



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS

Estudos Genético-Moleculares em Populações de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae): Comparação de Protocolos, Estimativas de Variabilidade e Estrutura Populacional no Sudoeste da Bahia, Brasil

Carla Faine Matos de Oliveira

Itapetinga-Bahia
Março, 2017

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais
Campus Universitário “Juvino Oliveira”
Itapetinga – BA. Cep: 45.700-000. Tel. (77) 3261-8631

Estudos Genético-Moleculares em Populações de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae): Comparação de Protocolos, Estimativas de Variabilidade e Estrutura Populacional no Sudoeste da Bahia, Brasil

Autora: Carla Faine Matos de Oliveira
Orientador: Prof. Dr. Carlos Bernard M. Cerqueira Silva
Coorientadoras: Dr^a Ana Gabriela Delgado Bieber e Dr^a Elisa Susilene Lisboa dos Santos

"Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS, no Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Área de concentração: Meio Ambiente e Desenvolvimento".

Itapetinga-Bahia
Março, 2017

577
O46e Oliveira, Carla Faine Matos de
Estudos Genético-Moleculares em Populações de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae): Comparação de Protocolos, Estimativas de Variabilidade e Estrutura Populacional no Sudoeste da Bahia, Brasil. / Carla Faine Matos de Oliveira. – Itapetinga, BA: UESB, 2017.
87fl.

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS, no Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Área de concentração: Meio Ambiente e Desenvolvimento. Sob a orientação do Prof. D.Sc. Carlos Bernard M. Cerqueira Silva e coorientação da Prof^a. D.Sc. Gabriela Delgado Bieber.

1. Caatinga - Genética de populações. 2. Floresta Estacional Semidecidual. 3. Saúva - Extração de DNA - ISSR. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, *Campus* de Itapetinga. II. Silva, Carlos Bernard M. Cerqueira. III. Bieber, Gabriela Delgado. IV. Título.

CDD(21): 577

Catálogo na Fonte:

Adalice Gustavo da Siva – CRB 535-5ª Região
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. Caatinga - Genética de populações
2. Floresta Estacional Semidecidual
3. Saúva - Extração de DNA - ISSR

“Vai ter com a formiga, ó preguiçoso; olha para os seus caminhos, e sê sábio”. Pv. 6:6

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ser o meu sustento e meu abrigo seguro em cada etapa da minha vida.

A todos meus familiares que estiveram constantemente me apoiando em todos os momentos, em especial aos meus pais, Ilsa (Mãe) e Erinaldo (Pai) por dedicarem a mim tanto amor e confiança, tudo que conquistei devo a vocês!

Ao meu esposo Gisback Figueiredo, por me ajudar nas correrias, nos vais e véns de Itapetinga-Conquista, dedicando amor e compreensão em todo tempo. Te amo!

Aos meus colegas do mestrado por compartilhar comigo momentos únicos de aprendizado e alegrias a cada almoço, viagens e reencontros. A minha querida amiga Tânia Dias foi um grande prazer te conhecer, você é uma mulher de Deus!

Aos meus orientadores Carlos Bernard M. Cerqueira Silva e Ana Gabriela D. Bieber por acreditarem que este trabalho seria desenvolvido com responsabilidade e pelas suas contribuições de excelência na minha formação como pesquisadora.

Aos professores que contribuíram preciosamente na construção deste trabalho Paulo Sávio, Elisa Lisboa, Claudia Bottcher, obrigada pelo auxílio durante a execução do trabalho, clareando as dúvidas e trazendo boas sugestões.

Aos amigos do grupo BIOGEN (Thalana, Tarcísio, Cibelle, Daniela, Samuel, Leonardo, Micael, Neidson, Larissa, Náttila) por cada momento que passamos juntos na realização do trabalho em campo e em laboratório. Obrigada por todo apoio e por tornar a rotina de laboratório mais leve! Desejo que vocês conquistem o sucesso a cada extração e PCRs e interpretação de dados! Amo vocês queridos!

Aos amigos do Laboratório de Biossistemática Animal (LBSA). Maysa, Jane, Vinícius, Gabriella valeu pela força em campo e montagens de espécimes, saudações mirmecológicas a vocês queridos!

As minhas meninas do PPGCA Daniele e Nilza que fazem seu trabalho carinhosamente, estando sempre dispostas a nos ajudar no que for preciso, obrigada minhas queridas!

A UESB pelo apoio logístico e a FAPESB pela concessão da bolsa de estudo.

A ICMbio por autorizar a coleta para que mais estudos sobre a espécie *Atta sexdens* fossem realizados no entorno da Floresta Nacional Contendas do Sincorá (FNCS).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	3
2.1 AS FORMIGAS CORTADEIRAS	3
2.3 IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA DAS FORMIGAS CORTADEIRAS	4
2.3 FORMIGAS CORTADEIRAS E SUA EXPANSÃO EM AMBIENTES ANTROPIZADOS	5
2.4 CAATINGA	7
2.4.1 FLORESTA NACIONAL CONTENDAS DO SINCORÁ (FNCS)	8
2.5 A FLORESTA ESTACIONAL (FES) OU “MATA DE CIPÓ	10
2.6. ESTUDOS GENÉTICOS MOLECULARES	12
2.6.1 GENÉTICA DE POPULAÇÕES	12
2.6.2 MARCADORES MOLECULARES	14
2.6.3 MARCADOR MOLECULAR: ISSR	16
2.6.4 ESTUDOS MOLECULARES APLICADOS À FORMIGAS CORTADEIRAS	17
2.6.5 FATORES EVOLUTIVOS EM FORMIGAS CORTADEIRAS	17
3. REFERÊNCIAS	21
4. CAPÍTULO I	34
COMPARAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DA ESPÉCIE <i>Atta sexdens</i> (HYMENOPTERA:FORMICIDAE)	
5. CAPÍTULO II	45
CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DE MARCADORES ISSR PARA ANÁLISE GENÉTICO-POPULACIONAL DE <i>Atta sexdens</i> (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)	
6. CAPÍTULO III	51
ESTIMATIVAS DE VARIABILIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE FORMIGAS CORTADEIRAS (<i>Atta sexdens</i>) PRESENTES EM DOIS FRAGMENTOS DE CAATINGA E “MATA DE CIPÓ” NO INTERIOR DA BAHIA, BRASIL.	
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
8. ANEXO 1	75
9. ANEXO 2	77
10. ANEXO 3	82

LISTA DE ABREVIACÕES

- AMOVA – Análise Molecular de Variância
- CTAB – Brometo de Cetrimônio (*Cetyl Trimethylammonium Bromide*)
- CB – Cabeça e Mesossoma
- CI – Corpo Inteiro
- FLC– Fazenda Lagoa das Covas, Contendas do Sincorá, Bahia
- FNCS - Floresta Nacional Contendas do Sincorá (FNCS), Contendas do Sincorá, Bahia
- ISSR – *Inter Simple Sequence Repeat*
- LBSA – Laboratório de Biossistemática Animal
- LGMA – Laboratório de Genética Molecular Aplicada
- NaCl– Cloreto de Sódio
- MPG– Mesossoma, Pernas e Gáster
- PCR – Reação em Cadeia de Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)
- PCoA - Análise de Coordenadas Principais (*Principal Coordinates Analysis*)
- PHIT - Valor de estruturação
- POP – População
- SDS – Solução de Dodecilsulfato de Sódio
- UESB – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
- UPGMA – Método de agrupamento não Ponderado baseado na média das distâncias

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1. DNA genômico da formiga cortadeira *Atta sexdens* obtido a partir de seis protocolos de extração P1 a P6 que correspondem respectivamente aos protocolos: Sunnucks e Hales (1996), Método modificado por Cerqueira-Silva (2009), Método modificado por Storchova et al. (2000), modificado por Russel et al. (2010), Mogg e Bond (2003), e Barnwell et al. (1998). Para a espécie *A. sexdens*, utilizou-se diferentes partes do corpo como fonte de tecido para extração ('CB – 'Cabeça'; MPG – 'Mesossoma, Pernas e Gáster'; CI – 'Corpo Inteiro'). O marcador de peso padrão (DNA Lambda não digerido) foi adotado nas concentrações de 200, 100 e 50 ng de DNA Lambda (Invitrogen).....24

Capítulo III

Figura 1- Área de ocorrência dos ninhos de *Atta sexdens* na zona de amortecimento da Floresta Nacional Contendas do Sincorá (FNCS), localizado em Contendas do Sincorá, Bahia. As populações estão dispostas na estrada que liga Contendas do Sincorá-Tanhaçu e também numa área na caatinga pertencente à Fazenda Lagoa das Covas (FLC).....41

Figura 2- Fragmento de “mata de cipó” ou Floresta Estacional Semidecidual localizado em Itapetinga, Bahia, com destaque para área de ocorrência das populações de *Atta sexdens*.....42

Figura 3- Estrutura genética dentro (*Within*) e entre (*Among*) as populações de *Atta sexdens* obtidos a partir da Análise Molecular de Variância (AMOVA) para as regiões: **(A)** região 1, área de caatinga (Fazenda Lagoa das Covas, zona de amortecimento da Floresta Nacional Contendas do Sincorá) e **(B)** região 2, a “mata de cipó” (Floresta Estacional Semidecidual); **(C)** metapopulação um, considerando que as populações localizam-se em apenas uma região (caatinga e “mata de cipó”) **(D)** e a metapopulação dois, adotando-se que as populações encontram-se em duas regiões separadas (caatinga e “mata de cipó”).....48

Figura 4- Dispersão das populações (ou seja, colônias) da formiga cortadeira *Atta sexdens* da região 1, área de caatinga (Fazenda Lagoa das Covas, zona de amortecimento da Floresta Nacional Contendas do Sincorá), baseada na análise de coordenadas principais (PCoA); **(A)** a diversidade genética entre as populações; **(B)** a diversidade genética dentro das populações representada por diferentes indivíduos..... 49

Figura 5- Dispersão das populações (ou seja, colônias) da formiga cortadeira *Atta sexdens* da região 2, a “mata de cipó” (Floresta Estacional Semidecidual), baseada na análise de coordenadas principais (PCoA); **(A)** a diversidade genética entre as populações; **(B)** a diversidade genética dentro das populações representada por diferentes indivíduos.....49

Figura 6- Dispersão das populações (ou seja, colônias) da formiga cortadeira *Atta sexdens* baseada na análise de coordenadas principais (PCoA). A dispersão teve por base a diversidade genética entre as populações que representam a metapopulação. As populações localizadas na região 1, área de caatinga (Fazenda Lagoa das Covas, zona de amortecimento da Floresta Nacional Contendas do Sincorá) estão representados pelos símbolos de cor azul (Código Pop1

– Pop17). As populações presentes na região 2, “mata de cipó” (Floresta Estacional Semidecidual) estão representados pelos símbolos de cor vermelha (Código Pop18 – Pop32).....50

Figura 7- Prováveis *pools* gênicos obtidos de acordo com o método descrito por Evanno *et al.* (2006), a partir de marcadores ISSR para as populações da formiga cortadeira *Atta sexdens* localizadas na região 1, área de caatinga (Fazenda Lagoa das Covas, zona de amortecimento da Floresta Nacional Contendas do Sincorá). **(A)** Estimativa de delta $K=3$ e com subestruturação em $K=2$ para as populações; **(B)** a distribuição de dois *pools* gênicos estimado para caatinga; **(C)** a distribuição de três *pools* gênicos estimado para caatinga. Cada população está representada por três amostras contendo um *mix* de cinco indivíduos, totalizando 51 amostras para a região 1.....51

Figura 8- Prováveis números de *pools* gênicos obtidos de acordo com o método descrito por Evanno *et al.* (2006), a partir de marcadores ISSR para as populações da formiga cortadeira *Atta sexdens* localizadas na região 2, “mata de cipó” (Floresta Estacional Semidecidual). **(A)** Estimativa de delta $K=4$ para as populações; **(B)** a distribuição de quatro *pools* gênicos estimados para “mata de cipó”. Cada população está representada por três amostras contendo *mix* de cinco indivíduos, totalizando 45 amostras para região 2.....52

Figura 9- Padrão de distribuição dos prováveis *pools* gênicos para as populações da formiga cortadeira *Atta sexdens* obtido de acordo com o método descrito por Evanno *et al.* (2006). A estimativa foi realizada adotando-se 32 populações para a metapopulação, correspondendo à 17 populações da caatinga (Fazenda Lagoa das Covas, zona de amortecimento da Floresta Nacional Contendas do Sincorá) e 15 pertencente à “mata de cipó” (Floresta Estacional Semidecidual). Cada população está sendo representada por três amostras com cinco indivíduos (93 amostras). A metapopulação apresentou a existência de dois *pools* (A) e a possibilidade de subestruturação para três (A) e quatro *pools* gênicos (histograma não apresentado para esta última estimativa).....53

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1- Média geral da quantificação espectrofotométrica das extrações realizadas com seis protocolos (*descrição no texto) utilizando os diferentes tecidos da espécie *Atta sexdens*: Cabeça (CB), Mesossoma, Pernas e Gáster (MPG), Corpo Inteiro (CI). Para a obtenção desses valores foram realizadas três leituras em cada repetição (fonte de tecido x protocolo) e posteriormente calculou-se a média. Considerou-se o valor de absorbância das razões $A_{260/280}$ para estimativa da pureza das amostras.....27

Capítulo II

Tabela 1. Descrição do padrão de amplificação observado a partir de 23 marcadores ISSR em amostras de DNA genômico da formiga cortadeira *Atta sexdens*.....35

Capítulo III

Tabela 1- Genotipagem realizada a partir de seis marcadores ISSR aplicados em estudos de diversidade genética para a espécie *Atta sexdens* localizadas na caatinga (Fazenda Lagoa das Covas, zona de amortecimento da FNCS) e “mata de cipó” (Floresta Estacional Semidecidual).....46

Tabela 2. Principais valores de estruturação (Phit) observados a partir da Análise Molecular de Variância (AMOVA) para os pares de Populações (P) da formiga cortadeira *Atta sexdens* localizadas na região 1, área de caatinga (Fazenda Lagoa das Covas, zona de amortecimento da FNCS), na região 2 área de “mata de cipó” (Floresta Estacional Semidecidual) e metapopulação. Os valores de (Phit) maiores que 0,25 indicam estruturação nas populações..... 47

RESUMO

Atta sexdens (Hymenoptera: Formicidae) é uma formiga cortadeira conhecida por seu hábito de cortar folhas para o cultivo do fungo simbiote. Em ambientes antropizados, tendem a ocorrer em maior densidade de ninhos o que influencia consideravelmente a intensidade de sua atividade forrageadora tornando-as pragas agrícolas. A presença dessa espécie em ambiente antropizados tem ocasionado mudanças de importância ecológica e econômica, fato que impulsiona o interesse por estudos ecológicos e genético-moleculares com vistas ao entendimento das populações de formigas cortadeiras. Com o intuito de contribuir para o avanço de estudos genéticos para a espécie *A. sexdens* este trabalho teve como objetivo gerar subsídios metodológicos e informações genético-moleculares que possibilitem compreender a variabilidade e a estrutura genética de populações de *A. sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em diferentes fragmentos no sudoeste da Bahia.

Inicialmente para a obtenção de DNA genômico de *Atta sexdens* foram testados seis protocolos de extração de DNA genômico disponíveis na literatura e já adotados por vários grupos de pesquisas para diferentes espécies vegetais, a saber: Sunnucks e Hales (1996), método modificado por Cerqueira-Silva (2009), método modificado por Storchova *et al.* (2000), método modificado por Russel *et al.* (2010), Mogg e Bond (2003) e Barnwell *et al.* (1998), adotando-se como P1, P2, P3, P4, P5 e P6, respectivamente. Para essa etapa, verificou-se a influência da utilização de diferentes partes do corpo da formiga ('Cabeça'; 'Mesossoma, Pernas e Gáster'; e 'Corpo Inteiro'). Este estudo comprova a eficiência de três protocolos (P1, P4 e P5) de extração dentre os seis que foram testados com destaque para os tecidos 'Mesossoma, Pernas e Gáster' e 'Corpo Inteiro', que possibilitaram a obtenção de maior quantidade e qualidade de DNA de *A. sexdens*.

Após a etapa de extração iniciou-se a fase de caracterização do padrão de amplificação de 23 marcadores ISSR e a seleção do conjunto de marcadores que potencializasse o sucesso de estudos genético-populacionais para *A. sexdens*. Dentre os 23 marcadores ISSR testados 17 geraram produtos de amplificação (sendo 12 destes marcadores classificados como —tipo ideal e 5 como —tipo razoável). O percentual de polimorfismo variou entre 0% e 100%. Os resultados atestam que os 17 marcadores ISSR selecionados apresentam um grau de polimorfismo considerável e, portanto, são adequados para estudos de diversidade genética em formigas cortadeiras, especialmente para *A. sexdens*.

