H30												1			1
H31														1	1
Total	7	1	3	1	1	1	1	2	6	2	1	1	1	6	34

Tabela 5: Diversidade genética das populações de *D. quadriceps*.

Populações amostradas	N	N° de Haplótipos	Diversidade		
			Hd	π	k
Feira de Santana-BA	7	7	1	0,0163	7,43
Banzaê-BA	1	1	0	0	0
Fortaleza-CE	3	3	1	0,0044	2
S. do Ramalho-BA	1	1	0	0	0
P. Arcado-BA	1	1	0	0	0
João Pessoa-PB	1	1	0	0	0
S. J. Cordeiros-PB	1	1	0	0	0
Milagres-BA	2	2	1	0,024	11
Pindobaçu-BA	6	5	0,933	0,00702	3,2
B. Grande-BA	2	2	1	0,00877	4
Sta. Ma. da Vitória-BA	1	1	0	0	0
Ichú-BA	1	1	0	0	0
Caetité-BA	1	1	0	0	0
Sr. Do Bonfim-BA	6	4	0,933	0,00643	2,933
Diversidade Interpopulacional			0,986	0,0363	16,6

Nota: N=número de sequências; Hd = diversidade haplotípica; π = diversidade nucleotídica; k = número médio de diferenças nucleotídicas

A rede de haplótipos (Figura 7) gerada pelo programa NetWork, a partir dos dados de freqüência e distribuição dos haplótipos nas populações, proporcionou uma visão global das inter-relações haplotípicas. A distância

genética entre os haplótipos é representada pelo comprimento dos ramos que interligam as amostras.

Nas extremidades da rede, os haplótipos amostrados formam grupos relacionados com a distribuição geográfica e separa as populações de *D. quadriceps* em dois grandes grupos denominados de I e II. O grupo I encontra-se mais reticulado, formando pequenos subgrupos relacionados geograficamente, e o grupo II, composto pelas populações de Baixa Grande-BA; Sr. do Bonfim-BA e Pindobaçú-BA, apresenta-se mais homogêneo e com uma relação mais estreita entre os indivíduos, apresentando inclusive compartilhamento de háplotipos, representado pelos círculos maiores.

A conformação da rede mostra que indivíduos próximos geograficamente descendem de uma mesma linhagem a partir de um centro de origem, exceto para os indivíduos de Pilão Arcado, Santa Maria da Vitória e Serra do Ramalho que se agruparam com indivíduos que são distantes geograficamente.

Os valores dos testes de neutralidade seletiva podem ser observados na Tabela 7. O teste **D** de Tajima mostrou desvio significativo da expectativa neutra das mutações entre todos os indivíduos amostrados ($D=1,0181$) e entre os indivíduos que formam o Grupo I ($D=2.7816$). Enquanto o teste **F_s** de Fu não apresentou significância nas populações amostradas.

A Figura 8 mostra a árvore consenso das 10.000 árvores reconstruída pelo método de Máxima Parcimônia (MP). A árvore formou dois grandes clados, o primeiro é composto por várias politomias evidenciando a heterogeneidade dos indivíduos que o compõe; e o segundo formado por um agrupamento mais consistente sustentado pelo alto valor de *bootstrap* composto pelas populações de Baixa Grande-BA, Sr. do Bonfim-BA e Pindobaçú-BA. Esses resultados também mostram um agrupamento das populações de acordo com suas distribuições geográficas e as separam também em dois grupos (I e II).

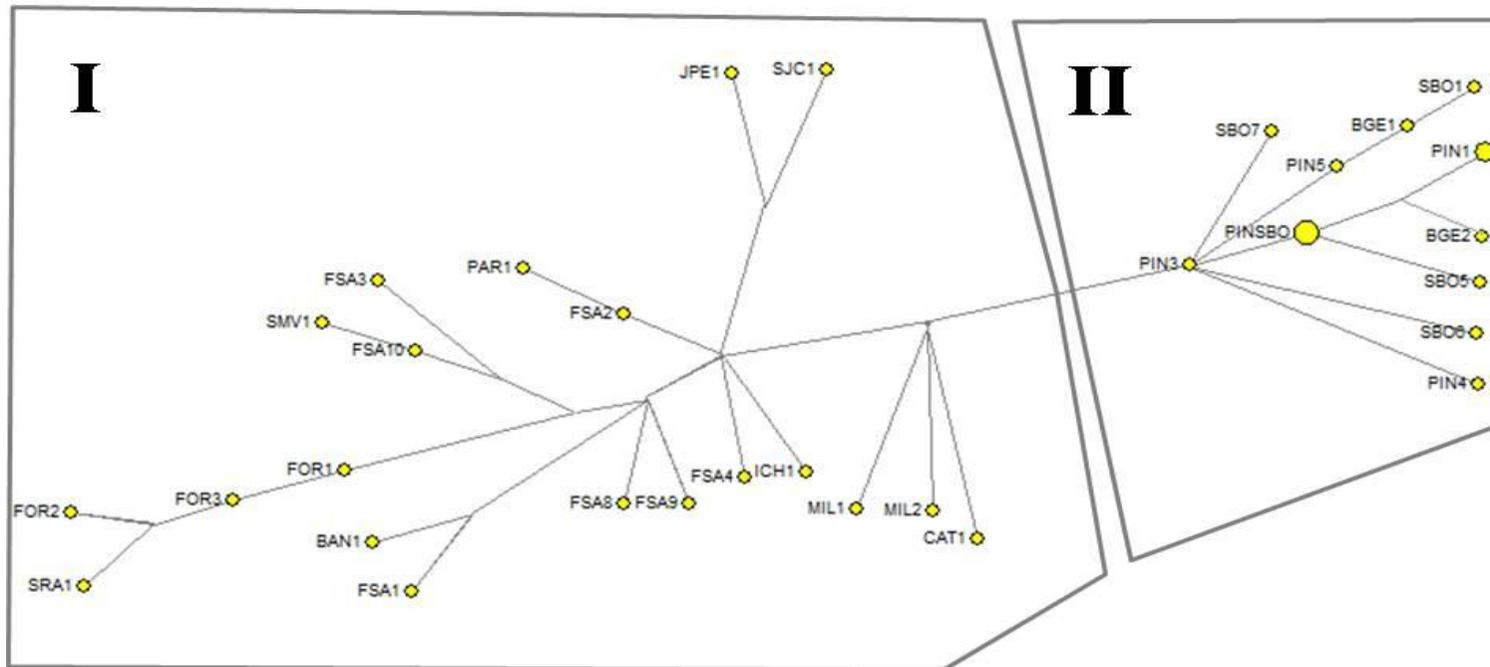


Figura 7: Rede de haplótipos do fragmento do gene COI da espécie *D. quadriceps*. As esferas amarelas representam os haplótipos e o tamanho das mesmas, o número de indivíduos. I e II – haplo-grupos.

Tabela 6: Valores dos testes de neutralidade seletiva calculados entre as populações e para os haplo-grupos I e II de *D. quadriceps*, propostos pela Rede de Haplótipos (Fig.7).