Por fim a diversidade genética de *Atta sexdens* foi acessada através de seis marcadores ISSR em 32 ninhos, aqui entendidas como populações, sendo 17 pertencem à região 1, fragmento de caatinga localizado na Fazenda Lagoa das Covas (FLC), zona de amortecimento da Floresta Nacional Contendas do Sincorá (FNCS), Contendas do Sincorá, Bahia; e as outras 15 populações pertencem à região 2, fragmento de Floresta Estacional Semidecidual ou “mata de cipó”, em Itapetinga, Bahia. Neste estudo cada população foi representada por um conjunto de 15 formigas. Os resultados mostraram que a genotipagem das populações gerou um total de 49 marcas, das quais 85% foram polimórficas. A análise molecular de variância apresentou elevados valores de estruturação (maior que 0,25) para ambas as regiões (média de 0,47 e 0,74 para as regiões 1 e 2, respectivamente), bem como para a metapopulação (média de 0,81); na Análise de variância molecular (AMOVA) foi obtido um nível elevado de diversidade intrapopulacional para caatinga (84%), “mata de cipó” (71%), metapopulação com uma região (73%) e duas regiões (69%). De acordo com a análise bayesiana, as regiões estudadas são individualmente compostas por diferentes pools gênicos distintos (caatinga K=3, com subestrutura em K=2; “mata de cipó” K=4; metapopulação K=2, com subestrutura em K=3 e K=4). A análise bayesiana revelou que as regiões estudadas pertencem a origens genéticas diferentes e por sua vez, a variação de *pools* em cada população indica a estruturação nas regiões. Em síntese, os resultados obtidos neste estudo de diversidade genética das populações de *Atta sexdens*, permitem concluir que as amostras da “mata de cipó” indicaram maior grau de estruturação que a caatinga. Apesar das regiões estudadas compartilharem características genéticas em comum, elas não compõem uma metapopulação, pois as regiões encontram-se relativamente isoladas geograficamente. A diversidade genética intrapopulacional encontrada para *A.sexdens* é provavelmente influenciada pelo acasalamento poliândrico em ação conjunta com outros fatores, tais como a dispersão e o fluxo gênico que ocorre entre as populações em cada fragmento estudado.

Palavras chave: caatinga, extração de DNA, Floresta Estacional Semidecidual, genética de populações, ISSR, saúva.

ABSTRACT

Atta sexdens (Hymenoptera: Formicidae) is a leafcutter ant known for its habit of cutting leaves for the cultivation of the symbiotic fungus. In anthropic environments, they tend to occur in higher nest density, which considerably influences the intensity of their foraging activity, making them agricultural pests. The presence of this species in anthropic environment has caused changes of ecological and economic importance, a fact that promotes interest in ecological and genetic-molecular studies with a view to understanding the populations of leaf-cutting ants. In order to contribute to the advancement of genetic studies for the species *A. sexdens*, this work had as objective to generate methodological subsidies and genetic and molecular information to understand the variability and genetic structure of populations of *A. sexdens* (Hymenoptera: Formicidae), contributing Thus for the understanding of the distribution patterns of this species in different fragments in the Southwest in the Southwest of Bahia.

Initially to obtain genomic DNA from *Atta sexdens*, six genomic DNA extracting protocols were tested in the literature and already adopted by several research groups for different plant species, namely Sunnucks and Hales (1996), a method modified by Cerqueira-Silva (2009), method modified by Storchova et al. (2000), a method modified by Russel et al. (2010), Mogg and Bond (2003) and Barnwell et al. (1998). In addition, the influence of the use of different parts of the body of the ant ('Head', 'Mesosome, Legs and Gáster' and 'Full Body') was verified. In this study the protocols mentioned above were identified, respectively, as P1, P2, P3, P4, P5 and P6. This study confirms the efficiency of three extraction protocols (P1, P4 and P5) among the six that were tested with special emphasis on 'Mesosome, Pernas and Gáster' and 'Full Body' tissues, which allowed obtaining a greater quantity and quality Of *A. sexdens* DNA.

After the extraction phase, the characterization stage of the amplification pattern of 23 ISSR markers was started and the selection of the marker set that potentiated the success of genetic-population studies of *A. sexdens*. Among the 23 ISSR markers tested, 17 generated amplification products (12 of these markers being classified as an ideal type and 5 as a reasonable type). The percentage of polymorphism ranged from 0% to 100%. The results confirm that the 17 selected ISSR markers present a considerable degree of polymorphism and are therefore suitable for studies of genetic diversity in leaf-cutting ants, especially for *A. sexdens*.

Finally, the genetic diversity of *Atta sexdens* was accessed through six ISSR markers in 32 nests, here understood as populations, being 17 belonging to region 1, a fragment of caatinga located in the Fazenda Lagoa das Covas (FLC), buffer zone of Contendas do Sincorá National Forest (FNCS), located in the municipality of Contendas do Sincorá, Bahia; And the other 15 populations belong to region 2, fragment of Seasonal Semideciduous Forest or "mata de cipó" located in Itapetinga, Bahia. In this study, each population was represented by a set of 15 ants. Our results showed that the genotyping of the populations generated a total of 49 marks, of which 85% were polymorphic. The molecular analysis of variance showed high structuring values for both regions (mean 0.47 and 0.74 for regions 1 and 2, respectively), as well as for metapopulation (mean 0.81); In the analysis of molecular variance (AMOVA) a high level of intrapopulation diversity was obtained for caatinga (84%), "mata de cipó" (71%), metapopulation with one region (73%) and two regions. According to the Bayesian analysis, the studied regions are individually composed of different distinct gene pools (caatinga $K = 3$, with substructure in $K = 2$; "mata de cipó" $K = 4$; metapopulation $K = 2$, with substructure in $K = 3$ and $K = 4$). In summary, the results obtained in this study of genetic diversity of the populations of *Atta sexdens*, allow to conclude that the samples of the

"mata de cipó" indicated a greater degree of structuring than the caatinga. Although the studied regions share common genetic characteristics, they do not make up a metapopulation because the regions are relatively geographically isolated. The intrapopulation genetic diversity found for *A. sexdens* is probably influenced by polyandric mating in conjunction with other factors, such as the dispersion and gene flow that occurs between populations in each fragment studied.

Keywords: caatinga, DNA extraction, Seasonal Semideciduous Forest, genetics of populations, ISSR, saúva.

1. INTRODUÇÃO

As formigas (Hymenoptera: Formicidae) compreendem um grupo de insetos cuja ocorrência é generalizada em todo o globo e apresentam uma alta diversidade de espécies (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Entretanto, as formigas não ocorrem nos pólos, em algumas ilhas oceânicas e em regiões de elevadas altitudes, como por exemplo, acima de 2.400 metros (WARD, 2006).

Os formicídeos constituem um dos grupos de maior sucesso dentre os animais invertebrados (WILSON, 1987), sendo uma grande parte deste grupo atualmente classificada dentro da tribo Attini, representada por 45 gêneros, dentre os quais podemos destacar os dois gêneros das formigas cortadeiras: *Atta* e *Acromyrmex* (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990, 2010; BOLTON, 2014; WARD *et al.*, 2014). Dentro da tribo Attini, as formigas cortadeiras formam um grupo monofilético com outros 14 gêneros cultivadores de fungos (WARD *et al.*, 2014).

Os gêneros *Atta* (17 spp.) e *Acromyrmex* (32 spp.) (Myrmicinae: Attini) (BOLTON, 2014) apresentam-se distribuídos exclusivamente na região Neotropical (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990; WIRTH *et al.*, 2003) e são conhecidos por cultivarem fungos para sua alimentação. Para desempenhar essa atividade forrageiam em busca de folhas, flores e frutos com o objetivo de corte e coleta desses materiais para manter um substrato adequado para o cultivo do fungo e assim a sobrevivência da colônia (WEBER 1972, 1982).

As formigas cortadeiras do gênero *Atta* são conhecidas popularmente como saúvas e apresentam no território brasileiro nove espécies pertencentes ao grupo (BACCARO *et al.*, 2015). *Atta sexdens* é dentre as *Atta*, a espécie de maior distribuição geográfica (BORGMEIER, 1959; DELABIE *et al.*, 2011), causadora de danos à pastagens e agricultura (DELLA LÚCIA, 1993), além de ser capaz de invadir ambientes modificados tais como estradas, áreas fragmentadas, clareiras e florestas secundárias (VASCONCELOS *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2009).

No sudoeste da Bahia, ninhos de *Atta sexdens* têm sido observados frequentemente no fragmento de caatinga pertencente à Fazenda Lagoa das Covas (FLC), zona de amortecimento da Floresta Nacional de Contendas do Sincorá (FNCS) em Contendas do Sincorá. Desde então, vem sendo realizados estudos ecológicos relacionados à dieta (OLIVEIRA, 2012), forrageamento (CARMO, 2012), à distribuição de ninhos e comportamento da espécie nessa área antropizada (CRUZ, 2015).

Segundo Cruz (2015), à elevada densidade de colônias de *Atta sexdens* na zona de amortecimento da FNCS, pode ser influenciado por características da vegetação e da paisagem que favorecem o desenvolvimento e crescimento de suas colônias nesses ambientes. A autora, ao realizar testes de agressividade entre indivíduos de colônias diferentes, percebeu que houve um reconhecimento ou tolerância entre as colônias (isto é, falta de agressividade), sugerindo um grau de parentesco alto entre as várias colônias estudadas na zona de amortecimento da FNCS.

No município de Itapetinga, Ba, também foram encontradas colônias de *Atta sexdens* no fragmento de Floresta Estacional Semidecidual (ou “mata de cipó”). No entanto, até o momento não há conhecimento de estudos ecológicos ou genético populacionais realizado para *A. sexdens* nessa área.

As formigas cortadeiras têm sido o foco de inúmeras pesquisas científicas, principalmente, envolvendo sua relação ecológica com o fungo simbiótico, bem como estudos que investigam as modificações causadas pelas mesmas em ambientes naturais e antropizados. Nos últimos anos, com o aprimoramento da biologia molecular os estudos populacionais com formigas cortadeiras têm complementado os estudos ecológicos, uma vez que, estão sendo destinados a: mensuração da diversidade biológica (HELMKAMPF, GADAU & FELDHAAR, 2008; CANTAGALLI *et al.*, 2013; REIS *et al.*, 2014), embasamento do mutualismo existente com seus fungos cultivados (SCHULTZ & MEIER, 1995; SHULTZ & BRADY, 2008; MEHDIABADI & SCHULTZ, 2009; SUEN, *et al.*, 2011), abordagem de suas características evolutivas (WILSON & NOWAK, 2014) e a influência da diversidade genética sobre o comportamento destes insetos (CONSTANT *et al.*, 2012).

Os estudos genético-moleculares com formigas cortadeiras podem fazer uso de diferentes métodos de extração conforme descrito na literatura (SAGHAI-MAROOF, 1984; SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989; DOYLE E DOYLE, 1990; WALSH *et al.*, 1991; YU *et al.*, 1993; CHEUNG *et al.*, 1993; OLERUP & ZETTERQUIST, 1994; WALDSCHMIDT *et al.*, 1997) bem como, o uso de diferentes marcadores moleculares para estudos genético-populacionais (FALEIRO, 2007). Dentre os marcadores existentes, os ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeat*) são vantajosos por apresentar caráter arbitrário podendo ser aplicáveis para qualquer espécie, uma vez que não exigem o prévio sequenciamento do DNA genômico da espécie em estudo para a construção do marcador (ZIETKIEWICZ *et al.*, 1994; FALEIRO, 2007).

Apesar da empregabilidade vantajosa dos ISSR nas mais variadas espécies, a maioria dos estudos realizados com esses marcadores têm sido realizados com plantas, sendo também empregados em insetos, porém são incipientes os estudos genéticos utilizando esses marcadores especificamente para o grupo das formigas cultivadoras de fungo. Na literatura, até o momento, registra-se apenas o estudo realizado por Reis *et al.* (2014) que fez uso de marcadores ISSR para análise da estrutura populacional da formiga cortadeira *Atta robusta*, uma espécie endêmica das restingas do Rio de Janeiro e Espírito Santo e ameaçada de extinção.

Nesse contexto, o objetivo desta dissertação é gerar subsídios metodológicos e informações genético-moleculares que possibilitem compreender a variabilidade e a estrutura genética de populações de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) que reside em diferentes fragmentos no sudoeste da Bahia.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 AS FORMIGAS CORTADEIRAS

Historicamente, a tribo Attini incluía apenas gêneros de formigas cultivadoras de fungos, sendo no total 16 gêneros (WILSON, 1986; HÖLLDOBLER & WILSON, 1990; BOLTON, 2014). No entanto, em recente revisão filogenética da subfamília Myrmicinae, Ward *et al.* (2014) incluíram nesta tribo outros 29 gêneros que não possuem o hábito de cultivar fungos simbioses dentro de seus ninhos, incluindo o gênero hiperdiverso *Pheidole*, que ocorre nos cinco continentes e engloba mais de 1000 espécies. Mesmo assim, o grupo dos cultivadores de fungos continua sendo monofilético dentro da tribo Attini (WARD *et al.*, 2014).

As formigas cultivadoras de fungo da tribo Attini, continuam para fins práticos sendo divididos em dois grupos, attines basais e derivadas (SOSA-CAVO *et al.*, 2013; WARD *et al.*, 2014). O primeiro destaca-se por coletar carcaças e fezes secas de insetos, além de matéria vegetal morta, como fonte de alimento para o fungo. O segundo apresenta espécies capazes de cortar folhas e flores frescas para servir de substrato para cultivar o fungo, possibilitando a formação de ninhos maiores quando comparados com ninhos de Attinis basais, com a capacidade de abrigar milhões de indivíduos o que influencia na intensidade do forrageamento (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990). Deste grupo derivado fazem parte apenas dois gêneros: *Atta* e *Acromyrmex* (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990; SCHULTZ & BRADY, 2008; SOSA-CAVO *et al.*, 2013).

Na relação mutualística entre o grupo das cortadeiras e seu jardim de fungo, todas as larvas e as formigas adultas são alimentadas pelo fungo cultivado. Registra-se que além do consumo do próprio fungo as formigas adultas possam recorrer a outro tipo de alimentação, como por exemplo, a seiva exsudada das plantas cortadas (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990). Por sua vez, o fungo pode ser beneficiado por receber proteção contra patógenos dentro da colônia e pela dispersão que ocorre quando a rainha carrega dentro de sua cavidade infrabucal micélios de fungo que farão parte da nova colônia. Dessa forma, há um benefício mútuo entre a colônia de formigas e o fungo simbiote (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990).

Por desempenhar o papel de cortar folhas e flores, as formigas cortadeiras destacam-se como pragas ou herbívoros dominantes nos Neotrópicos (FOWLER *et al.*, 1989; HÖLLDOBLER & WILSON, 1990; LEAL *et al.*, 2014). A seleção de plantas adequadas para

o cultivo de fungo pelas cortadeiras é complexa e não se faz de qualquer maneira, existindo processos que envolvem desde a avaliação de múltiplos caracteres da planta, fatores induzidos pelo ambiente até a história de forrageamento individual das formigas (LEAL *et al.*, 2014).

Por outro lado, elas também são consideradas como engenheiras do ecossistema (LEAL *et al.*, 2014), pois são capazes de modificar o ambiente desde o início da construção de seus ninhos até a sua permanência com atividade de carregamento de material vegetal para dentro do solo. Nessas condições, o solo passa por alterações físico-químicas capazes de determinar os padrões da vegetação associada aos ninhos (FARJI-BRENNER, 1992; CORRÊA *et al.*, 2010; LEAL *et al.*, 2014). Sabe-se que o estudo de fatores ambientais que determinam a distribuição de formigas cortadeiras é importante para entender os processos que regem a estrutura de ecossistemas nos quais elas estão presentes (SILVA *et al.*, 2011).

2.2 IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA DAS FORMIGAS CORTADEIRAS

As formigas cortadeiras são capazes de alterar o ambiente mais do que qualquer outro grupo animal invertebrado (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990). Essa alteração se deve inicialmente pela construção de seus ninhos, processo de escavação cujo descarte dos grãos do solo resulta na elevação de terra sobre o ninho (murundu). Internamente, os ninhos das formigas do gênero *Atta* podem chegar a profundidades de vinte metros e larguras variáveis apropriadas para suportar milhões de indivíduos numa colônia (WEBER, 1972; HÖLLDOBLER & WILSON, 1990).