	Teste D de Tajima	Teste Fs de Fu
Interpopulacional	1.0181*	-0,9226
Haplo-grupo I	2.7816*	-0,8253
Haplo-grupo II	-0,7454	-0,8739

* Indica o nível de significância $P < 0,05$

A árvore de consenso de maioria (Figura 9) reconstruída por Inferência Bayesiana (IB) mostrou de modo geral, uma topologia congruente com aquela obtida por MP reforçando os agrupamentos gerados, evidenciados pelos altos valores de probabilidade posterior (PP) dos ramos principais.

Para a análise de variância molecular (AMOVA) consideramos os resultados obtidos na IB (Figura 9). Assim, o teste foi calculado entre os dois grandes grupos que correspondem aos dois grandes clados (I e II) e dentro de cada um dos dois grandes grupos.

Os resultados de AMOVA (Tabela 8) mostraram que a maior variação esta dentro dos grupos (86,5%) (pois especialmente o Grupo I é composto por populações geograficamente mais dispersas) do que entre os dois grupos (13,5%). Os valores dos índices de fixação $F_{st}=0,135$; $F_{ct}=0,1135$ e $F_{sc}=0,1203$ mostraram-se altos e são indicativos de estruturação entre e dentro dos grupos.

O teste de Mantel (Figura 10), realizado com 10.000 permutações indicou uma baixa correlação entre a matriz de distâncias genéticas (Distância- ρ) e a matriz de distâncias geográficas de $r = 0,132$ ($P < 0,05$)

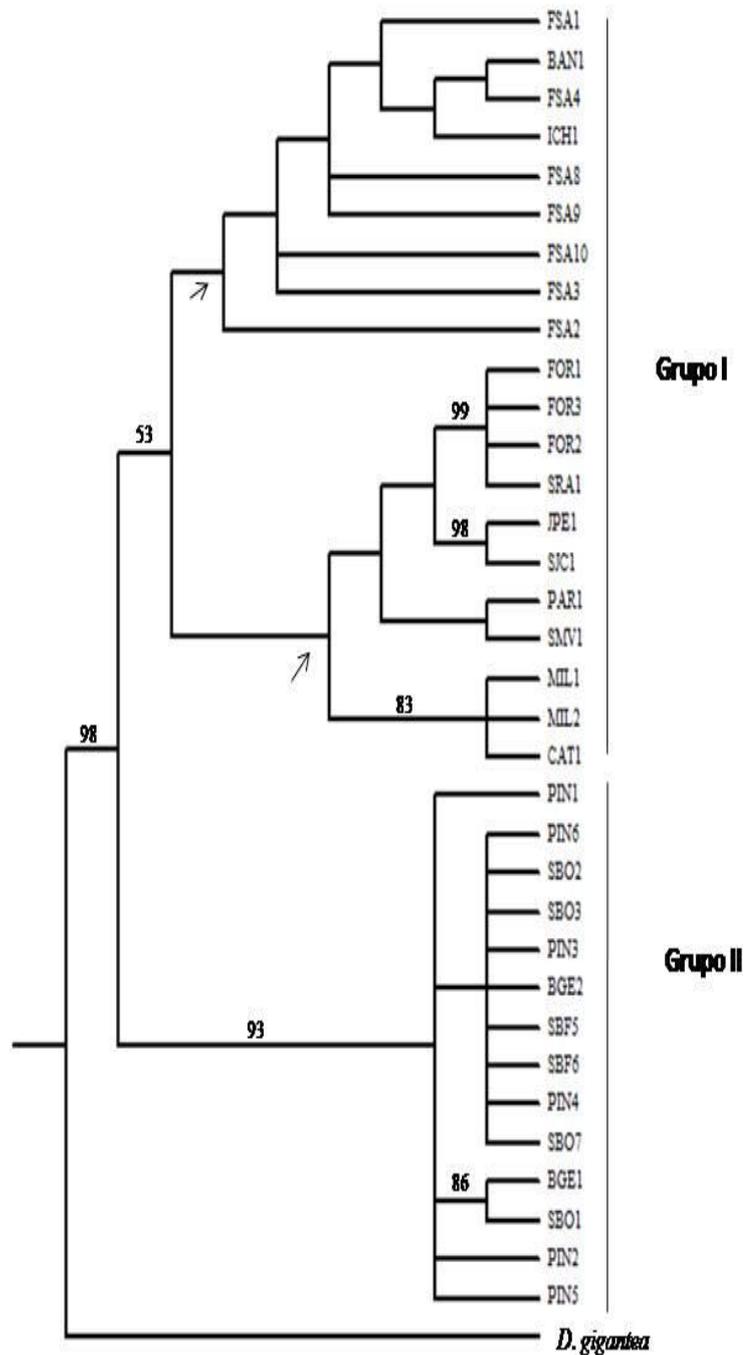


Figura 8: Consenso estrito das 10.000 árvores mais parcimoniosas obtidas através da Máxima Parcimônia (MP) com base nas sequências de COI. Os indivíduos de *D. quadriceps* estão representados pelo local de coleta e o número da colônia amostrada. Acima dos ramos estão os valores de *bootstrap*. As setas indicam os ramos que colapsaram.