Cada ninho de *Atta* pode apresentar vários orifícios de contato com o ambiente externo, que por sua vez, servirão de entrada de ar para o controle da temperatura interna. É por estes orifícios que ocorre a retirada de resíduos de dentro da colônia, bem como, alguns destes orifícios funcionam como local de entrada e saída das formigas para o forrageamento (SILVA, 2008; HÖLLDOBLER & WILSON, 2010; CARMO, 2012).

A presença das formigas cortadeiras pode trazer impactos positivos sobre a estrutura físico-química do solo, ajudando na aeração e ciclagem de nutrientes (FARJI-BRENNER, 1992; BACCARO *et al.*, 2015). Estas engenheiras do ecossistema modificam ambientes de floresta relativamente intactos, aumentando a entrada de luz nos locais em que se estabelecem e auxiliando na formação de ambientes mais heterogêneos. Assim, sua atividade e distribuição

acabam afetando positivamente o estabelecimento de algumas espécies vegetais, bem como a ocorrência de outras espécies animais (DALLING & WIRTH, 1998; WIRTH *et al.*, 2003).

Os efeitos benéficos das formigas cortadeiras no ambiente se estendem até mesmo quando uma colônia deixa de existir num determinado local, pois o ninho inativo poderá se tornar um local livre de competição, com maior luminosidade ao nível do solo e apresentando câmaras subterrâneas com alta concentração de nutrientes, o que representa condições ideais para o estabelecimento de plantas (PERFECTO & VANDERMEER, 1993; FARJI-BRENER & ILLES, 2000; MOUTINHO *et al.*, 2003).

2.3 FORMIGAS CORTADEIRAS E SUA EXPANSÃO EM AMBIENTES ANTROPIZADOS

Algumas espécies animais se adaptam melhor a um novo ambiente do que outras e ao ser identificado os parâmetros que auxiliam no processo de dispersão, estabelecimento, persistência e invasão de uma dada população é possível entender as consequências desta sobre o ecossistema das comunidades invadidas, inclusive quando os invasores se tornam pestes (WILLIAMSOM, 1996). As formigas representam um grupo de sucesso ecológico em vários ambientes terrestres e se destacam pela sua abundância, tamanho populacional e riqueza de espécies (WILSON, 1987; WARD *et al.*, 2006). Tais fatores são cruciais na colonização e algumas espécies de formigas destacam-se por invadir ambientes antropizados (FARJI-BRENNER & CORLEY, 1998).

No caso particular das formigas cortadeiras, algumas espécies têm sido consideradas invasoras de áreas como estradas, pois facilitam o estabelecimento e a expansão das colônias (VASCONCELOS *et al.*, 2006) sendo comum sua presença em habitats como florestas secundárias, pastagens e campos agrícolas (WEBER, 1966; FARJI-BRENER & RUGGIERO, 1994).

Nestes ambientes antropizados, observa-se um aumento do número de ninhos de formigas cortadeiras e uma redução da área de forrageamento de cada colônia (SILVA *et al.*, 2012). Conseqüentemente, ocorre um aumento nos níveis de herbivoria nestas áreas, comprometendo assim o processo de sucessão ecológica nessas comunidades vegetais (SILVA *et al.*, 2009). Dadas as possíveis mudanças ambientais, pode-se destacar que os

ninhos de cortadeiras nesses ambientes podem alterar a abundância de outros organismos e também a trajetória sucessional da vegetação a nível ecossistêmico (LEAL *et al.*, 2014).

Mesmo que os ambientes antropizados sejam favoráveis à presença das formigas cortadeiras (FARJI-BRENER & RUGGIERO, 1994), existem algumas restrições alimentares relacionadas aos parâmetros físico-químicos da vegetação (FOWLER & STILES, 1980). No geral as cultivadoras de fungos rejeitam plantas que apresentem dureza foliar, tricomas, látex (STRADLING, 1978), e plantas com baixo teor de água nas folhas (CHERRETT, 1972). Além disso, as formigas cortadeiras preferem coletar partes de plantas jovens por possuírem menos compostos secundários (VASCONCELLOS, 1990) e por apresentarem as suas partes vegetais mais tenras (CHERRETT, 1972).

Em ambientes cuja oferta de recurso é favorável ao forrageamento das formigas cortadeiras, esses insetos são capazes de devastar a vegetação próxima a seus ninhos (WIRTH *et al.*, 2003; 2007) e por esse motivo passam a serem consideradas como pragas aos sistemas agrícolas e florestais (DELLA LUCIA, 1993). Dentre as espécies de maior importância econômica por impactar negativamente as áreas de cultivos, destaca-se principalmente *Atta sexdens* (Linnaeus, 1758) (saúva-limão), seguida por *Atta laevigata* (Smith, 1858) (saúva-cabeça-de-vidro), *Acromyrmex rugosus* (Smith, 1858), *Acromyrmex niger* (Smith, 1858), *Acromyrmex crassispinus* (Forel, 1939), *Acromyrmex balzani* (Emery, 1890), e *Acromyrmex landolti* (Forel, 1885) (BOARETO; FORTI, 1997; RANDO; FORTI, 2005).

A presença de cortadeiras no ambiente é ideal para entender a intensidade de seus impactos sobre a paisagem (WIRTH *et al.*, 2007). Atualmente, estudos têm abordado os efeitos da presença de formigas cortadeiras em ambientes antropizados e a sua maioria têm sido realizado em florestas tropicais úmidas como a mata Atlântica (WIRTH, *et al.*, 2007; MEYER *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2013) e a Amazônia (VASCONCELOS & CHERRETT, 1995; MOUTINHO *et al.*, 2003; DOHM *et al.*, 2011; CARVALHO *et al.*, 2012). Na Caatinga ainda pouco se sabe sobre os efeitos das formigas cortadeiras em ambientes antropizados, embora estudos sobre a dieta alimentar (OLIVEIRA, 2012), o forrageamento (CARMO, 2012) e a densidade de ninhos (CRUZ, 2015) tenham sido recentemente realizados. Em áreas de transição entre os biomas mata Atlântica e Caatinga, cuja vegetação é conhecida popularmente como ‘mata de cipó’ no Sudoeste baiano, esses registros são ainda inexistentes.

2.4 CAATINGA

A Caatinga é um ecossistema exclusivamente brasileiro, caracterizado pela presença de arbustos espinhosos e trechos de florestas secas na maior parte do ano (LEAL *et al.*, 2005) e se estende por cerca de 800.000 km² de região semiárida, principalmente no Nordeste do Brasil (IBGE, 1985). Essa extensão geográfica ocupada pela Caatinga equivale a cerca de 11% do território nacional e ocupa cerca de 54% da região Nordeste (ALVES *et al.*, 2009). Sua abrangência é desde o estado do Piauí até o norte de Minas Gerais, região Sudeste do Brasil (ANDRADE-LIMA, 1954). O nome “caatinga” é de origem Tupi-Guarani e significa floresta branca, pois a região se caracteriza pelo aspecto seco e esbranquiçado da vegetação e também pela perda de suas folhas devido aos longos períodos de seca (PRADO, 2003).

O domínio da Caatinga estende-se por diversas formações geológicas de bacias sedimentares, montanhas e platôs (IBGE, 1985). Sua precipitação média anual varia entre 240 e 1.500 mm, sendo que em geral metade da região recebe menos de 750 mm e algumas áreas centrais menos de 500 mm (SAMPAIO, 1995; PRADO, 2003). Além disso, cerca de 50 a 70% das chuvas na Caatinga são concentradas em três meses consecutivos, apesar de haver uma alta variação anual e dos longos períodos de seca serem frequentes (NIMER, 1972).

Em geral, a vegetação que compõe a Caatinga apresenta espécies lenhosas arbóreas (8 a 12 metros), arbustivas (2 a 5 metros), bem como herbáceas (abaixo de 2 metros) (RIZZINI *et al.*, 1988; COIMBRA-FILHO & CÂMARA, 1996). Há também uma vegetação conhecida como brejos de altitude que ocupam áreas mais úmidas como topos das chapadas e serras (ANDRADE-LIMA, 1982; PRADO, 2003). Esse mosaico vegetacional apresenta variação em sua estrutura condicionada por fatores como topografia, precipitação média anual e atributos do solo e também pela perturbação humana (SAMPAIO, 1995; PRADO, 2003).

Nos últimos anos, houve uma redução da densidade arbórea devido à ocupação desordenada do solo e o uso insustentável dessa vegetação para fins de atividades como a construção de casas, fazendas e pecuária (COIMBRA-FILHO & CÂMARA, 1996; PRADO, 2003). Um estudo feito recentemente na Caatinga revela que entre os anos de 1990 a 2010 a Caatinga perdeu 9 milhões de hectares (90.000km²) de vegetação nativa devido a práticas de desmatamento, expansão agropecuária e ao uso de árvores nativas como fonte de energia (lenha) em residências e em pequenas indústrias (BEUCHLE *et al.*, 2015). Outra atividade que aumenta as taxas de desmatamento é a agricultura itinerante cuja ocupação territorial desordenada leva à redução significativa da biodiversidade regional (MMA, 2002).

Durante anos a Caatinga foi considerada como uma região pobre em espécies e endemismos (ANDRADE-LIMA, 1982) e estudos posteriores demonstram que isso não é verdadeiro (CASTELLETTI *et al.*, 2003; LEAL *et al.*, 2003). Devido às condições secas deste bioma, muitas espécies ao longo do tempo desenvolveram características morfológicas e fisiológicas que lhes permitiram a adaptação nesse tipo de ambiente.

Atualmente, reconhece-se um total de 1.981 espécies de plantas, 143 espécies de mamíferos, 510 espécies de aves, 239 espécies de peixes, 167 espécies de anfíbios e répteis, 187 espécies de abelhas (LEAL *et al.*, 2003; ALBUQUERQUE *et al.*, 2010) e pelo menos, 173 espécies de formigas (ULYSSEÁ & BRANDÃO, 2013). Apesar de ainda haver poucos estudos relacionados à biodiversidade na Caatinga, registra-se um elevado número de espécies endêmicas vegetais (com 34% para as espécies vegetais lenhosas e suculentas) e animais (de 3% para aves até 57% para peixes) (LEAL *et al.*, 2005).

Muito embora esses dados sugiram a importância ecológica da Caatinga, este é um dos biomas brasileiros mais ameaçados e alterados por ação antrópica, principalmente pelo desmatamento que levou à degradação da vegetação e deixou os solos sob intenso processo de desertificação (CASTELLETTI *et al.*, 2003).

A Caatinga apresenta menos de 40% de sua área original (ALMEIDA *et al.*, 2014), sendo que deste total, apenas 14,6% encontra-se protegida por Unidades de Conservação e 2% está resguardada por unidades de Proteção Integral, tais como, Parques Nacionais, Reservas Biológicas e Estações Ecológicas, que são as mais restritivas à intervenção humana (HAUFF, 2010). Embora algumas políticas ambientais venham sendo empregadas na maioria dos estados que possuem remanescentes de Caatinga vale ressaltar que uma parte das unidades de proteção integral encontram dificuldades na implementação, fato que contribui para que este bioma seja um dos menos protegidos do país (MMA, 2002).

2.4.1 FLORESTA NACIONAL CONTENDAS DO SINCORÁ (FNCS)

A Floresta Nacional Contendas do Sincorá (FNCS) possui 11.034,3 hectares de vegetação de caatinga, a qual está situada em uma microrregião da Chapada Diamantina, no município de Contendas do Sincorá, Bahia (BRASIL, 2006).

A região em que está inserida a FNCS possui uma altitude que varia entre 295m e 580m. O clima é semi-árido caracterizado por uma média anual da temperatura de 23°C, com

índices baixos de umidade, de precipitação (média anual de 596 mm) e de estresse hídrico. Quanto ao tipo de solo, a maior parte da FNCS e de sua zona de amortecimento está inserida na classificação Argissolos, mas há uma pequena parte da porção sudeste da zona de amortecimento que apresenta Latossolos (BRASIL, 2006).

A vegetação da região é decidual e xerófila, constituída de vários tipos fitofisionômicos: caatinga arbórea arbustiva, caatinga arbustiva fechada e complexo herbáceo - arbustivo. No entanto, a matriz predominante é arbustiva (maior que 2 metros), e a vegetação arbórea (chega até 8 metros) é restrita apenas às regiões de mata ciliar (SOUZA, 2003; BRASIL, 2006).

A zona de amortecimento da FNCS, localizada nos arredores da FNCS, compreende uma área de 65.086,74 ha. Apesar desta área já ter apresentado a mesma fitofisionomia encontrada na FNCS, boa parte dela atualmente encontra-se modificada por ação antrópica, onde é comum observar pastagens para a criação do gado, bem como, a ocupação humana do povoado de Palmeiras (BRASIL, 2006).

Sabe-se que as formigas cortadeiras são comuns em ambientes modificados por ação humana e especialmente na Fazenda Lagoa das Covas (FLC), situada na zona de amortecimento da FNCS, foi registrada a presença da formiga *Atta sexdens*. Como esta espécie não é encontrada dentro da área FNCS, o que leva a crer que seja uma espécie que se beneficiou da degradação causada pelo homem para ocupar a região (CRUZ, 2015). Desde então a espécie tem sido alvo de estudos ecológicos na região (CARMO, 2012; OLIVEIRA, 2012; CRUZ, 2015).

Segundo Oliveira (2012) a dieta de *Atta sexdens* no entorno da FNCS apresenta variedade alimentar de acordo com as estações do ano devido às diferenças na disponibilidade de espécies vegetais em torno da colônia, sendo que na estação seca há um aumento do número de espécies de plantas que têm suas folhas coletadas, enquanto que na estação chuvosa elas utilizam menos espécies vegetais.

Foi observado por Carmo (2012) que a intensidade de forrageamento de *Atta sexdens* no entorno da FNCS é maior na estação seca do que na estação chuvosa, tendo como espécies vegetais mais herbivoradas: *Senna acuruensis*, *Thiloa glaucocarpa* e *Pereskia bahiensis*. Segundo Carmo (2012), entre as estações seca e chuvosa, não houve variação quanto ao comprimento total acumulado das trilhas por colônia, nem tampouco houve variação significativa da área de forrageamento.

Em relação à elevada densidade de colônias de *Atta sexdens* na zona de amortecimento da FNCS, Cruz (2015) concluiu que esse fator é influenciado por características da vegetação e da paisagem que favorecem o desenvolvimento e crescimento de suas colônias nesses ambientes. Ao realizar testes de agressividade entre indivíduos de colônias diferentes, Cruz (2015) percebeu que houve um reconhecimento ou tolerância entre as colônias (isto é, falta de agressividade), sugerindo um grau de parentesco alto entre as várias colônias estudadas na zona de amortecimento da FNCS.

2.5 A FLORESTA ESTACIONAL (FE) OU “mata de cipó”

As florestas estacionais ou florestas secas ocorrem em diferentes regiões brasileiras especialmente sobre solos férteis classificados em latossolos eutróficos, nitossolos e argissolos (IBGE, 2012). As florestas estacionais podem ser divididas em dois tipos fisionômicos: (1) as Semidecíduais cuja fisionomia é estratificada, com porte arbóreo entre 18 e 30 m de altura, ocorrendo em ambientes com maior disponibilidade hídrica; (2) e as Florestas Estacionais Deciduais, que geralmente apresentam menor porte arbóreo e localizados em ambientes de escassez hídrica, chegando a obter perdas foliares de até 50% das árvores no período seco (VELOSO, RANGEL & LIMA, 1991; BARBOSA & THOMAS, 2002; IBGE, 2012).

A Floresta Estacional Semidecidual (FES) ou “mata de cipó” é caracterizada por apresentar duas estações climáticas bem demarcadas (seca e chuvosa), que influenciam na perda de folhas da vegetação. Assim na estação seca a vegetação perde boa parte das folhas (50% das árvores) e durante o período chuvoso essa perda é relativamente menor (20% das árvores). Esta floresta apresenta rica camada de serapilheira e a vegetação é constituída por estrato arbóreo com formação de dossel elevado, estrato arbustivo e herbáceas, além da presença de epífitas e cipós (IBGE, 2012).

A FES apresenta áreas descontínuas localizadas em todas as regiões brasileiras podendo ser classificadas em quatro tipos: aluvial (formações de mata ciliares nas margens de rios), terras baixas (depressões sedimentares numa média de 100 m de altitude), submontana (desenvolve em solos secos em regiões não montanhosas) e montana (ocorre em áreas montanhosas com altitude média de 400m) (IBGE, 2012).

Apesar da ampla ocorrência desse tipo vegetacional (FES) no Brasil, ainda são poucos os estudos destinados ao levantamento florístico (MEIRA-NETO & MARTINS 2002; PINHEIRO & MONTEIRO, 2008; IBGE, 2012) e faunístico (SANTOS *et al.*, 2006; AGUIAR & GAGLIANONE, 2008). Além disso, são incipientes as ações que visem à conservação da rica biodiversidade encontrada nas Florestas Estacionais Semidecíduais brasileiras.

No Sudoeste da Bahia, o fragmento de Floresta Estacional Semidecidual ou “mata de cipó” (15°15' S, 040°17'O) apresenta cerca de 323,5 ha de dimensão e localiza-se próximo à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *campus* do município de Itapetinga. Em geral, a flora característica dessa região são árvores (até 30 m), arbustos, vegetação xerófila e espinhosa e muitos cipós, essa floresta apresenta o dossel semiaberto (L. KRAUS, informação pessoal). O solo na maior parte do fragmento está coberto por uma camada fina de serapilheira, apresenta a formação de enormes montes de terra seca e compactada (com cerca de 2m de altura), abandonados por cupins, e por vezes, habitados por formigas cortadeiras. Além disso, no fragmento de “mata de cipó” estudado foram observadas modificações antrópicas recentes, tais como, a extração de madeira, o desmatamento, a queimada de árvores e o pastoreio de gado (C.F. Matos-Oliveira, observação pessoal). Nesse referido fragmento foram encontradas populações da formiga cortadeira *Atta sexdens*, uma espécie comum em florestas naturais e também em florestas degradadas.

2.6. ESTUDOS GENÉTICOS MOLECULARES

2.6.1 GENÉTICA DE POPULAÇÕES

Entende-se por população, um grupo de organismos de mesma espécie capaz de reproduzir entre si e que estão localizados numa determinada área geográfica durante um dado período de tempo (RICKLEFS, 2003). Logo, a genética de populações vem a ser o estudo de como as informações genéticas (*pool* gênico) existentes numa população natural podem ser transmitidas por seus descendentes ao longo de gerações (SALMAN, 2007).

O estudo genético das populações toma por base um teorema criado conjuntamente em 1908 pelo matemático inglês Godfrey H. Hardy e pelo médico alemão Wilhem Weinberg, os quais concluíram: uma população em equilíbrio é aquela que nenhum fator evolutivo exerce influência sobre ela, de maneira que suas frequências gênicas e genotípicas permanecem constantes ao longo das gerações. Neste aspecto, o teorema do equilíbrio das populações, intitulado Teorema de Hardy-Weinberg, considera várias premissas que devem ser respeitadas (Quadro 1) para que uma população esteja em equilíbrio (LOPES, TORRES & PIRES, 2005).

Quadro 1- Conjunto de premissas necessárias segundo o Teorema de Hardy-Weinberg para que uma população mantenha-se em equilíbrio genético ao longo do tempo

Premissas de Hardy-Weinberg.
a) População Grande e/ou infinita;
b) Deve haver mesma proporção de machos e fêmeas na população;
c) População deve ser pan-mítica (com ausência de endogamia);
d) Todos os casais da população são igualmente férteis e geram o mesmo número de filhos;
e) Não há sobreposição de gerações na população;
f) Ausência de mutações na população;
g) Ausência de seleção natural na população;
h) Ausência de migração na população;

Contudo, as variações alélicas existentes nas populações naturais interagem entre si e com o ambiente, e por vezes, alguns fatores evolutivos tendem a agir sobre os alelos da população alterando as suas frequências alélicas e/ou genotípicas (SALMAN, 2007). Considerando a existência de diversos fatores evolutivos que afetam a composição genética das populações, podemos citar: i) seleção natural (seleção dos indivíduos mais aptos à determinada condição do ambiente); ii) mutação (mudanças aleatórias no genoma que podem ser herdáveis ou não); iii) sistemas de acasalamento (cruzamento entre indivíduos aparentados ou não, sendo chamados de acasalamento endogâmico e aleatório, respectivamente); iv) migração (deslocamento de indivíduos de uma população para outra que seja reprodutivamente compatível); e por último, v) deriva genética (perda aleatória de alelos em populações pequenas) (SALMAN, 2007).

A ação de fatores evolutivos sobre uma população pode trazer alterações genéticas de caráter benéfico a população, tais como o aumento de diversidade genética (LOPES, TORRES & PIRES, 2005). Mas, por vezes, algumas mudanças trazem malefícios à população

quando reduzem a sua variabilidade genética deixando-a estruturada, isto é, com seus alelos não distribuídos uniformemente, o que resulta na formação de subgrupos (HAMRICK, 1983).

Sendo assim, como não se pode controlar a evolução das populações naturais, é impossível encontrar na natureza uma população que respeite todas as premissas do equilíbrio e/ou que alguns dos fatores evolutivos mencionados acima não tenham ocorrido sobre ela. O que se espera, é que através do Teorema de Hardy-Weinberg possamos estimar o grau significativo das mudanças que ocorreram numa população ao longo das gerações, e posteriormente, através de estudos ecológicos mais específicos, estimar quais seriam as causas que propiciaram a evolução das populações estudadas.

Diante das premissas que regem o Teorema de Hardy-Weinberg e os fatores que influenciam na evolução das espécies, é sabido que para formigas cortadeiras, qualquer alteração da diversidade genética refletirá em consequências ecológicas sobre a população, sobre a comunidade e também em diferentes níveis ecossistêmicos (HUGUES *et al.*, 2008).

Vellend (2006) sugere que numa competição entre indivíduos, por exemplo, a diversidade genética permitirá que cada espécie responda a seleção que lhe for imposta, seja ela por alimento, abrigo, parceiro, nicho, entre outros. Caso a diversidade genética promova a coexistência dos indivíduos durante um evento de seleção a composição das espécies continuará a mesma. O autor reforça que o declínio da diversidade genética em sistemas naturais pode ter consequências não apenas para as espécies isoladamente, mas também para a diversidade ao nível da comunidade e na composição de espécies como um todo.

Em meio aos eventos que influenciam a composição genética das populações, cada indivíduo carrega uma combinação de alelos em particular que aliados às condições ambientais determinarão seu fenótipo. Logo, haverá diferentes respostas às pressões ambientais e poderão ocorrer mudanças genéticas populacionais, responsáveis pela evolução da espécie que por sua vez, refletirá na sua interação com outros organismos localizados num determinado espaço abiótico.

2.6.2 MARCADORES MOLECULARES

Para o estudo a nível molecular das populações existentes, o progresso das técnicas moleculares destinadas à manipulação do Ácido Desoxirribonucleico (DNA) bem como, o desenvolvimento de marcadores moleculares foram imprescindíveis para a intensificação do

estudo do genoma. Além do que, os estudos moleculares possibilitaram mapear caracteres quantitativos que permitem a identificação de regiões gênicas associadas às características de interesse e a seleção assistida por marcadores em várias espécies (GUIMARÃES *et al.*, 2009).

As técnicas moleculares podem gerar resultados mais esclarecedores quando acopladas de forma multidisciplinar a outras ciências tais como, ecologia, ecologia de populações, genética quantitativa, bioinformática e estatística (LACERDA *et al.*, 2002; GUIMARÃES *et al.*, 2009). Todo esse progresso tem possibilitado a resolução de problemas de caráter científico, contribuindo também para o aumento da eficiência dos programas de conservação e o melhor uso dos recursos genéticos (FALEIRO, 2007).

A diversidade biológica a nível molecular tem sido mensurada com o uso de marcadores moleculares (FREELAND *et al.*, 2011) que podem ser classificados entre aqueles que se baseiam na hibridização (RFLP- *Restriction Fragmentlength polymorphism*; Minissatélites) e os que são baseados na técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Nesta última categoria, merecem destaque alguns dos marcadores dominantes, tais como o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), o ISSR (*Inter-simple Sequence Repeat*) e também os de natureza codominante, a exemplo do SSR (*Simple Sequence Repeats*) (ZIETKIEWICZ *et al.*, 1994; MUELLER & WOLFENBARGER 1999; BARDAKCI, 2001; ZANE *et al.*, 2002; FALEIRO, 2007; GUIMARÃES *et al.*, 2009; GALAL, 2009; SCALDAFERRI, 2013). Por fim, os marcadores de genotipagem-por-sequenciamento (GBS) frequentemente usado para identificação de marcadores moleculares SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) do genoma de estudo (ELSHIRE *et al.*, 2011).

Embora existam vários marcadores moleculares, os codominantes caracterizam-se por diferenciar os loci em homozigose dos em heterozigose, conseqüentemente, geram mais informações genéticas (FALEIRO, 2007). No entanto, o custo para a criação desses marcadores é bem maior uma vez que, necessitam de um estudo prévio do genoma da espécie. Em contrapartida, os marcadores dominantes são vantajosos por apresentarem caráter aleatório, podendo ser utilizados para estudar qualquer espécie, sem necessidade de conhecimento prévio do genoma da espécie em estudo (FALEIRO, 2007; SCALDAFERRI, 2013).

Para Hardrys *et al.* (1992), a eficácia dos marcadores moleculares pode variar entre mais ou menos eficiente a depender de diversos fatores, como: os procedimentos tecnológicos exigidos, a quantidade de DNA necessária para a obtenção de informações necessárias para o

estudo, o poder analítico de atribuição de parentesco no genótipo, os custos de trabalho e dinheiro e a precisão de aplicações em laboratório.

2.6.3 MARCADOR MOLECULAR: ISSR

O ISSR (*Inter-simple Sequence Repeat*) é um marcador baseado na técnica de PCR que amplifica segmentos de DNA entre duas regiões repetidas de microssatélites utilizando marcadores com 16 a 25 pares de bases de comprimento (ZIETKIEWICZ *et al.*, 1994).

Como principal vantagem, o marcador ISSR é de caráter aleatório e, portanto não exige o conhecimento prévio do DNA-alvo para a construção do marcador, podendo ser aplicável em estudos para várias espécies. Outra vantagem do uso da técnica é a utilização da PCR, que permite a amplificação do DNA com marcadores ISSRs a partir de pequenas quantidades de DNA (ZIETKIEWICZ *et al.*, 1994). Esta técnica é simples, rápida e de alta reprodutibilidade devido ao maior comprimento dos marcadores o que se torna mais vantajosa sua aplicação quando comparada à técnica de RAPD (MORENO, MARTIN & ORTIZ, 1998). Por outro lado, o ISSR é desvantajoso por detectar menos polimorfismo e, além disso, pode levar a má interpretação de dados quando fragmentos de DNA comigrantes (de mesmo tamanho), que mesmo pertencentes a loci distintos, por vezes, são apresentados como homólogos (BUSSEL *et al.*, 2005).

Muito embora a maioria dos estudos com ISSR contemplem o grupo das plantas, há registros na literatura da aplicação desses marcadores em insetos, principalmente da ordem Hymenoptera, grupo que contempla as abelhas, vespas e formigas. Dentre os himenópteros, o grupo das abelhas apresenta um número significativo de estudos genético-moleculares com ISSR (PAPLAUSKIENĖ *et al.*, 2006; NASCIMENTO *et al.*, 2010; CEKSTERYTE *et al.*, 2012; SHOUHANI *et al.*, 2014; RAHIMI *et al.*, 2016) comparado às formigas, em especial as formigas cortadeiras.

Para o gênero *Atta* o uso de marcadores ISSR para estudos de caracterização da diversidade genética são incipientes, tendo sido encontrado na literatura, até o presente momento, apenas o estudo de Reis *et al.* (2014), que apresenta a estrutura populacional da espécie *Atta robusta*, uma espécie endêmica de restingas do Espírito Santo e do Rio de Janeiro, atualmente ameaçada de extinção.

2.6.4 ESTUDOS MOLECULARES APLICADOS A FORMIGAS CORTADEIRAS

As formigas cortadeiras têm recebido atenção em diversos estudos genético-moleculares e dentre os marcadores moleculares empregados, destacam-se o RAPD (CARVALHO & VIEIRA, 2000; 2001; GRUTZMACHER *et al.*, 2006; CANTAGALLI *et al.* 2013), o PCR-RFLP (BEZERRA, 2008), o marcador ISSR (REIS *et al.*, 2014) e o marcador SSR (FJERDINGSTAD, BOOMSMA & THOREN, 1998; EVISON & HUGUES, 2011; HUGUES & BOOMSMA, 2004; HELMKAMPF *et al.*, 2008; HUGUES *et al.*, 2009; CONSTANT *et al.*, 2012); este último um dos mais utilizados em estudos genético-moleculares com formigas cortadeiras.

Nos últimos anos, com o grande desenvolvimento tecnológico-científico, tem sido possível a realização de estudos moleculares mais específicos, com objetivo de entender a evolução dos organismos. Desse modo, estudos filogenéticos com formigas cortadeiras têm se baseado no sequenciamento genômico nuclear (SHULTZ & BRADY, 2008); ou do genoma mitocondrial (SOLOMON *et al.*, 2008; RODOVALHO *et al.*, 2014; CRISTIANO *et al.*, 2016); bem como, o sequenciamento do genoma nuclear e mitocondrial (BACCI JR *et al.*, 2009; MARTINS JÚNIOR, 2011) para estudos de sistemática molecular e filogenia, respectivamente.

Embora já exista na literatura estudos genético-moleculares para os gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, ainda há poucos estudos que utilizaram marcadores do tipo ISSR, o qual tem se mostrado menos custoso e mais vantajoso por não exigir o sequenciamento genômico prévio da espécie-alvo. Portanto, esse marcador pode ser aplicável ao estudo populacional de *Atta sexdens*, uma das espécies de formigas cortadeiras com maior distribuição geográfica (BORGMEIER, 1959; DELABIE *et al.*, 2011) e com maior potencial de dano econômico a pastagens e culturas agrícolas (DELLA LÚCIA, 1993).

2.6.5 FATORES EVOLUTIVOS EM FORMIGAS CORTADEIRAS

A reconstrução da história evolutiva das Attini demonstrou que a tribo divergiu em dois clados as Paleoattini e Neoattini, a cerca de 50 milhões de anos, corroborando com Hölldobler & Wilson (1990) (SCHULTZ & BRADY, 2008).

O clado Paleoattine constitui-se como o mais antigo, sendo formado pelos gêneros *Mycocepurus*, *Myrmicocrypta* e *Apterostigma* que compartilham especificamente uma mancha clara na asa das fêmeas (SCHULTZ & BRADY, 2008). De acordo com Schultz & Brady (2008) o clado Neoattini apresenta três divergências sucessivas, classificando em grupo as formigas cultivadoras de fungos: a primeira divergência mais basal compreende os gêneros *Mycetophylax*, *Mycetarotes*, *Mycetasoritis* e *Cyphomyrmex*; a segunda está representada pelas Attini superiores não cortadoras de folhas *Mycetagroicus*, *Sericomyrmex* e *Trachymyrmex* que provavelmente deram origem ao terceiro grupo, o mais derivado representado pelas Attini superiores cortadoras de folhas que compreende os gêneros *Acromyrmex* e *Atta*.

Mais recentemente a descoberta da espécie *Cyatta abscondita* e posterior análise filogenética mostrou que essa espécie é cultivadora de fungo. Assim, o clado Neoattini passou de três para quatro divergências sucessivas, sendo o grupo mais basal agora representado por *Cyatta* e *Kalathomyrmex*; os gêneros *Mycetophylax*, *Mycetarotes*, *Mycetasoritis* e *Cyphomyrmex*, passam a fazer parte do segundo grupo divergente. O grupo três continua representado pelas Attinis superiores não cortadoras (*Mycetagroicus*, *Sericomyrmex* e *Trachymyrmex*) e finalmente, o quarto grupo apresenta os gêneros das formigas cortadoras de folhas *Acromyrmex*, *Pseudoatta* e *Atta* (SOSA-CALVO *et al.*, 2013).