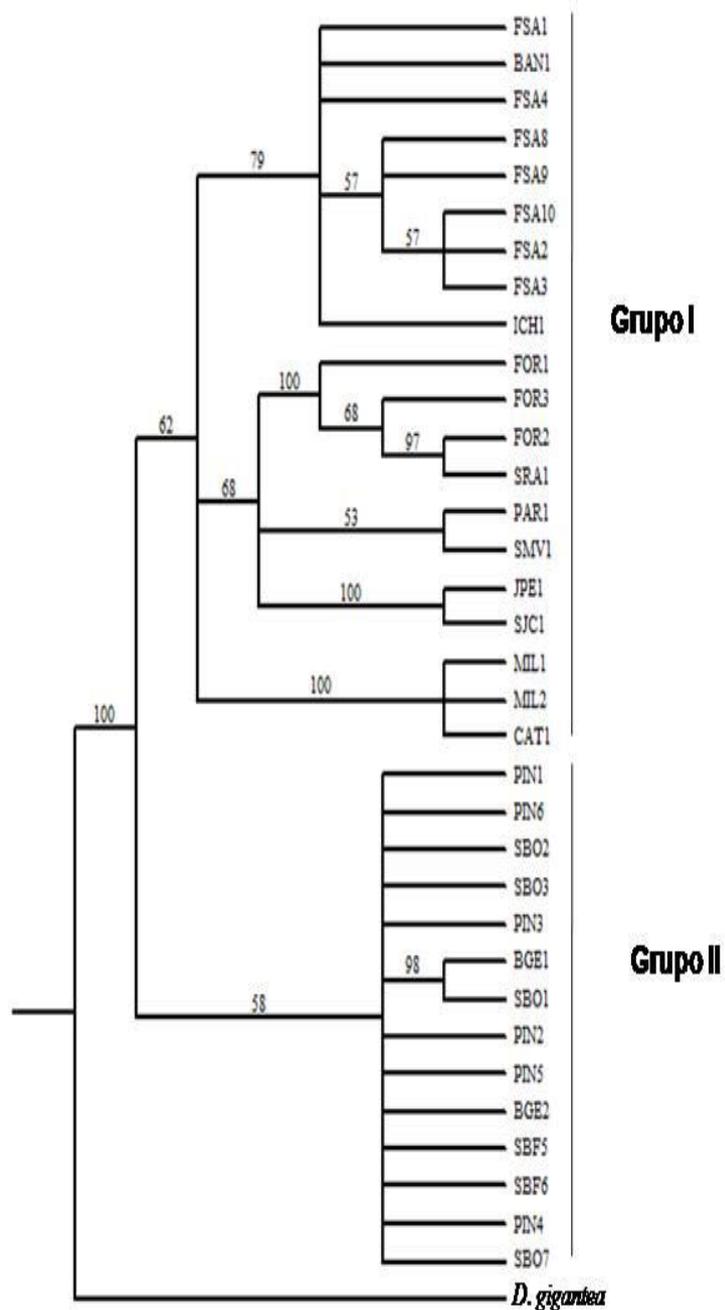


Figura 9: Consenso de maioria (50%) produzida na Inferência Bayesiana (IB) com base nas sequências de COI. Os indivíduos de *D. quadriceps* estão representados pelo local de coleta e o número da colônia amostrada. Valores acima dos ramos indicam Probabilidade Posterior (PP) dos clados.

Tabela 7: Análise da variância molecular – AMOVA considerando os indivíduos agrupados na árvore de IB (Figura 9).

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Componente de Variância	Porcentagem de Variação
Entre os Grupos	1	205.95	9.00157	13.50
Dentro dos grupos	32	1845.94	57.68	86.50
Total	33	194.875	10.68	
Índice de Fixação:	Fst=0.135, Fct=0,1135, Fsc=0,1203			

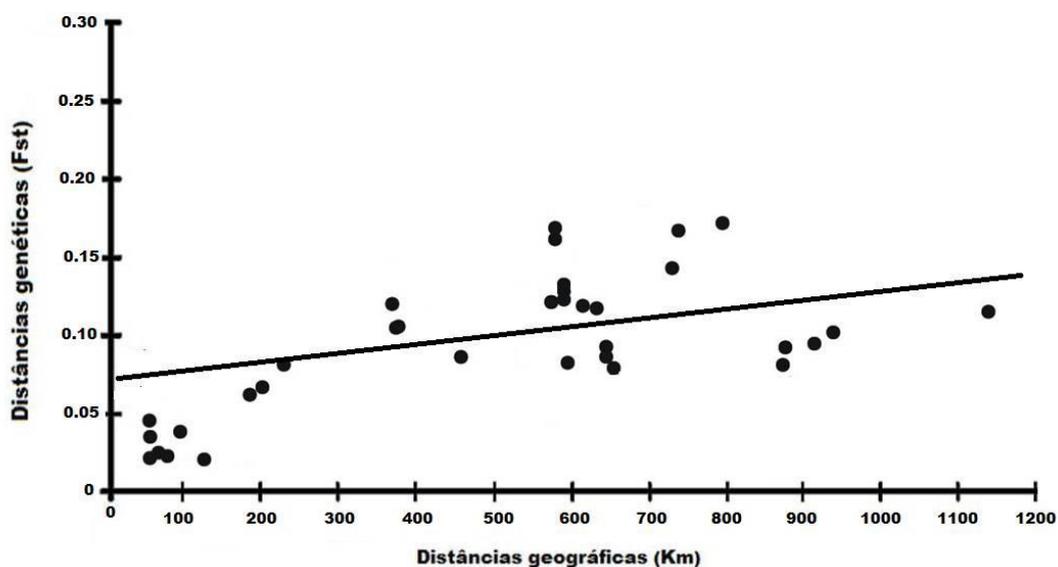


Figura 10: Gráfico representativo do teste de Mantel das sequências de COI de *D. quadriceps*: correlação entre as distâncias geográficas e genéticas.

5 DISCUSSÃO

5.1 PCR+RFLP do DNA Mitocondrial

Dentre diferentes combinações de *primers* testados em *D. quadriceps*, obtivemos êxito na amplificação de duas regiões do mtDNA: COI/COII e COI. O tamanho do fragmento de 600pb obtido da região intergênica COI/COII nas populações de Baixa Grande-BA, Banzaê-BA, Sr. Do Bonfim-BA e Pindobaçu-BA está em concordância com o encontrado em *Dinoponera lucida* (COSTA, *et al.* 2006), assim como para outros himenópteros, tais como algumas espécies de abelhas, principalmente do gênero *Melipona* (630 ou 650, aproximadamente) (FERNANDES-SALOMÃO, 2003). O tamanho de 800pb encontrado nas demais populações em que conseguimos a amplificação desse fragmento, compatível ao encontrado na abelha *Apis mellifera* L..

Estudos sobre a origem e função da região intergênica COI/COII realizado por CORNUET *et al.* (1991) em *Apis mellifera*, mostrou que essa região varia de comprimento entre e dentro de subespécies e populações. Análise da sequência desse fragmento revelou também que este apresentava unidades repetidas medindo 196pb, contendo principalmente A+T a qual foi denominada de sequência Q. Visto que os resultados apresentados mostraram uma diferença entre o tamanho do fragmento amplificado entre as populações de aproximadamente o tamanho de uma sequência Q encontrada em *A. mellifera*, acreditamos que o mesmo ocorra em *D. quadriceps*, o que seria esclarecido com o sequenciamento da região.

A região COI apresentou o tamanho do fragmento aproximado de 500pb em todas as populações de *D. quadriceps*, tamanho semelhante ao encontrado em abelha *Apis mellifera* e meliponíneos *Partamona helleri* Friese, *Partamona mulata* Moure & Camargo (BRITO & ARIAS, 2005) e *Nannotrigona testaceicornis* Lepeletier (ASSIS, 2010).

As enzimas de restrição testadas em laboratório (*Dra I*, *SspI* e *Hae III*) para os fragmentos dos genes COI/COII e COI não foram eficientes para detectar sítios de corte em *D. quadriceps*. Todavia ao sequenciarmos o fragmento de COI e ao utilizarmos a ferramenta do WEBCUTTER observamos que a enzima *DraI* apresentou sítios de corte informativos para identificar

polimorfismo nas populações. A enzima *Hae II* apresentou um sítio de corte na sequência, porém imperceptíveis no gel de agarose por se encontrarem bem no início do fragmento ou bem no final e a enzima *Ssp I* não apresentou sítio de corte para nenhuma população analisada confirmando os resultados encontrados em laboratório para essa enzima.

Todavia COSTA *et al.* (2006) analisando por PCR-RFLP a região intergênica (COI/COII-603pb) do mtDNA de populações de *D. lucida* ao longo da distribuição da espécie com as enzimas *Hae III* e *Sspl*, detectaram apenas um sítio de restrição para *Hae III*, produzindo dois fragmentos, com tamanho inferido em 485pb e 118pb, respectivamente. A enzima *Sspl* apresentou dois sítios de corte, produzindo, quando ambos estão presentes, um fragmento de 485pb e dois fragmentos de cerca de 59 pb. A análise dos padrões de restrição com as duas enzimas evidenciou diferenças nos haplótipos entre as populações analisadas mostrando-se eficiente em detectar polimorfismo em *D. lucida*.