Com base em dados moleculares, as Attinis foram agrupadas, de acordo com o fungo cultivado em cinco tipos de sistemas de agriculturas: (i) a agricultura primitiva (*Lower Agriculture*) composto por 11 gêneros (74 espécies) sendo considerado o maior grupo de agricultores dentre as Attines (SCHULTZ & BRADY, 2008; SOSA-CALVO *et al.*, 2013); (ii) a agricultura de Coral de Fungos (*Coral Fungus Agriculture*) apresentando 34 espécies do gênero *Apterostigma*; (iii) agricultura de leveduras (*Yeast Agriculture*) com 18 espécies do gênero *Cyphomyrmex*; (iv) a agricultura das formigas que não possuem o hábito de cortar folhas (*Higher Agriculture*) praticado por 63 espécies dos gêneros *Sericomyrmex* e *Trachymyrmex* e finalmente o grupo (v) das cortadeiras (*Leaf-Cutter Agriculture*) composto pelos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* (cerca de 40 espécies) cultivadoras de fungos mais derivados (SCHULTZ & BRADY, 2008; MEHDIABADI & SCHULTZ, 2009; SOSA-CALVO *et al.*, 2013).

É sabido que as formigas mais derivadas *Atta* e *Acromyrmex* mantêm uma relação simbiótica mutualística com fungos, mas, foi ao longo de sua evolução, há cerca de 50 milhões de anos atrás que essa relação se estabeleceu no grupo das cortadeiras (SCHULTZ & BRADY, 2008). Basicamente essa evolução simbiótica entre formigas e fungos, pode ser

explicada por dois modelos. No primeiro modelo, os fungos teriam se desenvolvido no substrato no interior dos ninhos, as formigas, por sua vez, passaram a se alimentar desses fungos e com o tempo desenvolveram adaptações para seu cultivo. Já no segundo modelo, as formigas eram utilizadas como vetores de dispersão pelos fungos e mais tarde, as formigas teriam evoluído o comportamento de cultivar esses microrganismos (MUELLER *et al.*, 2001).

O mutualismo obrigatório existente entre as formigas cortadeiras e seus fungos pode ser explicado através do primeiro sequenciamento genômico de *Atta cephalotes*, onde foi possível detectar reduções de genes e perdas de proteínas (ex.: Hexamerina) diretamente relacionados com a aquisição de nutrientes. Evolutivamente essas perdas passaram a ser compensadas através da prática de cultivar fungos que fornecem nutrientes sob a forma de hidratos de carbono e aminoácidos livres (SUEN *et al.*, 2011).

A jornada das cortadeiras para criação de jardins de fungos inicia-se quando uma rainha após copular com vários machos (poliandria) parte para a fundação de seus ninhos carregando na cavidade infrabucal micélios fúngicos (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990). Após a escavação e regurgitação do fungo, as rainhas, para formar uma nova colônia, passam a ovipositar primeiramente operárias fêmeas (tamanho pequeno, médio e grande) que irão desempenhar diferentes trabalhos no ninho e, posteriormente, indivíduos reprodutores (machos e fêmeas) (WEBER, 1972). A postura de ovos por uma rainha de formiga-cortadeira será garantida por todo o seu período de vida, uma vez que os espermatozoides recebidos durante a cópula ficarão armazenados na espermateca (podendo ficar ativos por um período até 20 anos) (DELLA LUCIA & SOUZA, 2011). Na espermateca ocorrerá a produção de proteínas para garantir o bom acondicionamento e viabilidade dos espermatozoides (MALTA *et al.*, 2014).

Evolutivamente, sabe-se que a poliandria é uma característica derivada em insetos sociais (EVISON & HUGUES, 2011), porém este comportamento é custoso às rainhas, pois, estas ficam mais sujeitas à exposição a parasitas sexualmente transmissíveis, ao risco de predação fora do ninho e ao gasto de energia necessário para copular com vários machos (WEBER 1972; EVISON & HUGUES, 2011). Mesmo assim, existem hipóteses que explicam as vantagens obtidas a partir do múltiplo acasalamento, uma vez que, potencializa o aumento da diversidade genética intra-colonial (BOOMSMA, FJERDINGSTAD, FRYDENBERG, 1999; EVISON & HUGUES, 2011), aumenta a vida reprodutiva útil das fêmeas e a defesa contra patógenos (BOOMSMA, FJERDINGSTAD, FRYDENBERG, 1999) bem como, melhora a divisão do trabalho, já que as operárias tornam-se mais adaptadas as tarefas

específicas da colônia e as condições ambientais (HUGUES & BOOMSMA, 2007; OLDROYD & FEWELL, 2007; CONSTANT *et al.*, 2012).

Evison & Hugues (2011) explicam que no grupo das formigas cortadeiras existe uma alta taxa poliândrica e há influência da diversidade genética sobre as diferentes castas presentes em seus ninhos. Os autores afirmam ainda que a divisão do trabalho, incluindo a derivação do hábito cortador de folhas, seria o elemento crucial que potencializou a evolução da poliandria no grupo das formigas cortadeiras. Assim, é provável que a evolução das castas e as suas respectivas especializações comportamentais, vistas em insetos sociais, seja fruto de uma complexa interação entre o meio ambiente e fatores genéticos promovidos através da poliandria (EVISON & HUGUES, 2011). Além disso, a divisão do trabalho entre indivíduos eussociais é afetada pela idade, experiência, tamanho corporal, morfologia e fisiologia (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990; ROBINSON, 1992, 2009; RAVARY *et al.*, 2007; JOHNSON, 2010).

Considerando a ocorrência de poliandria em cortadeiras, tanto rainhas da espécie *Atta colombica* quanto da espécie *Atta sexdens* chegam a obter uma média de 2,6 cruzamentos com machos, sendo que a média efetiva de paternidade chega a 2,31 (FJERDINGSTAD, BOOMSMA & THOREN, 1998; FJERDINGSTAD & BOOMSMA, 2000). Entretanto, as rainhas de *Acromyrmex octopinosus* apresentam uma média de acasalamento com cerca de 6,1 machos (BOOMSMA, FJERDINGSTAD, FRYDENBERG, 1999), sendo este valor bem maior aos que foram encontrados para o gênero *Atta*, embora este grupo tenha sido registrado como um dos mais proeminentes em relação à complexidade na divisão do trabalho (EVISON & HUGUES, 2011).

Como pode ser visto, a poliandria potencializa o aumento da diversidade genética intracolônial, torna colônias mais resistentes a doenças e contribui significativamente para o comportamento eussocial. Contudo, há outros mecanismos que podem auxiliar na proteção das colônias, tais como as estruturas envolvidas na assepsia, a exemplo das glândulas mandibulares (BROUGH, 1983) e glândulas metapleurais (VEAL *et al.*, 1992). Dessa maneira, são vários mecanismos genéticos, morfofisiológicos e ecológicos que se interagem a fim de permitir que esses organismos eussociais obtenham sucesso reprodutivo e mantenham suas colônias no ambiente por várias gerações.

3. REFERÊNCIAS

- ALBURQUEQUE *et al.*,. **Caatinga: biodiversidade e qualidade de vida**. 1º.ed. Bauru,SP: Canal6, pp. 120. 2010.
- ALMEIDA, W.R.; LOPES, A.V.; TABARELLI, M.; LEAL, I.L. The alien flora of Brazilian Caatinga: deliberate introductions expand the contingent of potencial invasion. **Biol. Invasions**, v. 17, nº. 51, p. 51-56, 2014.
- ALVES, J.J.A.; ARAUJO, M.A.; NASCIMENTO, S.S. Degradação da Caatinga: uma investigação ecogeográfica. **Caatinga**, v.22, p. 126-135, 2009.
- ANDRADE-LIMA, D. Contribution to the study of the flora of Pernambuco, Brazil. New York: NY. State University of New York, 1954, 131 f. Dissertation (Máster Science)- State University of New York, 1954.
- ANDRADE-LIMA, D. **Present day forest refuges in northeastern Brazil**. In: PRANCE, G.T. (ed.) Biological Diversification in the Tropics. Columbia University Press, New York. pp. 245, 1982.
- AGUIAR, W.M.; GAGLIANONE, M.C. Comunidade de abelhas Euglossina (Hymenoptera: Apidae) em remanescentes de mata estacional semidecidual sobre tabuleiro no estado do Rio de Janeiro. **Neot. Entomol.**, v. 37, nº.2, p.118-125, 2008.
- BACCARO, F. B.; FEITOSA, R. M.; FERNANDEZ, F.; FERNANDES, I.O.; IZZO, T.J.; SOUZA, J.L.P.; SOLAR, R. **Guia para o gênero de formigas do Brasil**. Editora Inpa – Manaus, 388p. 2015.
- BACCI JR., M.; SOLOMON, S.E.; MUELLER, U.G.; MARTINS, V. G.; CARVALHO, A.O.R.; VIEIRA, L.G.E.; SILVA-PINHATI, A.C.O. Phylogeny of leafcutter ants in the genus *Atta* Fabricius (Formicidae: Attini) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 51, p. 427–437, 2009.
- BARBOSA, M.R. & THOMAS, W. Biodiversidade, conservação e uso sustentável da Mata Atlântica no Nordeste. In: Araújo, E. L. et al., eds. **Biodiversidade, conservação e uso sustentável da flora do Brasil**. Recife: UFRPE, Brasil/Imprensa Universitária, p. 19 – 22, 2002.
- BARDAKCI, F. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. **Turk J Biol**, v. 25, p.185-196, 2001.
- BARNWELL, P; BLANCHARD, A.N.; BRYANT, J.A.; SMIRNOFF, N. Isolation of DNA from the highly mucilaginous succulent plant *Sedum telephium*. **Plant Mol. Biol. Rep.**, v.16, p.133-138, 1998.
- BELSHAW, R.; QUICKE, D.L.J. A molecular phylogeny of Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae). **Mol. Phylogenet. Evol.** v. 5, p. 423–428, 1997.
- BEUCHLE, R.; GRECCHI, R.C.; SHIMABUKURO, Y.E.; SELLINGER, R.; EVA, H.D.; SANO, E.; ACHARD, F. Land cover changes in the Brazilian Cerrado and Caatinga biomes

from 1990 to 2010 based on a systematic remote sensing sampling approach. **App. Geophysics**, v.58, p.116-127, 2015.

BEZERRA, C.M.S. A zona de contato entre as saúvas *Atta sexdens sexdens* (Linnaeus, 1758) e *Atta sexdens rubropilosa* (Forel, 1908) no estado da Bahia. 2008. 76f. Dissertação de mestrado (Programa De Pós-Graduação Em Zoologia), Universidade Estadual de Santa Cruz Departamento de Ciências Biológicas (UESC), Ilhéus, Bahia, 2008.

BOARETTO, M.A.; FORTI, L.C. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. **Série Técnica IPEF, Piracicaba**, v.11, n°. 30, p. 31-46, 1997.

BOLTON, B. 2014. An online catalog of the ants of the world. Disponível em: <http://antcat.org>. Acesso em: 15 de janeiro de 2015.

BOOMSMA, J.; FJERDINGSTAD, E.; FRYDENBERG, J. Multiple paternity, relatedness and genetic diversity in *Acromyrmex* leafcutter ants. **Proc R.Soc.**, v. 266, p. 249-254, 1999.

BORGMEIER, T. Revision der Gattung *Atta* Fabricius (Hymenoptera: Formicidae). **Stud Entomol**, Rio de Janeiro, v.2, n°.14, p. 321-390, 1959.

BUSSEL, J.D.; WAYCOTT, M.; CHAPPILL, J.A. Arbitrarily amplified DNA markers as characters for phylogenetic inference. **Perspect Plant Ecol. Evol. Syst.**, v.7, p. 3–26, 2005.

BRASIL. Plano de Manejo Floresta Nacional Contendas do Sincorá. Informações Gerais sobre a Floresta Nacional. Brasília: Ministério do Meio Ambiente/IBAMA. v.1, pp.90. 2006.
BROUGH, E.J. The antimicrobial activity of the mandibular gland secretion of a Formicidae ant, *Calomyrmex sp.* (Hymenoptera: Formicidae). **J. Inv. Pathol.** v.42, p. 306-311, 1983.

CANTAGALLI L.B.; MANGOLIN C.A.; RUVOLOTAKASUSUKI, M.C.C. Population genetics of *Atta sexdens rubropilosa* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) **Acta biol. Colomb.**, v. 18, n°. 1, p.179 – 190, 2013.

CARMO, T.N.N. Atividade de forrageamento de *Atta sexdens rubropilosa* em uma área de Caatinga no município de Contendas do Sincorá, Bahia. 2012. 47p. Monografia (Especialização em Meio Ambiente e Desenvolvimento), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, UESB, Itapetinga – BA, 2012.

CARVALHO, A.O.R.; VIEIRA, L.G.E Comparison of Preservation Methods of *Atta* spp. (Hymenoptera: Formicidae) for RAPD Analysis. **An. Soc. Entomol. Brasil**, v.29, n°.3, p 489-496, 2000.

CARVALHO, A.O.R.; VIEIRA, L.G.E. Determinação das Condições Ótimas para Análises de PCR-RAPD em *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). **Neot. Entomol.**, v.30, n°. 4, p. 593-600, 2001.

CARVALHO, K. S.; ALENCAR, A.; BALCH, J.; MOUTINHO, P. Leafcutter Ant Nests Inhibit Low-Intensity Fire Spread in the Understory of Transitional Forests at the Amazon's Forest-Savanna Boundary. **Psyche**, vol. 2012, p., 2012.

CASTELLETTI, C.H.M.; SANTOS, A.M.M.; TABARELLI M.; SILVA, J.M.C. Quanto ainda resta da Caatinga? In: LEAL, I.R.; TABARELLI, M., SILVA, J.M.C. (eds.). **Ecologia e conservação da Caatinga**. Editora Universitária da UFPE, Recife, pp. 719-734. 2003.

CERQUEIRA-SILVA, C.B.M. Avaliações biométricas, genéticas e moleculares visando conservação e melhoramento de *Passiflora* spp. 2009. 128 f. Dissertação mestrado (Genética e Biologia Molecular), UESC- Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Bahia 2009.

CEKSTERYTE, V.; PAPLAUSKIENE, V.; TAMASAUSKIENE, D.; PASAKINSKIENE, I.; MAZEIKIENE, I. Genetic characterization of Lithuanian honeybee lines based on ISSR polymorphism. **Apidologie**, v.43, p.652, 2012.

CHEUNG, W.Y.; HUBERT, N.; LANDRY, B.S. A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal, and insect suitable for RAPD and other PCR analyses. **Technical Tips.**, v. 3, p.69-70, 1993.

CHERRETT, L. M. Some factors involved in the selection of vegetable substrate by *Atta cephalotes* (L.) (Hymenoptera: Formicidae) in tropical forest. **J. Anim. Ecol.**, v. 41, p. 647-660, 1972.

COIMBRA-FILHO, A.F.; CÂMARA, I.G. **Os limites originais do bioma Mata Atlântica na região Nordeste do Brasil**. Fundação Brasileira para Conservação da Natureza, Rio de Janeiro. 1996.

CONSTANT, N.; SANTORELLI, L.A.; LOPES, J.F.S.; HUGHES, W.O.H. The effects of genotype, caste, and age on foraging performance in leaf-cutting ants. **Behav. Ecol.**, v. 23, p.1284–1288, 2012.

CORRÊA, M. M. ; SILVA, P. S. D.; WIRTH, R. ; TABARELLI, M.; LEAL, I.R. How leaf-cutting ants impact forests: drastic nest effects on light environment and plant assemblages. **Oecologia**, v. 162, p. 103-115, 2010.

CRISTIANO, M.P.; CARDOSO, D.C.; FERNANDES-SALOMÃO, T.M.; HEINZE, J. Integrating Paleodistribution Models and Phylogeography in the Grass-Cutting Ant *Acromyrmex striatus* (Hymenoptera: Formicidae) in Southern Lowlands of South America. **PLoS ONE**, v.11, n°.1, p.: e0146734, 2016.

CRUZ, Ianí Aparecida de Souza. Densidade de ninhos e interações agonísticas da formiga cortadeira *Atta sexdens* (Hymenoptera: formicidae) em região de caatinga no Sudoeste da Bahia. 2015. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciências ambientais). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, UESB, Itapetinga – BA, 2015.

DALLING, J.W.; WIRTH, R. Dispersal of *Miconia argentea* seeds by the leaf-cutting ant *Atta colombica*. **J. Trop. Ecol.**, v.14, p. 705-710, 1998.

DELABIE, J.H.C. et al. Distribuição das formigas-cortadeiras dos gêneros *Acromyrmex* e *Atta* no novo mundo. In: DELLA LÚCIA, T.M.C. (Ed.). **Formigas cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa: Ed. UFV, p. 80-101. 2011.

DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.) **As formigas cortadeiras**. Ed. Folha da Mata, Viçosa. pp.262. 1993.