Quanto às outras enzimas testadas (*Hinf I*, *Mbo I* e *Rsa I*) nas sequências do COI de *D. quadiceps* com a ferramenta WEBCUTTER, *Rsa I* não apresentou sítio de corte para a maioria das populações analisadas, gerando em algumas populações um sítio de corte bem no início da sequência que passaria despercebido no gel de agarose. Entretanto as enzimas *Hinf I* e *Mbo I* apresentaram-se bem eficientes para detecção de sítios de restrições, encontrando variações entre as populações no fragmento do gene COI analisado.

Acreditamos que para inferir sobre a variabilidade populacional de *D. quadiceps* com PCR+RFLP, seria preciso o teste com mais enzimas de restrição. Entretanto o método que tem sido mais comumente utilizado atualmente, inclusive com formigas (SZALANSKI *et al.* 2010; RESENDE, 2008; SHOEMAKER *et al.* 2006; GOROPASHNAYA *et al.* 2004; STREHL & GADU, 2004) e mostrado resultados bem informativos é o sequenciamento do fragmento estudado.

De acordo com AVISE (1987) é comum estudos de mtDNA revelarem variações entre populações de diferentes áreas geográficas, então utilizou-se também nesse estudo a técnica de sequenciamento, que é mais sensível, para

estudar a variabilidade populacional de *D. quadriceps* com a análise da sequência de um fragmento do gene COI, cujos resultados serão discutidos a seguir.

5.2 Análises do sequenciamento parcial do gene COI

O fragmento do gene COI mostrou-se eficiente para estudo da variabilidade genética de *D. quadriceps*. Entretanto devemos ser parcimoniosos em relação a algumas conclusões devido ao pequeno número de indivíduos analisados em algumas populações.

A diversidade nucleotídica encontrada entre todos os indivíduos analisados foi considerada baixa ($\pi = 0,036$), enquanto a diversidade haplotípica apresentou-se alta ($Hd = 0,960$). A diversidade nucleotídica dentro das populações de uma mesma localidade foi ainda mais baixa com maior valor apresentado pela população de Milagres - BA ($\pi = 0,024$). Esses resultados mostram que, apesar da grande diversidade haplotípica, os haplótipos são similares entre si.

Estudos sobre filogeografia em *D. lucida* (RESENDE, 2008) e sobre estrutura populacional na formiga Ponerinae *Diacamma cyaneiventre* André (DOUMS *et al.* 2002) encontraram também uma diversidade nucleotídica baixa entre colônias mais próximas geograficamente. Esses dados foram interpretados pelos autores como resultado do efeito fundador, devido ao comportamento de expansão de novos ninhos na subfamília Ponerinae. A expansão da população se dá por eventos únicos de migração, ou de pequenos grupos de migrantes para novos locais adjacentes, com subsequente aumento do número de ninhos por eventos de fissão de colônias. Desta forma, os ninhos mais próximos são mais aparentados, pois derivam de uma única ou poucas colônias (WADE & MCCAULEY, 1988).

Esse padrão de diversidade encontrado nas populações de *D. quadriceps*, alta diversidade haplotípica e baixa diversidade nucleotídica, também pode ser atribuído a uma provável expansão populacional após um período de baixo tamanho efetivo de população (número de indivíduos em intercruzamento) (AVISE, 2000), considerando que um rápido crescimento promove a retenção de novas mutações (AVISE, 1984).

Este provável crescimento populacional se reflete no grande número de haplótipos únicos observados. No teste D de Tajima, aplicado entre todos os indivíduos dos haplo-grupos formados pela rede de haplótipos mostrou que a diferença entre o número de sítios segregantes e o número médio de diferenças entre os nucleotídeos de uma amostragem de DNA corroboram com a existência de crescimento populacional entre todos os indivíduos e dentro do haplo-grupo I de *D. quadriceps*. Entretanto o teste F_s de Fu, que possui propriedades estatísticas para detectar excesso de alelos raros não foi significativo para nenhuma categoria considerada, rejeitando a hipótese de crescimento populacional.

A análise de Máxima Parcimônia (MP) e a Inferência Bayesiana revelaram, no geral, uma maior estruturação das populações de acordo com as regiões geográficas. Este padrão evidencia que as colônias mais próximas geograficamente guardam relações filogenéticas próximas. Uma exceção foi população de Serra do Ramalho-BA que se agrupou com o clado de Fortaleza-BA e que são distantes geograficamente. A árvore mostra ainda a separação de dois grandes grupos, o grupo I que agrupa as populações de Pindobaçú-BA, Sr. do Bonfim-BA e Baixa Grande-BA e o grupo II agrupando as demais populações.

Os resultados até aqui discutidos chamam atenção para a separação do grupo que abriga as populações de Pindobaçú-BA, Sr. do Bonfim-BA e Baixa Grande-BA das demais populações de *D. quadriceps*. Essas populações foram as que também apresentaram diferenciação em relação ao comprimento da região intergênica (COI/COII) de 600bp contra 800pb nas demais populações. O sequenciamento da região intergênica (COI/COII) e a utilização de outros genes talvez contribuam para entender melhor a dinâmica genética populacional do grupo, mas os resultados aqui obtidos levam a crer que possivelmente estamos diante de espécies crípticas de *D. quadriceps*.

O teste de AMOVA, calculado entre e dentro dos grupos formados pela análise de MP, mostra uma grande estruturação entre as populações de *D. quadriceps*, evidenciado pelo alto valor de $F_{st}=0.135$. Altos valores de F_{st} também mostraram altos índices de estruturação das populações de outras formigas, como é o caso de *Formica exsecta*: $F_{st}=0.72$ (LIAUTARD & JELLER,

2001); *Diacamma cyaneiventre*: $F_{st}=0.75$ (DOUMS *et al.* 2002); *Diacamma indicum*: $F_{st}=0.45$ (VIGINIER *et al.* 2004); *Dinoponera lucida* : $F_{st}=0.91$ (RESENDE, 2008). Parte dessa estruturação pode estar associada ao comportamento de fundação de novos ninhos com limitações quanto à distância percorrida pela fêmea, fazendo com que ninhos mais próximos geograficamente descendam de uma mesma linhagem mitocondrial.

A correlação baixa, porém positiva entre as distâncias geográficas e genéticas apresentadas pelo teste de Mantel, indica claramente uma redução do fluxo gênico entre as populações. Parte deste resultado corrobora com os apresentados com *D.lucida* (RESENDE, 2008). No entanto, os valores baixos apresentados no presente estudo e a formação de dois grupos distintos não são totalmente explicados pelas distâncias geográficas e sim por outros fatores ecológicos e comportamentais da espécie.