DELLA LUCIA, T. M. C.; SOUZA, D. J. Importância e história de vida das formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. **Formigas-cortadeiras: da biologia ao manejo**. Viçosa-MG: UFV, p. 13-26. 2011.

DOHM, C.; LEAL, I.R.; TABARELLI, M.; MEYER, S.T.; WIRTH, R. Leaf-cutting ants proliferate in the Amazon: an expected response to forest edge? **J. Trop.Ecol.**, v. 27, p. 645–649, 2011.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.

EVISON, S.E.F.; HUGHES, W.O.H. Genetic caste polymorphism and the evolution of polyandry in *Atta* leaf-cutting ants. **Naturwissenschaften**, v.98, p.643–649, 2011. DOI 10.1007/s00114-011-0810-3.

ELSHIRE, R.J.; GLAUBITZ, J.C.; SUN, Q.; POLAND, J.A.; KAWAMOTO, K. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. **PLoS ONE**, v.6, e19379, 2011.

FALEIRO, F. **Marcadores moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, 102 p. 2007.

FARJI-BRENER, A. G. Modificaciones al suelo realizadas por hormigas cortadoras de hojas (Formicidae, Attini): una revision de sus efectos sobre la vegetacion. **Ecol. Austral.**, v. 2, p. 87–94, 1992.

FARJI-BRENER, A.G.; RUGGIERO, A. Leaf-cutting ants (*Atta* and *Acromyrmex*) inhabiting Argentina: patterns in species richness and geographical range sizes. **J. Biogeography**, v. 21, p. 391-399, 1994.

FARJI-BRENER, A.G.; CORLEY, J.C. Successful invasions of hymenopteran insects into NW Patagonia. **Ecol. austral**, v. 8, p.273-249, 1998.

FARJI-BRENER, A.G.; ILLES, A.E. Do leaf-cutting ant nests make “bottom-up” gaps in neotropical rain forests? A critical review of the evidence. **Ecol. Letter**, v.3, p.219-227, 2000.

FOWLER, H.G.; STILES, E.W. Conservative resource management by leaf-cutting ants. The role of foraging territories and trails, and enviromental patchiness. **Sociobiology**, v. 5, p. 24-41, 1980.

FOWLER, H.G.; PAGANI, M.I.; SILVA, O.A.; FORTI, L.C.; PEREIRA-DA-SILVA, V.; VASCONCELOS, H. L. A pest is a pest is a pest? The dilemma of Neotropical leaf-cutting ants: keystone taxa of natural ecosystems. **Environ. Manage.**, v.13, p. 671–675, 1989.

FREELAND, J.R.; PETERSEN, S.D.; KIRK, H. **Molecular ecology**. 2nd ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2011.

- FJERDINGSTAD, E.J.; BOOMSMA, J.J.; THOREN, P. Multiple paternity in the leafcutter ant *Atta colombica* — a microsatellite DNA analysis. **Heredity**, v. 80, p. 118–126, 1998.
- FJERDINGSTAD, E.J.; BOOMSMA, J. J. Queen mating frequency and relatedness in young *Atta sexdens* colonies. **Insec. Soc.**, v. 47, p.354–356, 2000.
- GALAL, F.H. Comparison of RAPD and PCR-RFLP markers for classification and taxonomic studies of insects. **Egypt. Acad. J. biolog. Sci.**, v. 2 , n°. 2, p. 187-195, 2009.
- GUIMARÃES, C.T.; MAGALHÃES, J.V.; LANZA, M.A; SCLIUSTER, I. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, n°. 30, p.253, 2009.
- GRUTZMACHER, D.D.; LOECK, A.E.; OLIVEIRA, A.C.; FISCHER, S; ELIAS, S.A. Efeito do período de armazenamento em etanol sobre a qualidade e quantidade de DNA extraído de *Acromyrmex heyeri* (Forel, 1899) (Hymenoptera: Formicidae). **Rev. Brasil Agric.**, v. 12, n°. 1, p. 105-106, 2006.
- HAUFF, S.N. **Representatividade do Sistema Nacional de Unidades de Conservação na Caatinga**. Brasília: MMA. 54p, 2010.
- HAMRICK, J.L. The distribution of genetic variation within and among natural plant population. In: **Genetics and conservation** (C.M. Schone-Wald-Cox, S.H. Chambers, B. MacByde & L. Thomas, eds.). Benjamin Cummings Publishing Company, Menlo Park, p.335-348, 1983.
- HARDRYS, H.; BALICK, M.; SCHIERWATER, B. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. **Mol. Ecol.**, v.1,p. 55-66, 1992.
- HELMKAMPF, M.; GADAU, J.; FELDHAAR, H. Population and sociogenetic structure of *Atta colombica* (Formicidae, Myrmicinae) in the Barro Colorado Island area, Panama. **Insec. Soc.**, v.55, p. 434-442, 2008.
- HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E.O. **The Ants**. Belknap Press of Harvard University, Cambridge, MA, p 733, 1990.
- HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E.O. **The Leafcutter Ants**. W. W. Norton & Company, Original edition, 192 pp, 2010.
- HOWARD, J.J. Leafcutting ant diet selection: the role of nutrients water and secondary chemistry. **Rev. Ecol.**, v.68, p. 503-515, 1987.
- HUGHES, E.O.H.; BOOMSMA, J.J. Genetic diversity and disease resistance in leaf-cutting ant societies. **Evolution**, v. 58, n°. 6, p. 1251–1260, 2004.
- HUGHES, W.H.O.; BOOMSMA, J.J. Genetic polymorphism in leaf-cutting ants is phenotypically plastic. **Proc. R. Soc. Lond. B.**, v.274, p.1625–1630, 2007.
- HUGHES, W.H.O.; BOOMSMA, J.J. Genetic royal cheats in leaf-cutting ant societies. **PNAS**, v. 105, n°13, p. 5150–5153, 2008.

HUGHES, E.O.H.; BOT, A.N.M.; BOOMSMA, J.J. Caste-specific expression of genetic variation in the size of antibiotic-producing glands of leaf-cutting ants. **Proc. R. Soc. B**, v. 277, n°. 1681, p. 609-615, 2009.

IBGE. **Atlas Nacional do Brasil: Região Nordeste**. Rio de Janeiro: IBGE. 1985.

IBGE. **Manual Técnico da Vegetação Brasileira: Sistema fitogeográfico, Inventário das formações florestais e campestres, Técnicas e manejo de coleções botânicas, Procedimentos para mapeamentos**. Rio de Janeiro: IBGE. 2012.

JOHNSON, B. Division of labor in honeybees: form, function, and proximate mechanisms. **Behav. Ecol. Sociobiol.**, v. 64, p.305–316, 2010.

KERMARREC, A.; FEBVAY, G.; DECHARME, M. Protection of leaf cutting ants from biohazards: Is there a future for microbiological control, p. 339-355. In Lofgren, S. & R.K. Vander Meer (eds.), **Fire ants and leaf-cutting ants: biology and management**, Westview Press, Boulder and London, 433p. 1986.

LACERDA, D.R.; MACEDO, M.D.P.; LEMOS FILHO, J.P.; LOVATO, M.B. Review: A técnica de RAPD: uma ferramenta molecul ar em estudos de conservação de plantas. **Lundiana**, v. 3, n°. 2, p. 87-92, 2002.

LEAL, I.R. Diversidade de formigas em diferentes unidades de paisagem da Caatinga. In: LEAL, I.R., TABARELLI, M. & SILVA, J.M.C. (Eds.). **Ecologia e conservação da caatinga**. Recife: Editora Universitária da UFPE. pp. 435-462. 2003.

LEAL, I.R.; TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C. **Ecologia e conservação da Caatinga**. Editora Universitária, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil, pp.822. 2003.

LEAL, I.R.; SILVA, J.M.C.; TABARELLI, M.; LACHER, T.E. Mudando o curso da conservação da biodiversidade na Caatinga do Nordeste do Brasil. **Megadiversidade**, v.1, p.139-146, 2005.

LEAL, I.R.; WIRTH, R.; TABARELLI, M. The multiple impacts of leaf-cutting ants and their novel ecological role in human-modified neotropical forests. **Biotropica**, v. 46, n°. 5, p. 516–528, 2014.

LOPES, M.S.; LOPES, M.T.G.; FIGUEIRA, A.; CAMARGO, L.E.A.; FUNGARO, M.H.P.; CARNEIRO, M.S.; VIEIRA, M.L.C. Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP). **Biotec. Ciên. Desenvol.**, Uberlândia, v.5, n°.29, p.56-60, 2002.

LOPES, P.S.; TORRES, A.V. & PIRES, R.A. Genética de Populações. In: ____ **Teoria do melhoramento animal**. FEPMVZ-Editora, Belo Horizonte: cap.1, pp 11-25. 2005.

MALTA, J.; MARTINS, G.F.; MARQUES, A.E.; GAMES, P.D.; ZANUNCIO, J.C.; BARACAT-PEREIRA, M.C.; SALOMÃO, T.N.F. Insights Into the Proteome of the Spermatheca of the Leaf-Cutting Ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Florida Entomologist.**, v. 97, n°. 4 , p.1857- 1861, 2014.

- MARTINS JÚNIOR, J. Filogenia molecular de *Atta sexdens* (Myrmicinae: Attini) e investigação de pseudogenes em formigas da tribo Attini. 2011. 68 f. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2011.
- MEIRA-NETO, J.A.A.; MARTINS, F.R. Composição florística de uma floresta estacional semidecidual montana no município de viçosa-mg. **R. Árvore**, v.26, n°.4, p.437-446, 2002.
- MEHDIABADI, N. J.; SCHULTZ, T. R. Natural history and phylogeny of the fungus-farming ants (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae: Attini). **Myrmecol. News**, v.13, p.37–55, 2009.
- MEYER, S.T.; LEAL, I.R.; WIRTH, R. Persisting Hyper-abundance of Leaf-cutting Ants (*Atta* spp.) at the Edge of an Old Atlantic Forest Fragment. **Biotropica**, v. 41, n°.6, p.711-716, 2009.
- MORENO, S.; MARTIN, J.P.; ORTIZ, J.M. Inter-simple sequence repeats PCR for characterization of closely related grapevine germplasm. **Euphytica**, v.101, p.117-125, 1998.
- MOUTINHO, P.; NEPSTAD, D.C.; DAVIDSON, E.A. Influence of leaf-cutting ant nests on secondary forest growth and soil properties in Amazonia. **Ecol.**, v.84, p.1265- 1276, 2003.
- MUELLER, U.G.; WOLFENBARGER, L.L. AFLP genotyping and fingerprinting. **Tree**, v.14, p. 389-394, 1999.
- MUELLER, U.G.; SCHULTZ T.R.; CURRIE, C.R.; ADAMS, R.M.M.; MALLOCH, D. The origin of the attine ant-fungus symbiosis. **Q. Ver. Biol.**, v.76, p.169–197, 2001.
- MMA - Ministério do Meio Ambiente. Biodiversidade Brasileira: **Avaliação e identificação de áreas prioritárias para conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade brasileira**. Série Biodiversidade n°.5. Brasília. 2002.
- NASCIMENTO, M.A.; BATALHA-FILHO. H.; WALDSCHMIDT, A.M. TAVARES, M.G.; CAMPOS, L.A.O.; SALOMÃO, T.M.F. Variation and genetic structure of *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae) populations based on ISSR pattern. **Genet.Mol. Biol.**, v.33, n°.2, p.394-397, 2010.
- NIMER, E. Climatologia da região Nordeste do Brasil. Introdução à climatologia dinâmica. **Brasil Geog.**, v.34, p. 3-51, 1972.
- OLERUP, O.; ZETTERQUIST, H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence Specific primer (PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-reipient matching in cadaveric transplantation. **Tissue Antigens**, v. 39, p. 225-235, 1994.
- OLIVEIRA, G.V. Dieta da formiga cortadeira *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em uma área de Caatinga do Sudoeste da Bahia. 2012. 42 p. (Monografia – Especialização em Meio Ambiente e Desenvolvimento). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, UESB, Itapetinga – BA, 2012.

- OLDROYD, B.P.; FEWELL, J.H. Genetic diversity promotes homeostasis in insect colonies. **Trends Ecol. Evol.**, v.305, p.402–404, 2007.
- PAPLAUSKIENĖ, V.; ČEKŠTERYTĖ, V.; PAŠAKINSKIENĖ, I.; TAMAŠAUSKIENĖ, D.; RAČYS, J. The use of ISSR method for the assessment of bee genetic diversity. **Biologija**, v.3, p.16–20, 2006.
- PERFECTO, I.; VANDERMEER, J. Distribution and turnover rate of a population of *Atta cephalotes* in a tropical rain forest in Costa Rica. **Biotropica**, v.25, p. 316-332, 1993.
- PINHEIRO, M.H.O.; MONTEIRO, R. Florística de uma Floresta Estacional Semidecidual, localizada em ecótono savânico-florestal, no município de Bauru, SP, Brasil. **Acta bot. bras.**, v.22, n°.4. p. 1085-1094, 2008.
- PRADO, D. As Caatingas da América do Sul. In: I.R. LEAL, M. TABARELLI & J.M.C. SILVA (eds.). **Ecologia e conservação da Caatinga**. Editora Universitária. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil, cap.1, pp. 3-73. 2003.
- RAHIMI, A.; MIRMOAYEDI, A.; KAHRIZI, D.; ZAREI, L.; JAMALI, S. Genetic diversity of Iranian honey bee (*Apis mellifera meda* Skorikow, 1829) populations based on ISSR markers. **Cell. Mol. Biol.**, v.62, n°.4, p.53-58, 2016.
- RANDO, J.S.S.; FORTI, L.C. Ocorrência de formigas *Acromyrmex Mayr*, 1865, em alguns municípios do Brasil. **Acta Scienti. Biol. Scien.**, v. 27, n° 2, p.129-133, 2005.
- RAVARY, F.; LECOUTEY, E.; KAMINSKI, G.; CHALINE, N.; JAISSON, P. Individual experience alone can generate lasting division of labor in ants. **Curr. Biol.**, v.17, p.1308–1312, 2007.
- REIS, E.P.; SALOMÃO, T.M.F.; CAMPOS, L.A.O.; TAVARES, M.G. Genetic diversity and structure of *Atta robusta* (Hymenoptera, Formicidae, Attini), an endangered species endemic to the restinga ecoregion. **Genet. Mol. Biol.**, v.37, n° 3, p. 581-586, 2014.
- RICKLEFS, R. A Economia da Natureza. 5a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2003.
- RIZZINI, C.T.; COIMBRA-FILHO, A.F.; HOUAISS, A. Ecossistemas brasileiros/ Brazilian ecosystems. Enge-Rio Engenharia e Consultoria, S.A., Rio de Janeiro, Brasil, 1988.
- ROBINSON, G.E. Physiology as a caste-defining feature. **Insec. Soc.**, v. 56, p, 1–6, 2009.
- ROBINSON, G.E. Regulation of division of labor in insect societies. **Ann. Rev. Entomol.** v.37, p.637–665, 1992.
- RODOVALHO, C.M.; LYRA, M.L.; FERRO, M.; BACCI JR., M. The Mitochondrial Genome of the Leaf-Cutter Ant *Atta laevigata*: A Mitogenome with a Large Number of Intergenic Spacers. **PLoS ONE**, v. 9, n°.5, p.: e97117, 2014.

RUSSELL, A.; SAMUEL, R.; RUPP, B.; BARFUSS, M.H.J. Phylogenetics and cytology of a pantropical orchid genus *Polystachya* (Polystachyinae, Vandeae, Orchidaceae): Evidence from plastid DNA sequence data. **Taxon**, v. 59, p. 389- 404, 2010.

SAGHAI-MAROOF, M.A.; SOLIMAN, K.M.; JORGENSEN, R.A; et al. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. **PNAS**, v.81, p. 8014-8018, 1984.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, (2nd ed.), (pp. 10.51–10.67). Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SALMAN, A.K.D. **Conceitos básicos de genética de populações**. Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 27 p. 2007. (Documentos / Embrapa Rondônia, ISSN 0103-9865;118).

SAMPAIO, E.V.S.B. Overview of the Brazilian Caatinga. In: S.H. Bullock, H.A. Mooney & E. Medina (eds.). **Seasonally dry forests**. pp. 35-58. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido, 1995.

SANTOS, M.S.; LOUZADA, J.N.C.; DIAS, N.; ZANETTI, R.; DELABIE, J.H.C.; NASCIMENTO, I.C. Riqueza de formigas (Hymenoptera, Formicidae) da serapilheira em fragmentos de floresta semidecídua da Mata Atlântica na região do Alto do Rio Grande, MG, Brasil. **Iheringia, Sér. Zool.**, v.96, n°.1, p. 95-101, 2006.