Segundo HAMRICK & GODT (1996) a estruturação genética de populações de uma espécie é afetada pela sua história populacional, as características do habitat e de características da história de vida. Dissociar estes efeitos é uma tarefa difícil, mas tarefa central dos estudos de genética populacional. Correlativos estudos têm mostrado alguma associação entre as características da história de vida e genética de populações de uma espécie em plantas e animais. Por exemplo, nas formigas com a fundação da colônia dependente, a rainha depende da ajuda das operárias para estabelecer uma nova colônia, e a dispersão torna-se limitada para poucos passos da colônia de origem (PEETERS & ITO, 2001). Espécies ou populações com a fundação da colônia dependente mostram um nível superior de diferenciação genética, com relação àquelas com fundação de colônias independentes, onde as rainhas voam (SUNDSTROM, 1993; SEPPA & PAMILO, 1995; ROSS *et al.* 1997).

A estrutura genética observada para o mtDNA de *D. quadriceps* apoia veementemente a hipótese citada acima, reforçando a idéia de que o fluxo genético restrito por meio do sexo feminino (mtDNA) é consequência de fêmea reprodutiva (*gamergate*) ser áptera, assim um baixo nível de fluxo gênico é esperado por dispersão matriarcal. O comportamento reprodutivo de dispersão

de *D. quadriceps* e de outras espécies poneromorfas deve proporcionar uma grande divergência entre colônias distantes, influenciando dessa forma o processo de evolução desses indivíduos

Das oito ecorregiões propostas para o bioma Caatinga (VELOSSO *et al.* 2001), conseguimos analisar colônias de *D. quadriceps* de 3 ecorregiões: 1 colônia de Pilão Arcado-BA da Ecorregião Dunas de São Francisco; as colônias do Ceará e da Paraíba (Ecorregião Depressão Sertaneja Setentrional) e as demais colônias da Ecorregião Depressão Sertaneja Meridional. A hipótese levantada nesse trabalho sobre a diferenciação genética moderada a alta das populações de *D. quadriceps* nas ecorregiões da Caatinga foi aceita, mostrando que as populações possuem uma variabilidade genética alta e uma forte estruturação tanto dentro como entre as ecorregiões analisadas.

Esse estudo traz grandes implicações para a genética da conservação, visto que revelou potenciais unidades evolutivas nas populações de *D. quadriceps* em diferentes localidades do Nordeste brasileiro, especialmente do bioma Caatinga. Ações prioritárias que visam à conservação desse bioma fazem-se cada vez mais necessária uma vez que diversos estudos (RODRIGUES, 1996; ROCHA, 1998; RODRIGUES & JUNCÁ, 2002; RODRIGUES, 2003; QUEIROZ, 2005) mostram que as diferentes ecorregiões da Caatinga são foco de endemismo de diversas espécies animais e vegetais.

Além do mais, o paradigma do foco da conservação nas espécies está sendo modificado, e a importância de se conservar populações geograficamente divergentes, geneticamente diferenciadas e com uma história evolutiva em comum é fundamental para preservar a variabilidade gênica como um todo (MALLET, 1997; MEFFE & CARROLL, 1997; AVISE, 1992, 2000; MATIOLI, 2001; FRANKHAM *et al.* 2004).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse trabalho analisou a variabilidade populacional em *D. quadriceps* de diferentes localidades do bioma Caatinga através da utilização de marcadores moleculares PCR+RFLP e sequenciamento do fragmento do gene COI do DNA mitocondrial. Essas análises foram pioneiras para a espécie estudada, a qual é endêmica do Nordeste brasileiro e cujo hábitat está seriamente impactado e por isso carece de estudos populacionais prevendo possíveis planos de manejo visando à conservação.

Alguns pontos desse trabalho merecem ser destacados:

- ✓ O marcador molecular PCR+RFLP não foi eficiente para detectar a exata variabilidade genética nas populações de *D. quadriceps*;
- ✓ A metodologia de sequenciamento foi realmente mais sensível no estudo de variabilidade genética e filogeografia das populações;
- ✓ Apesar da grande diversidade haplótipica (31) nas populações estudadas, os haplótipos são relacionados devido ao baixo valor de diversidade nucleotídica encontrado entre eles, sugerindo crescimento populacional.
- ✓ As análises do COI mostraram que as populações de *D. quadriceps* possuem uma alta diversidade genética e estão bem estruturadas, resultados que parecem estar relacionados com o comportamento reprodutivo da espécie.
- ✓ Todos os resultados mostram uma separação das populações dessa espécie em dois grandes grupos com possíveis indícios de espécies crípticas.
- ✓ Esse trabalho ampliou o painel para estudo da diversidade genética da Caatinga.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHRENS, M. E. ROSS, K. G., SHOEMAKER, D. D. 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, 2005.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, 215:403-410, 1990.
- ASSIS, A.F. **Estudo populacional e molecular de *Nannotrigona testaceicornis* Cockerell (Hymenoptera, Apidae, meliponini) através do DNA mitocondrial.** Dissertação de Mestrado: Ribeirão Preto – SP- 2010.
- AVISE, J. C. **Pylogeography. The history and formation of species.** Havard university Press, Boston, 2000.
- AVISE, J. C. **Molecular markers, natural history and evolution.** Chapman and Hall, NY, USA, 1994.
- AVISE, J.C. 1992. **Molecular population structure and the biogeographic history of a regional fauna: a case history with lessons for conservation biology.** *Oikos* 63: 62-76, 1992.
- AVISE, J. C.; ARNOLD, J.; BALL, R. M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J. E.; REEB, C. A.; SAUNDERS, N. C. Intraespecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between populations genetics and systematic. **Annual Review of Ecology and Systematics** 18:489-522, 1987.
- AZUMA, N.; OGATA, K.; KIKUSH, T.; HIGASHI, S. Phylogeography of Asian Weaver ants *Oecophylla smaragdina*. **Ecological Research**, 21:126-136, 2006.
- BANDELT, H. J.; FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution** 16:37-48, 1999.
- BARBOSA, M. R. V.; CASTRO, R.; ARAÚJO, F. S.; RODAL, M. J. N. Estratégias para conservação da biodiversidade e prioridades para a pesquisa científica no bioma Caatinga - **Análise das variações da Biodiversidade do Bioma Caatinga**; Ministério do Meio Ambiente; Brasília-DF, Cap. 94; pp. 416-429, 2005.
- BRITO, R. M. *et al.* **Biodiversidade de Meliponíneos: Contribuição da Biologia Molecular.** Anais do VIII Encontro sobre Abelhas, Ribeirão Preto-SP, 2008.

- BRITO, R. M. & ARIAS, M. C. Mitochondrial DNA characterization of two *Partamona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) by PCR+RFLP and sequencing, **Apidologie**, 36:431-437, 2005.
- BOORE J.L. Animal mitochondrial genomes, **Nucleic Acids Research**, 27:1767–1780, 1999.
- BUCZKOWSKI, G.; VARGO, E. L.; JULES SILVERMAN, J. BUCZKOWSKI et. al. The diminutive supercolony: the Argentine ants of the southeastern United States. **Molecular Ecology**. 13:2235–2242, 2004.
- CORNUET, J. M.; GARNERY, L.; SOLIGNAC, M. Putative Origen and Function of the Intergenic Region Between COI and COII *Apis mellifera* L. Mitochondrial DNA. **Genetics Society of America**, p. 394-403, 1991.
- COSTA, M.A.; SILVA, J.G.; NETTO, E.M.; CAMPIOLO, S.; DOMINGUES, A.M.T.; DELABIE, J.H.C. **Padrões de diferenciação geográfica em populações de *Dinoponera lucida* Emery (formicidae: ponerinae) estimado por meio análises de PCR-RFLP. Resumos do 52º Congresso Brasileiro de Genética**, pp.327, 2006.
- CROZIER, R. H.; PAMILO, P.; CROZIER, D Y. C. Relatedness and microgeographic genetic variation in *Rhytidoponera mayri* an Australian arid zone ant. **Behavioral Ecology and Sociobiology** 15:143-150, 1984.
- DANTAS DE ARAÚJO, C. Z. & JAISSON, P. Modes de fundation des colonies chez la fourmi sans reine *Dinoponera Santschi* (Hymenoptera, Formicidae, Ponerinae). **Actes des Colloques Insectes Sociaux** 9:79-88. 1994.
- DOUMS C., CABRERA H., PEETERS C. Population genetic structure and male biased dispersal in the queenless ant *Diacamma cyaneiventre*. **Molecular Ecology**, 11:2251-2264, 2002.
- DRESCHER, J., BLÜTHGEN, N., FELDHAAR, H. Population structure and intraspecific aggression in the invasive ant species *Anoplolepis gracilipes* in Malaysian Borneo. **Molecular Ecology** 16, 1453–1465, 2007.
- EDGAR, R. C. Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, 32(5):1792-97, 2004.
- EIZIRIK, E. Ecologia molecular, genética da conservação e o conceito de Unidade Evolutiva Significativa. **Revista Brasileira de Genética** 19 (Suplemento):23-29, 1996.
- EPPERSON, B.K. Spatial structure of two-locus genotypes under isolation by distance. **Genetics** 140:365-375, 1995.

- FERNANDES-SALOMÃO, T.M. **Caracterização do genoma mitocondrial por RFLP de quatro espécies de Melípona e das regiões COI/COII.** Brasília-DF, 2003.
- FRANKHAM, R., BALLOU, J., D. & D. A., BRISCOE (eds). **Introduction to conservation genetics.** Cambridge University Press, 2004.
- FU, Y-X. . Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics** 1447: 915-925, 1997.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.1: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics online** 1: 47-50, 2007.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J. M. ,Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial 22 DNA restriction data. **Genetics**, 131:479-491, 1992.
- FERNANDES-SALOMÃO, T. M.; MURO-ABAD, J. I.; CAMPOS, L. A. O.; ARAÚJO, E. F. Mitochondrial and nuclear DNA characterization in the Melipona species (Hymenoptera, Meliponini) by RFLP analysis. **Hereditas** 137:229-233, 2002.
- FOURNIER, D.; ARON, S.; KELLER, L. Significant reproductive skew in the facultatively polygynous ant *Pheidole pallidula*. **Molecular Ecology** 13:203-210, 2004.
- FOURNIER, D.; ARON, S.; MILINKOVITCH, M. C. Investigation of the population genetic structure and mating system in the ant *Pheidole pallidula*. **Molecular Ecology**, 11: 1805-1814, 2002.
- FRANCISCO, F. O.; SILVESTRE, D.; ARIAS, M. C. Mitochondrial DNA characterization of five of *Plebeia* (Apidae: Meliponinae): RFLP and restriction maps. **Apidologie** 32:323-332, 2001.
- FRANCK, P.; GARNERY, L.; CELEBRANO, G.; SOLIGNAC, M.; CORNUET, J. M. Hybrid origins of honeybees from Italy (*Apis mellifera ligustica*) and Sicily (*A. m. sicula*). **Molecular Ecology** 9:907-921, 2000.
- GARNERY, L.; SOLIGNAC, M.; CELEBRANO, G.; CORNUET, J-M. A simple test using restriction PCR-amplified mitochondrial DNA to study the population structure of *Apis mellifera*. **Experientia**, 49:1016-1021, 1993.
- GIRAUD, T.; BLATRIX, R.; POTEAUX, C.; SOLINAG, M.; JAISSE, P. Population structure and mating biology of the polygynous ponerinae ant *Gnamptogenys striatula* in Brazil. **Molecular Ecology**, 9:1835-1841, 2000.

- GOROPASHNAYA, A. V.; FEDOROV, V. B.; SEIFERT, B.; PAMILO, P. Limited phylogeographical structure across Eurasia in two red wood ant species *Formica pratensis* and *F. lugubris* (Hymenoptera, Formicidae), **Molecular Ecology** 13:1849–1858, 2004.
- HALL, H. G. & SMITH, D. R. Distinguishing African and European honeybee matrilineal lineages using amplified mitochondria DNA. **PNAS**. 88:4248-4552, 1991.
- HAMRICK, J.L. & GODT, M. J. W. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B**, **351**, 1291–1298, 1996.
- HASKINS, C.P. & ZAHL. P.A. The reproductive pattern of *Dinoponera grandis* Roger Hymenoptera, Ponerinae with notes on the ethology of the species. **Psyche** 78: 1-11, 1971.
- HEBERT, P.D.N.; CYWINSKA, A. BALL, S.L., DE WAARD, J.R. **Biological identifications through DNA barcodes**. *Proc R Soc B*, 270:313-322, 2003.
- HUDSON, R. R., SLATKIN, M.; W. P. MADDISON. **Estimation of level of gene flow from sequence data**. *Genetics* 132:583-589, 1992.
- HUELSENBECK, J. P. & RONQUIST, F. **MrBayes: Bayesian inference of phylogeny**. *Bioinformatics*, 17. 754-755, 2001.
- INGRAM, K. K. & S. R. PALUMBI. Characterization of microsatellite loci for the Argentine ant, *Linepithema humile*, and their potential for analysis of colony structure in invading Hawaiian populations. **Molecular Ecology**. 2:94-95, 2002.
- KEMPF, W.W. A preliminary review of the ponerine ant genus *Dinoponera* Roger Hymenoptera: Formicidae. **Studia Entomologica**. 14:369-394, 1971.
- KIMURA, M. The number of heterozygous nucleotide sites maintained in a finite population due to the steady flux of mutations. **Genetics** 61:893-903, 1969.
- LIAUTARD, C. & KELLER, L. Restricted effective queen dispersal at a microgeographic scale in polygynous populations of the ant *Formica exsecta*. **Evolution**, 55:2484–2491, 2001.
- MARIANO, C. S. F., SPOSITO, E. C., LOPES, A.L., BARROS, L., POMPOLO, S. G., DELABIE, C. Análises Cariotípicas no gênero *Dinoponera* Roger (Ponerinae: Ponerini), **XVII Simpósio de Mirmecologia-Biodiversidade e Bioindicação**, 2005.
- MATIOLI, S. R. & PASSOS-BUENO, M. R. S. **Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismo de ácidos nucléicos**. In: **Biologia Molecular e Evolução**. Holos Editora. Ribeirão Preto. pp. 153-181, 2001.