SILVA, P.S.D. A distribuição das formigas cortadeiras (*Atta cephalotes*) e seu papel na regeneração de um trecho de floresta Atlântica Nordestina. 2008. 117 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal). Universidade Federal de Pernambuco, PE, Recife, 2008.

SILVA, P.S.D.; BIEBER, A.G.D.; LEAL, I.R.; WIRTH, R.; TABARELLI, M. Decreasing abundance of leaf-cutting ants across a chronosequence of advancing Atlantic forest regeneration. **J. Trop. Ecol.**, v. 25, p. 223-227, 2009.

SILVA, P.S.D.; BIEBER, A.G.D.; CORRÊA, M.M.; LEAL, I.R. Do leaf-litter attributes affect the richness of leaf-litter ants? **Neotrop. Entomol.**, v.40, n°. 5, p. 542-547, 2011.

SILVA, P.S.D.; LEAL, I.R.; WIRTH, R. ; MELO, F.P.L.; TABARELLI, M. Leaf-cutting ants alter seedling assemblages across second-growth stands of Brazilian Atlantic forest. **J. Trop. Ecol.**, v. 28, p. 1-8, 2012.

SILVA, P.S.D.; BIEBER, A.G.D.; KNOCH, T.A.; TABARELLI, M.; LEAL, I.R.; WIRTH, R. Foraging in highly dynamic environments: leaf-cutting ants adjust foraging trail networks to pioneer plant availability. **Entomol. Experim. Appl.**, v.147, p.110–119, 2013.

SHOUHANI, H.; DOUSTI, A.; RADJABI, R.; ZAREI, M. Application of ISSR to study the genetic diversity of honeybee (*Apis mellifera* L.) populations in some areas of Iran. **J. Bio. Sci. Biotech.**, v.3, n°.2, p. 127-131, 2014.

SOUSA, C. L. Avaliação da pressão antrópica sobre a cobertura vegetal nos municípios de Cedro e Solidão (sertão pernambucano) com o uso de imagens TM Landsat e Sistemas de Informações Geográficas / C. L. Sousa. – São José dos Campos: INPE, 2003.

- SOSA-CALVO, J.; SCHULTZ, T.R.; BRANDÃO, C.R.F.; KLINGENBERG, C.; FEITOSA, R.M. et al. *Cyatta abscondita*: Taxonomy, Evolution, and Natural History of a New Fungus-Farming Ant Genus from Brazil. **PLoS ONE**, v. 8, n°.11, p. e80498. doi:10.1371/journal.pone.0080498, 2013.
- SOLOMON, S.E.; BACCI JR. M.; MARTINS, JR. J.; VINHA, G.G.; MUELLER, U.G. Paleodistributions and comparative molecular phylogeography of leafcutter ants (*Atta* spp.) Provide New Insight into the Origins of Amazonian Diversity. **Plos One**, v. 3, n°. 7, p. 2738, 2008.
- STRADLING, D. J. The influence of size on foraging in the ant, *Atta cephalotes*, and the effect of some plant defence mechanisms. **J. Anim. Ecol.**, v. 47, p. 173-188, 1978.
- SUNNUCKS, P.; HALES, D.F. Numerous Transposed Sequences of Mitochondrial Cytochrome Oxidase I-II in Aphids of the Genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae). **Mol. Biol. Evol.**, v.13, p. 510-524, 1996.
- SCALDAFERRI, M.M. Diversidade genética em Velame Pimenta (*Croton linearifolius*) e Cassutinga (*Croton heliotropiifolius*) em ambientes silvestres no Sudoeste da Bahia. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) p.89. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2013.
- SCALDAFERRI, M.M.; FREITAS, J.S.; SANTOS, E.S.L.; VIEIRA, J.G.P. et al. Comparison of protocols for genomic DNA extraction from ‘velame pimenta’ (*Croton linearifolius*), a species native to the Caatinga, Brazil. **Afr. J. Biotechnol.**, v.12, p. 4761- 4766, 2013.
- SCHULTZ, T.R.; MEIER, R. A phylogenetic analysis of the fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini) based on morphological characters of the larvae. **System. Entomol.**, v.20, n°. 4, p. 337–370, 1995.
- SCHULTZ, T.R.; BRADY, S.G. Major evolutionary transitions in ant agriculture **PNAS**, v. 105, n°. 14, p. 5435–5440, 2008.
- SUEN, G.; TEILING, C.; LI L.; HOLT, C.; ABOUHEIF, E.; BORNBER, G-BAUER E. The Genome Sequence of the Leaf-Cutter Ant *Atta cephalotes* Reveals Insights into Its Obligate Symbiotic Lifestyle. **PLoS Genet.**, v.7, n°2, p.: e 1002007, 2011.
- ULYSSÉA, M.A.; BRANDÃO, C.F R. Ant species (Hymenoptera, Formicidae) from the seasonally dry tropical forest of northeastern Brazil: a compilation from field surveys in Bahia and literature records. **Rev. Brasil. Entomol.**, v. 57, n°.2, p. 217–224, 2013.
- VASCONCELOS, H. L. Distribution of *Atta* (Hymenoptera, Formicidae) in “terra-firme” rain forest of central Amazonia: density, species composition and preliminary results on effects of forest fragmentation. **Acta Amazon**, v.18, n°. 3 - 4, p. 309- 315, 1988.
- VASCONCELOS, H.L. Foraging activity of two species of leaf-cutting ants (*Atta*) in a primary Forest of the Central Amazon. **Insec. Soc.**, v.37, p. 131-145, 1990.

VASCONCELOS, H. L.; CHERRETT, J. Changes in leafcutting ant populations after the clearing of mature forest in Brazilian Amazonia. **Stud. Neotrop. Fauna Environ.**, v. 30, p.107–113, 1995.

VASCONCELOS, H. L.; VIEIRA-NETO, E.; MUNDIM, F.; BRUNA, E. Roads alter the colonization dynamics of a keystone herbivore in neotropical savannas. **Biotropica**, v. 38, p. 661–665, 2006.

VEAL, D.A.; TRIMBLE, J.E.; BEATTIE, A.J. Antimicrobial properties of secretions from the metapleural glands of *Myrmecia gulosa* (the Australian bull ant). **J. Appl. Bacteriol.**, v.72, p. 188-194, 1992.

VELOSO, H.P.; RANGEL-FILHO A. L. L.; LIMA, J.C.A. **Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal**. Rio de Janeiro, IBGE, 123p. 1991.

WARD, P. S. Ants. **Curr. Biol.**, v.16, p. 152-155, 2006.

WALSH, P.S.; METZGER, D.A.; HIGUCHI, R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. **Biotechniques**, v.10, p.506 – 513, 1991.

WALDSCHIMIDT, A.M. Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponae). **Braz. J. Genet.**, v. 20, nº. 3, p. 421-423, 1997.

WARD, P.; BRADY, S.; FISHER B.; SCHULTZ, T. The evolution of myrmicine ants: phylogeny and biogeography of a hyperdiverse ant clade (Hymenoptera: Formicidae). **Syst. Entomol.**, p.1-21, 2014.

WEBER, N.A. The biology of the fungus-growing ants, Part VII: The Barro Colorado Island, Canal Zone, species. **Rev. Entomol.**, v.12, p. 93-130, 1941.

WEBER, N.A. Fungus-growing ants. **Science** (Washington, D.C.), v. 153, p. 587-604, 1966.

WEBER, N.A. **Gardening Ants The Attines**. Philadelphia: Am. Philosc. Soc. 92. 146 pp. 1972.

WEBER, N.A. **Fungus ants. en social insects**. Vol.4 H.R.Hermann (Ed.). Academic Press, London. pp.255-363. 1982.

WILLIAMS, J.G.K. *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary marcadors are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.**, v.18, p.6531-6535, 1990.

WILSON, E.O. The defining traits of fire ants and leaf-cutting ants. In: Lofgren, C.S. & Vander Meer, R.K., eds., **Fire ants and leaf-cutting ants-biology and management**. Boulder. Westview Press.1986.

WILSON, E.O. Causes of ecological success: the case of the ants. **J. Animl. Ecol.**, v. 56, p.1–9, 1987.

WILLIAMSON, M. **Biological Invasions**. Chaoman and Hall, London.244 pp. 1996.

WIRTH, R.; HERZ, H.; RYEL, R.; BEYSCHLAG, W; HÖLLDOBLER, B. **The herbivory of leaf-cutting ants. A case study on *Atta colombica* in the tropical rainforest of Panama.** Ecological Studies 164. Heidelberg, Springer Verlag, pp.230. 2003.

WIRTH, R.; MEYER, S.T.; ALMEIDA, W.R.; JÚNIOR, M.V.A.; BARBOSA, V.S.; LEAL, I.R. Increasing densities of leaf-cutting ants (*Atta* spp.) with proximity to the edge in a Brazilian Atlantic forest. **J. Trop. Ecol.**, v. 23, p.501-504, 2007.

WILSON, E.O; NOWAK, M.A.Natural selection drives the evolution of ant life cycles. **Proc. Natl. Acad.Sci. USA.** v.111, n°.35, p. 12585–12590,2014.

YU, F.; BARRY, T. N.; MOUGHAN, P. J.; WILSON, G. F. Condensed tannin and gossypol concentrations in cottonseed and in processed cottonseed meal. **J. Sci. Food Agric.**, v.63, n°.1, p. 7-15, 1993.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: A review. **Mol. Ecol.**, v. 11, p. 1-16, 2002.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v. 20, p.176-183, 1994.

Os trabalhos a seguir foram elaborados segundo as normas das Revistas escolhidas: Enciclopédia Biosfera (Capítulo I), Multi-Sciense Journal (Capítulo II) e Genetic and Molecular Biology (Capítulo III).

CAPÍTULO I

Artigo aceito para publicação pelo periódico Enciclopédia Biosfera

COMPARAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DA ESPÉCIE *Atta sexdens* (HYMENOPTERA:FORMICIDAE)

Carla Faine Matos Oliveira¹, Samuel Oliveira Rocha², Cibelle Santos Dias³, Elisa Susilene Lisboa dos Santos⁴, Carlos Bernard Moreno Cerqueira Silva^{4*}

¹ Mestre em Ciências Ambientais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, Bahia, Brasil

² Mestrando em Zootecnia, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, Bahia, Brasil

³ Licenciada em Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, Bahia, Brasil

⁴ Docente, Departamento de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, Bahia, Brasil (*csilva@uesb.edu.br)

RESUMO

As formigas cortadeiras (*Atta* e *Acromymex*) se destacam tanto como praga agrícola, como pelo potencial modificador de ambientes naturais e antropizados. Considerando a importância ecológica e econômica das formigas cortadeiras, estudos genético-moleculares têm sido realizados com vistas ao entendimento da diversidade e estrutura genética das suas populações. Visando contribuir para o avanço de estudos genéticos para *Atta sexdens*, espécie de mais ampla distribuição do gênero e considerada como principal praga agrícola, objetivou-se comparar a eficiência de seis protocolos de extração de DNA, bem como, testar o uso de diferentes partes do corpo da formiga para a obtenção de DNA genômico para essa espécie. Os resultados revelam que três protocolos (P1, P4 e P5) foram mais eficientes para a extração de DNA genômico. Além disso, verificou-se a influência da utilização de diferentes partes do corpo da formiga na obtenção de DNA genômico, sendo os tratamentos 'Mesossoma, Pernas e Gáster' e 'Corpo Inteiro', aqueles que possibilitaram a obtenção de maior quantidade e qualidade de DNA. Este estudo comprova a eficiência de três protocolos de extração dentre os seis que foram testados para *A. sexdens*, podendo-se utilizar o Corpo Inteiro da formiga, retirando apenas o Gáster para a maceração, caso o destino do material extraído seja para estudos com marcadores moleculares dominantes.

PALAVRAS-CHAVE: Formiga cortadeira, genética molecular, inseto social.

COMPARISON OF PROTOCOLS FOR THE EXTRACTION OF GENOMIC DNA OF THE SPECIES *Atta sexdens* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

ABSTRACT

Leaf-cutting ants (*Atta* and *Acromymex*) stand out as both agricultural plague and their potential modifier of natural and anthropized environments. Considering the ecological and economic importance of leaf-cutting ants, genetic-molecular studies have been carried out with a view to understanding the diversity and genetic structure of their populations. Aiming to contribute to the advancement of genetic

studies for *Atta sexdens*, a species with the broadest distribution of the genus and considered as the main agricultural pest, the objective was to compare the efficiency of six DNA extraction protocols, as well as to test the use of different parts of the ant body to obtain genomic DNA for this species. The results show that three protocols (P1, P4 and P5) were more efficient for extracting genomic DNA. In addition, the influence of the use of different parts of the ant body on obtaining genomic DNA was verified, being the treatments 'Mesosoma, Legs and Gáster' and 'Full Body', those that enabled the obtaining of greater quantity and quality of DNA. This study proves the efficiency of three extraction protocols among the six that were tested for *A. sexdens*, using the whole body of the ant, only removing the gaster for maceration, if the destination of the extracted material is for studies with dominant molecular markers.

KEYWORDS: leaf-cutting ant, molecular genetics, social insect.

INTRODUÇÃO

As formigas constituem um grupo de sucesso dentre os animais invertebrados, sendo parte desse grupo conhecido como formigas cortadeiras (Myrmicinae: Attini) (WARD et al., 2014), cuja distribuição abrange a região Neotropical (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990). As formigas cortadeiras compreendem os gêneros *Atta* e *Acromyrmex* que ao longo de milhões de anos desenvolveram o hábito de cultivar fungos (WARD et al., 2014). Para tanto, estas formigas, em geral desempenham a sua atividade forrageadora em busca de folhas, flores e frutos, os quais são cortados e levados para a colônia para serem utilizados como substrato pelo fungo simbiote.

Atta sexdens é uma espécie de formiga cortadeira popularmente conhecida como saúva e promove intensa atividade desfolhadora dos vegetais estabelecidos próximos aos seus ninhos, o que leva essas formigas a serem consideradas como “pragas” às culturas agrícolas (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990). Por outro lado, durante a fundação e manutenção do ninho no ambiente estas formigas contribuem para mudanças físico-químicas e biológicas favoráveis ao desenvolvimento vegetal (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990), fato que as transformam em engenheiras dos ecossistemas (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990; LEAL et al., 2014).

Diante da importância ecológica e econômica, as formigas cortadeiras têm sido alvo de estudos associados à biologia, comportamento e genética populacional. No que diz respeito a estudos genéticos moleculares, a utilização de diferentes protocolos de extração de DNA genômico tem se mostrado necessária para a realização das mais diversas técnicas moleculares.

Segundo ASGHAR et al. (2015) a extração do DNA dos insetos pode ser realizada usando desde técnicas moleculares mais simples até as mais avançadas. A seleção da técnica de extração de DNA, independente dos organismos a ser avaliado, depende da amostra estudada, do tempo necessário para a extração, suporte econômico da técnica (devido aos reagentes e equipamentos utilizados na extração) e mais importante, a qualidade do DNA extraído. Neste sentido, comumente são realizados estudos de comparação e otimização de protocolos para extração de DNA (SCALDAFERRI et al., 2013; DALBOSCO et al., 2015; VIANA et al., 2015; ZORTÉA et al., 2016).

Na literatura há registro de diferentes métodos de extração de DNA que têm sido utilizados para formigas cortadeiras (DOYLE & DOYLE, 1990; WALDSCHMIDT et al., 1997). No entanto, há apenas um registro de estudo avaliando protocolos de

extração com *A. sexdens* (CARVALHO & VIEIRA 2001) para determinar a eficiência na obtenção de DNA genômico desta espécie. Neste estudo os autores detectaram diferença na qualidade e quantidade do DNA obtido para a subespécie *A. sexdens rubropilosa*. Entretanto, o estudo citado não determinou se existe alguma influência das partes do corpo da formiga utilizadas para obtenção de DNA genômico.

Em relação à fonte de tecido utilizada para extração de DNA genômico de formigas cortadeiras os registros na literatura apontam para o uso de diferentes tecidos, a exemplo da: Cabeça (CARVALHO & VIEIRA, 2001; CANTAGALLI et al., 2013), Cabeça e Mesossoma (REIS et al., 2014) e Corpo Inteiro (GRUTZMACHER et al., 2002; KAKAZU et al., 2013), inexistindo contudo comparação que possibilite justificar a escolha de um tecido em detrimento do outro.