- MALLET, J. **The genetics of biology diversity: from varieties species** . In Gaston, K.J.(ed). Biodiversity: a biological of numbers and differences. Blackwell Science Ltd., 1997.
- MEFFE, G. K. & C. R. CARROLL (eds). **Principles of conservation biology**. Sinauer Associate, Sunderland. 729p., 1997.
- MIYAKI, C. Y. & ALVES, M. A. **Técnicas Genéticas Aplicadas à Conservação**; Biologia da Conservação: Essências; São Carlos:RiMa, pp. 357-384, 2006.
- MONNIN, T. & PEETERS, C.. Monogyny and regulation of worker mating in the queenless ant *Dinoponera quadriceps*. **Animal Behavior** 55:299-306, 1998.
- MONNIN, T. & PEETERS, C. Dominance hierarchy and reproductive conflicts among subordinates in a monogynous queenless ant. **Behavioral Ecology** 10(3):323-332, 1999.
- MORETTO, G. & ARIAS, M. C. Detection of Mitochondrial DNA Restriction Site Differences Between the Subspecies of *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Neotropical Entomology**, 34(3):381-385, 2005.
- MORITZ, R. F. A; HAWKINS, C. F.; CROZIER, R. H.; MACKINLAY, A. G. A Mitochondrial DNA polymorphism in honeybees (*Apis mellifera* L.). **Experientia**, 42:322-324, 1986.
- NEI, M. **Molecular Evolutionary Genetics**. Columbia University Press. New York, 1987.
- NYLANDER, J. A. A. **Mr. Modeltest v2. Progam**. Distributed by the author. Evolutionary Biology Centre. Uppsala University, 2004.
- PAIVA, R.V.S. & C.R.F. BRANDÃO. Nests, worker population, and reproductive status of workers, in the giant queenless ponerine ant *Dinoponera* Roger (Hymenoptera: Formicidae). **Ethology Ecology and Evolution**, 7: 297-312, 1995.
- PEAKALL, R. & SMOUSE, P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, 6:288-295, 2006.
- PEETERS, C. **Monogyny and polygyny in ponerine ants with or without queens**. Queen Number and Sociality in Insects, Oxford University Press, p. 235–261, 1993.
- PEETERS, C. & ITO, F. Colony dispersal and the evolution of queen morphology in social hymenoptera. **Annual Review of Entomology**, 46:601–630, 2001.

- PITTS, J. P.; McHUGH, J. V.; ROSS, K. G. Cladistic analysis of the fire ants of the *Solenopsis saevissima* species-group (Hymenoptera: Formicidae). **Zoologica Scripta**, 34:493-505, 2005.
- QUEIROZ, L. P. The Brazilian Caatinga: phytogeographical patterns inferred from distribution data of the leguminosae. In: **Neotropical Savannas and Dry Forests: Plant Diversity, Biogeography, and Conservation** (eds Pennington RT, Lewis GP, Ratter JA), pp. 121–157. CRC Press, New York, 2005.
- QUEK, S. P.; DAVIES, S. J.; ASHTON, P. S.; ITINO, T.; PIERCE, N. E. The geography of diversification in mutualistic ants: a gene's-eye view neogene history of Sundaland rain forest. **Molecular Ecology**, 16:2045-2062, 2007.
- RAMOS-ONSINS, S. E. & J. ROZAS. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. **Molecular Biology and Evolution** 19:2092-2100, 2002.
- RESENDE, H. C. **Filogeografia de *Dinoponera lucida* Emery (Hymenoptera: Formicidae) com base em DNA mitocondrial**; Dissertação de Mestrado, 55p, Universidade Federal de Viçosa- MG, 2008.
- ROCHA, P.L.B., **Uso e partição de recursos pelas espécies de lagartos das dunas do rio São Francisco, Bahia (Squamata)**, Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.
- RODRIGUES, M.T.U., **Lizards, snakes and amphisbaenians from the Quaternary and dunes of the middle Rio São Francisco: Bahia: Brazil**, J. Herpet., 30, 513, 1996.
- RODRIGUES, M.T.U., **Herpetofauna da caatinga**, in **Ecologia e Conservação da Caatinga**, Leal, I.R., Tabarelli, M., and Silva, J.M.C., Eds, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 181, 2003.
- RODRIGUES, M.T.U. & JUNCÁ, F.A. Herpetofauna of the Quaternary sand dunes of the middle Rio São Francisco: Bahia: Brasil. VII. *Tiphlops amoipira* sp. nov, a possible relative of *Tiphlops yonenagae* (Sepentes, Typhlopidae), **Papéis Avulsos de Zoologia**, São Paulo, 42, 325, 2002.
- ROSS, K. G.; GOTZEK, D.; ASCUNCE, M. S.; SHOEMAKER, D. D. Species delimitation: a case study in a problematic ant taxon. **Systematic Biology**. 59:1-23. 2009.
- ROSS, K.G.; KRIEGER, M.J.B.; SHOEMAKER, D.D.; VARGO, E.L.; KELLER, L. Hierarchical analysis of genetic structure in native fire ant populations: results from three classes of molecular markers. **Genetics**, 147:642–655, 1997.

- ROZAS, J.; SÁNCHEZ-DELBARRIO, J. C.; MESSEGUER, X.; ROZAS, R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics**. v. 19:2496-97, 2003.
- RÜPPELL O., STRÄTZ M., BAIER B., HEINZE J. Mitochondrial markers in the ant *Leptothorax rugatulus* reveal the population genetic consequences of female philopatry at different hierarchical levels. **Molecular Ecology** 12:795-801, 2003.
- SCHILDER, K., HEINZE J., GROSS R.; HÖLLDOBLER B. Microsatellites reveal clonal structure of populations of the thelytokous ant *Platythyrea punctata* (F. Smith) (Hymenoptera; Formicidae). **Molecular Ecology** 8:1497-1507, 1999.
- SEPPÄ P. & PAMILO, P. Gene flow and population viscosity in *Myrmica* ants. **Heredity**, 74:200–209, 1995.
- SILVESTRE, D. **Sequenciamento e análise do genoma mitocondrial de *Melípona bicolor* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)** Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo-SP, 128pp., 2002.
- SHOEMAKER, D. D.; AHRENS, M. E.; ROSS, K. G. Molecular phylogeny of fire ants of the *Solenopsis saevissima* species-group based on mtDNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 38: 200–215, 2006.
- SOUZA, D. J. Cortadeiras sob ameaça de destruição do hábitat e combate excessivo podem extinguir formigas. **Revista Ciência Hoje**, 222 (<http://ich.unito.com.br/4148>), 2005.
- SIMON, C.; FRATI, F.; BECKNBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America** 87:651-701, 1994.
- STADEN, R.; BEAL, K. F.; BONFIEL, J. K. The Staden package. **Methods in Molecular Biology**, 132:115-30, 1999.
- STREHL, C. P. & GADAU, J. Cladistic Analysis of Paleo-Island populations of the Florida harvester ant (Hymenoptera: Formicidae) based upon divergence of mitochondrial DNA sequences, **Florida Entomologist**, 87 (4), 2004.
- SUNDSTRÖM, L. Genetic population structure and sociogenetic organisation in *Formica truncorum* (Hymenoptera; Formicidae). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, 33:345–354, 1993.
- SWOFFORD, D. L. **PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony** (* and other methods), version 4.0b 10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 2002.

- SZALANSKI, A. L.; MCKERN, J. A.; SOLORZANO, C.; AUSTIN, J. W. Genetic Diversity of Ants (Hymenoptera: Formicidae) from the Ozark-St. Francis National Forest, Arkansas, USA. **Sociobiology**, Vol. 56, No. 3, 2010.
- TAJIMA, F. Simple methods for testing the molecular evolutionary clock hypothesis. **Genetics**, 135, 599-607, 1993.
- TAJIMA, F. Statistical methods for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics** 123:585-595, 1989.
- VASCONCELLOS, A.; SANTANA, G. G.; SOUZA, A. K. Nest spacing and architecture, and swarming of males of *Dinoponera quadriceps* (Hymenoptera: Formicidae) in a remnant of the Atlantic forest in northeast Brazil. **Brazilian Journal of Biology** 64(2): 357-362, 2004.
- VELLOSO, A. L.; SAMPAIO, E. V. S. B. PAREYN; **Ecorregiões Propostas para o Bioma Caatinga**, Recife: Associação Plantas do Nordeste; Instituto de Conservação Ambiental The Nature Conservancy do Brasil, 76p., 2001.
- VIRGINIER, B., C. PEETERS, L. BRAZIER, C. DOUMS. Very low genetic variability in the Indian queenless ant *Diacamma indicum*. **Molecular Ecology**. 13:2095-2100, 2004.
- WADE, M.J. & MCCAULEY, D. E. Extinction and recolonization: Their effects on the genetic differentiation of local populations. **Evolution**, 42:995–1005, 1988.
- WEINLICH, R., FRANCISCO, F. O., ARIAS, M. C. Mitochondrial DNA restriction and genomic maps of seven species of *Melipona* (Apidae: Meliponini). **Apidologie**, 35:365-370, 2004.

ANEXO 1

Protocolo de extração de DNA fenol-clorofórmio Raeda; Broda (1985)

- 1 – Macerar o tórax das formigas com nitrogênio líquido até que o corpo do animal se “pulverize” bem. (nós removemos as asas; recomenda-se também descartar o abdômen por causa de possíveis contaminantes no tubo digestivo, especialmente em fêmeas).
- 2 – Transferir o material resultante para um microtubo e acrescentar 1 ml de tampão de extração*.
- 3 – Adicionar 5 µL de proteinase K (20 µg/mL) em cada tubo.
- 4 – Verter várias vezes os tubos para homogeneizar.
- 5 – Colocar em banho Maria a 60 – 64°C por 2 horas, invertendo os tubos regularmente para homogeneização
- 6 – Adicionar 1 volume (o mesmo volume que tem no tubo) de tampão fenol (500 a 700 µl de acordo com a quantidade de tampão utilizada). Inverter várias vezes o tubo para homogeneizar.
- 7 – Centrifugar por 15 minutos a 10000 rpm.
- 8 – Transferir o sobrenadante para outro tubo
- 9 – Adicionar 1 volume de Clorofane (mesmo volume de sobrenadante retirado) inverter o tubo para homogeneizar. (Clorofane = fenol-clorofil 1:1).
- 10 – Centrifugar por 15 minutos a 10000 rpm
- 11 – Transferir o sobrenadante para um outro tubo
- 12 – Adicionar 1 volume (o mesmo volume) de Clorofil (mesmo volume de sobrenadante retirado). (clorofil = clorofórmio - álcool isoamílico 24:1).
- 13 – Centrifugar por 15 minutos a 10000 rpm.
- 14 – Transferir o sobrenadante para outro tubo e adicionar 10% do volume de NaCl 3M e 2,5 X o volume de etanol absoluto.
- 15 – Inverter suavemente o tubo e observar a precipitação do DNA.
- 16 – Se necessário (dependendo do tamanho do “pellet”) deixar no freezer (-20°C) por algumas horas (até 12 horas) antes da centrifugação.
- 17 - Tirar a amostra do freezer
- 18 – Centrifugar por 15 minutos a 12000 rpm.
- 19 – Desprezar o sobrenadante, vertendo o tubo.

- 20 – Lavar com etanol 70%, aproximadamente 70 μ L.
- 21– Centrifugar tubo invertido por 10 minutos à 12000 rpm.
- 22 – Verter o tubo para descartar o álcool.
- 23 – Deixar secar por mais ou menos 2 horas – temperatura ambiente (ou 15-20min em estufa à 40 °C) – os tubos deverão ser colocados em uma estante de preferência cobrir levemente com uma folha de papel toalha.
- 24 – Acrescentar em tampão T.E., cerca de 70-100 μ L de tampão por tubo (dependendo do tamanho do precipitado). POR NA GELADEIRA

* Tampão de extração = p/ preparar 10 mL de tampão de extração:

- ✓ 5mL de Tris-HCl pH 8,0 (1M)
- ✓ 400 μ L de EDTA (0,5 M)
- ✓ 20 μ L de NaCl (5M)
- ✓ 1mL de SDS 10%
- ✓ 3,58 mL de água MiliQ

ANEXO 2

Purificação de PCR utilizando PEG 8000

1. Verifique a qualidade do produto de PCR em gel de agarose.
2. Transfira, se necessário, o produto de PCR para um tubo de microcentrífuga de 0,5ml.
3. Adicione 1 volume de solução de PEG (PEG 8000 20% NaCl 2,5M) ao PCR.
4. Incube a 37°C por 30 minutos.
5. Centrifugue a 13.000 RPM por 20 minutos. Coloque os tubos fechados com a alça da tampa voltada para a parte externa do rotor (assim você saberá onde sedimentará p *pellet* já que não possível vê-lo).
6. Retire o sobrenadante com o auxílio de um micropipetador P20-200 SUAVEMENTE.
7. Adicione 125µl de etanol 80% gelado. Espere 1 minuto e centrifugue por 2 minutos a 13000 RPM.
8. Retire o sobrenadante com o auxílio de um micropipetador P20-200 SUAVEMENTE.
9. Repita os passos 7 e 8.
10. Deixe evaporar o etanol residual utilizando o banho seco, estufa ou deixe sobre a bancada. Cubra com papel higiênico para que não entre sujeira no tubo.
11. Ressuspenda o pellet entre 5 e 15 µl* de água Mili-Q fervida por pelo menos 2 horas (overnight de preferência). ***O VOLUME DE ÁGUA DEPENDERÁ DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DA PCR, AJUSTE CONFORME SUA NECESSIDADE.**
12. Quantifique o produto purificado em gel de agarose (2 µl).

Preparação do PEG

- PEG 20%
- 10g de Polietileno Glicol 8000
- 7,3g de NaCl (2,5M)
- Adicionar 40ml de água Mili-Q
- Mexer deixando o PEG em solução (20 minutos) colocar a bailarina
- Preencher até 50ml