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo comparar a eficiência de seis protocolos de extração de DNA genômico em *Atta sexdens*, bem como testar qual a parte do corpo desta espécie seria mais eficiente para potencializar a obtenção de DNA genômico.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletados espécimes de *Atta sexdens* em colônias localizadas em um fragmento de Floresta Estacional Semidecidual (15°15'S e 040°17'O), popularmente conhecida como “mata de cipó”, localizada nas proximidades da UESB, *campus* de Itapetinga, Bahia. Os espécimes coletados foram armazenados em Ultra-Freezer no Laboratório de Genética Molecular Aplicada - LGMA (UESB, Itapetinga). Para os testes foram utilizados seis protocolos de extração de DNA genômico disponíveis na literatura e já adotados por vários grupos de pesquisas para diferentes espécies vegetais, a saber: SUNNUCKS & HALES (1996), método DOYLE & DOYLE (1990), método modificado por ŠTORCHOVÁ et al. (2000), método modificado por RUSSEL et al. (2010), MOGG & BOND (2003) e BARNWELL et al. (1998). Neste estudo os protocolos acima citados foram identificados respectivamente, como P1, P2, P3, P4, P5 e P6.

Para todos os protocolos foram consideradas a utilização das seguintes partes do corpo como fontes de tecido: ‘Cabeça’ (CB), ‘Mesossoma, Perna e Gáster’ (MPG), e ‘Corpo Inteiro’ (CI). As extrações foram realizadas em duplicatas, sendo utilizada em cada uma das extrações cinco operárias médias de tamanho médio 1,5mm (independente de protocolo e fonte de tecido utilizado). Após serem maceradas em solução tampão (com volume padronizado de 750 µl) o material foi transferido para tubos *ependorfs* de 2 mL e, por fim, quando já obtido o DNA genômico da espécie, as amostras foram armazenadas em tubos de 1,5 ml a 4° C.

A qualidade das extrações foi avaliada em gel de agarose a 1% (m/v) por eletroforese (90 min sob uma corrente elétrica de 90 V) e visualizados com o tampão *Gel Red* (adotando-se as especificações do fabricante) num sistema de documentação fotográfica Kodak, com a incidência de luz UV. Para quantificação da concentração de DNA (ng/ml-1) adotou-se um marcador de peso padrão (DNA Lambda não digerido) nas concentrações de 50, 100 e 200ng de DNA por microlitro. A quantificação espectrofotométrica também foi realizada utilizando o *Biodrop (Whitehead Scientific)* considerando as razões $A_{260/280}$, (onde A_{260} equivale aos valores quantificados de ácidos nucleicos e, A_{280} equivale aos valores proteína nas amostras analisadas) para estimativa da concentração e da qualidade do DNA obtido.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observada diferença na eficiência dos seis protocolos quanto à quantidade e qualidade do DNA extraído para *Atta sexdens*, bem como se observou influência do tecido utilizado na extração. Os resultados da eletroforese revelam que os melhores protocolos para a extração de DNA genômico, tendo-se como base a quantidade de DNA estimada e o sucesso da extração a partir dos diferentes tecidos, foram P1, P4 e P5 nos quais todos os tecidos (CB, MPG e CI) apresentaram DNA com padrão de banda desejado no gel de agarose (*i.e.*, banda visível e com pouco arraste indicando maior integridade do DNA obtido). Em relação aos protocolos que não se mostraram eficientes para todas as amostras, mas apresentaram extrações de DNA para algumas das partes do corpo, destacaram-se P2 para os tecidos MPG e CI, P3 para os tecidos MPG e CI e também P6 para o tecido CI (Figura 1).

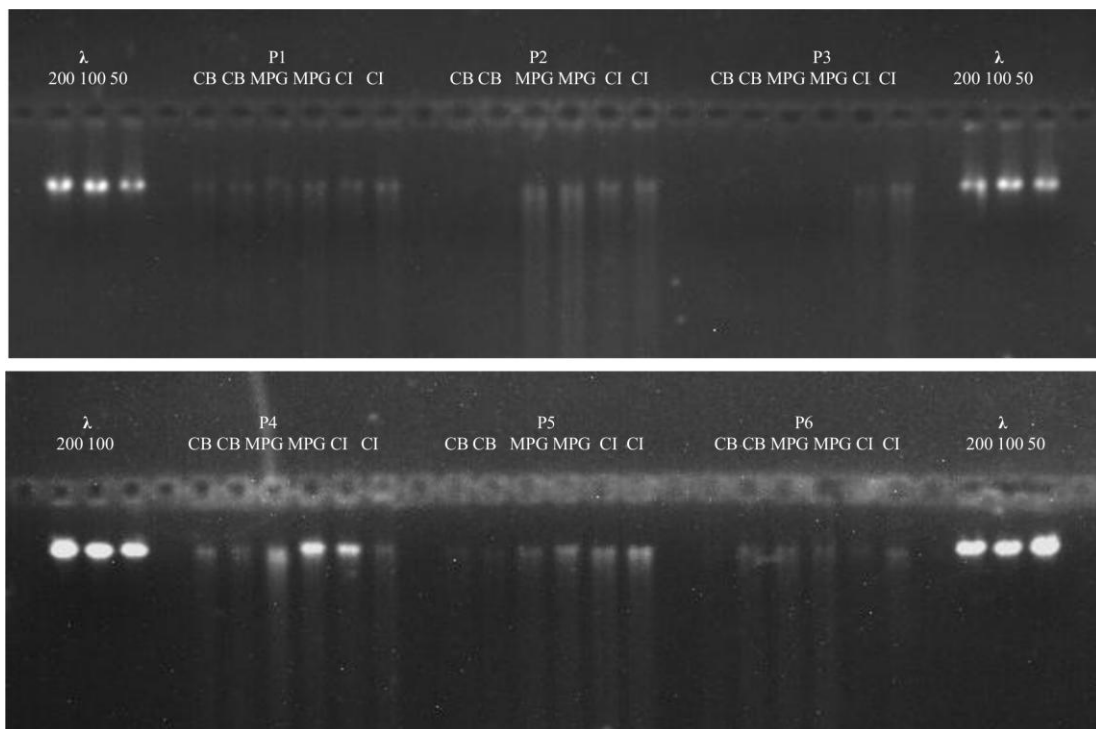


FIGURA 1. DNA genômico da formiga cortadeira *Atta sexdens* obtido a partir de seis protocolos de extração P1 a P6 que correspondem respectivamente aos protocolos: SUNNUCKS & HALES (1996), método DOYLE & DOYLE (1990), método modificado por STORCHOVA et al. (2000), método modificado por RUSSEL et al. (2010), MOGG & BOND (2003) e BARNWELL et al. (1998). Para a espécie *A. sexdens*, utilizou-se diferentes partes do corpo como fonte de tecido para extração ('CB – 'Cabeça'; MPG – 'Mesossoma, Pernas e Gáster'; CI – 'Corpo Inteiro'). O marcador de peso padrão (DNA Lambda não digerido) foi adotado nas concentrações de 200, 100 e 50 ng de DNA Lambda (Invitrogen).

Os protocolos de extração de DNA aplicados no presente estudo vem sendo utilizados em extrações de DNA genômico de plantas com diferentes finalidades (CERQUEIRA-SILVA et al., 2014; DALBOSCO et al., 2015; SANTOS et al. 2015; ZORTÉA et al., 2016; ROCHA et al., 2016) e com exceção do Protocolo 2, não haviam sido testados para espécies de animais, tampouco havia registro de comparação entre estes em relação aos diferentes tecidos utilizados para a obtenção de DNA genômico de formigas cortadeiras.

Ao utilizar os seis protocolos de extração deste estudo, porém com a espécie de planta *Croton linearifolius* (Euphorbiaceae), SCALDAFERRI et al. (2013) registraram o P1 como o menos eficiente e os demais protocolos como satisfatórios para a extração de DNA de *C. linearifolius*. Tal contraste deve estar associado às grandes variações entre o material biológico utilizado nesses dois estudos, sendo esperada a existência de compostos secundários distintos entre tecidos de vegetais e de insetos.

Os seis protocolos testados, no presente estudo, apresentaram técnicas de extração mais econômicas, variando a composição das soluções tampão: Dodecil Sulfato de Sódio 'SDS 10%' (P1), Brometo de Cetil Trimetil de Amônia 'CTAB' 5% (P2), 'Manitol' (P3), Sorbitol (P4), 'SDS 0,7% e Cloreto de sódio 'NaCl' (P5), e por fim 'CTAB' 2% (P6).

Os melhores protocolos de extração foram P1, P4 e P5 (SDS 10%, Sorbitol, e 'SDS e NaCl', respectivamente), seguido dos demais protocolos P2, P3 e P6 ('CTAB', 'Manitol', e 'CTAB e NaCl', respectivamente) que foram menos indicados para extração de DNA de *Atta sexdens*. A diferença na qualidade de extração observada em relação aos protocolos utilizados pode ser explicada em parte pelos tipos de reagentes e soluções que as compõem, sendo que a solução tampão tem importância fundamental no rompimento da membrana celular dos tecidos animais utilizados. O 'SDS' e o 'CTAB' são compostos orgânicos com propriedades surfactantes (aniônicas) usado para ajudar a lise celular. Além disso, o 'SDS' pode agir também desnaturando proteínas.

Esses dados corroboram em parte com os resultados obtidos por CARVALHO & VIEIRA (2001), pois um dos protocolos indicados por estes autores apresentou solução tampão composto por 'SDS'. Em relação ao protocolo com menor qualidade na extração de DNA, (DOYLE & DOYLE, 1990), este era composto pela solução tampão 'CTAB', utilizada nos protocolos P2 e P6 do presente trabalho. Segundo CARVALHO & VIEIRA (2001), a concentração de 'CTAB' utilizada no tampão (5%) pode ter sido inadequada para a extração de DNA de *Atta sexdens rubropilosa*. Corroborando com os resultados obtidos neste estudo, os protocolos que se mostraram menos adequados para a extração de DNA de *Atta sexdens* foram os protocolos que apresentaram em sua composição solução tampão contendo 'CTAB' (2% e 5%) e, além disso, o protocolo que continha em sua composição a substância 'Manitol'.

GRUTZMACHER et al. (2002) mesmo não encontrando diferença quanto à obtenção de DNA genômico entre os quatro protocolos que testaram para *Acromyrmex heyeri*, indicaram preferencialmente o uso de protocolos com baixo custo, rapidez, praticidade e menor agressividade ao meio ambiente (priorizando a ausência ou redução de produtos tão tóxicos, como é o caso do fenol, presente em muitos protocolos de extração de DNA). Portanto, se faz necessário na etapa de extração de DNA genômico a avaliação do custo-benefício que cada protocolo pode oferecer, a fim de minimizar os impactos negativos gerados com as diferentes

aplicações das técnicas de extrações de DNA genômico realizadas para várias espécies.

Para o grupo dos insetos, ASGHAR et al. (2015) apontam as técnicas Chelex, Chargswitching, DNAzol e prepGEM como mais rentáveis por fazer uso de pequeno número de reagentes, por haver menor necessidade de gestão de resíduos e propiciar a extração rápida com obtenção de DNA (entre 10 - 40 min). Apesar da relação custo-benefício das técnicas apontadas pelos autores, estudos com formigas cortadeiras fazem uso de técnicas de extração ainda mais simples e menos custosas, porém com maior gasto de tempo para extração de DNA genômico de *A. sexdens*.

Conforme os tratamentos utilizados neste estudo, é possível indicar, ao menos nas condições testadas, o uso do tecido MPG, seguida pelo uso do tecido CI, como sendo os mais adequados para extração de DNA em *Atta sexdens*. Embora as partes MPG e CI tenham sido os tecidos com maior qualidade de DNA, ressalta-se a necessidade de retirada do Gáster quando o objetivo do estudo envolver o sequenciamento e/ou estudo de polimorfismo baseado em marcadores arbitrários (não espécie-específicos). Esse cuidado é necessário para evitar que possíveis contaminações presentes no Gáster do indivíduo (restos de alimentos) possam levar a falhas na genotipagem. Como todas as formigas cortadeiras (*Atta* e *Acromyrmex*) possuem morfologia corporal muito similar entre si (BACCARO et al., 2015), certamente os resultados apresentados quando à melhor parte do corpo para fazer extração de DNA também podem ser aplicados às demais espécies de cortadeiras.

Considerando os resultados de quantificação espectrofotométrica, realizada com o *Biodrop*, observou-se resultados diferentes em relação aos protocolos com maior e menor concentração estimada de DNA, tendo o protocolo três apresentado valores da razão A_{260}/A_{280} igual a 2.13 (para CB), enquanto o protocolo seis apresentou valor igual a 9.56 (para CB) (Tabela 1).

A existência de impurezas de natureza proteica e de ácidos nucleicos foi observada nas extrações realizadas, visto que os protocolos apresentaram valores de A_{260}/A_{280} inferiores ou maiores que 1.8 (Tabela 1). As amostras que apresentaram contaminação por proteínas foram P1 (MPG), P4 (MPG e CI) e P6 (CI). Todas as amostras com valores maiores que 1.8 e próximos a 2.0 apresentaram presença de RNA (CB: P1, P2, P3, P4, P5; MPG P6; CI P2). As amostras mais puras pertenceram aos protocolos P1 (CI = 1.85), P2 (MPG = 1.85) e P5 (MPG = 1.89, CI = 1.84), pois obtiveram média próxima a 1.8.

As estimativas de contaminantes podem ser justificadas devido à ausência de Proteinases e Rnases nas soluções de extração adotadas nos protocolos testados. A presença de proteínas nas amostras analisadas, pós-extração, também foi observada no estudo realizado por VIANA et al. (2015), que utilizaram oito protocolos de extração para a palmeira Babassú (*Orbignya phalerata*) e encontraram variação na pureza das amostras entre os protocolos testados.

A presença de resíduos de RNA, e mesmo de proteínas, em amostras que serão utilizadas para estudos de diversidade com marcadores moleculares, via de regra, não se apresenta como limitação. Além do que, testes preliminares de amplificação, comumente realizados em estudos dessa natureza, poderão confirmar em cada caso, a necessidade de uso de Rnases. A ausência de influência de tais contaminantes em reações de PCR foi verificada por SCALDAFERRI et al. (2013).

TABELA 1. Média geral da quantificação espectrofotométrica das extrações realizadas com seis protocolos (*descrição) utilizando os diferentes tecidos da espécie *Atta sexdens*: Cabeça (CB), Mesossoma, Pernas e Gáster (MPG), Corpo Inteiro (CI). Para a obtenção desses valores foram realizadas três leituras em cada repetição (fonte de tecido x protocolo) e posteriormente calculou-se a média. Considerou-se o valor de absorbância das razões $A_{260/280}$ para estimativa da pureza das amostras.

Protocolo 1					Protocolo 2				
Tecido	Absorbância				Tecido	Absorbância			
	A_{260}	A_{280}	$A_{260/280}$	ng/ μ l		A_{260}	A_{280}	$A_{260/280}$	ng/ μ l
CB	0,18	0,12	1.92	136,63	CB	0,10	0,06	2.01	90,84
MPG	0,09	0,25	1.71	50,64	MPG	0,16	0,10	1.85	126,17
CI	0,24	0,15	1.85	184,07	CI	0,79	0,37	1.97	729,83
Protocolo 3					Protocolo 4				
Tecido	Absorbância				Tecido	Absorbância			
	A_{260}	A_{280}	$A_{260/280}$	ng/ μ l		A_{260}	A_{280}	$A_{260/280}$	ng/ μ l
CB	0,02	0,01	2.13	2650,32	CB	0,02	0,01	2.05	20,95
MPG	0,02	0,02	2.11	15,68	MPG	0,02	0,01	1.77	11,51
CI	0,03	0,02	1.82	20,24	CI	0,04	0,03	1.68	991,03
Protocolo 5					Protocolo 6				
Tecido	Absorbância				Tecido	Absorbância			
	A_{260}	A_{280}	$A_{260/280}$	ng/ μ l		A_{260}	A_{280}	$A_{260/280}$	ng/ μ l
CB	0,04	0,01	2.10	51,50	CB	-0,02	-0,03	9.57	2.367,6
MPG	0,26	0,21	1.89	209,68	MPG	0,02	0,00	2.04	48,30
CI	0,28	0,18	1.84	215,37	CI	0,15	0,09	1.65	141,41

*Descrição dos Protocolos: P1-SUNNUCKS & HALES (1996); P2-Método DOYLE & DOYLE (1990); P3-Método modificado por STORCHOVA et al. (2000); P4-Método modificado por RUSSEL et al. (2010); P5-MOGG & BOND (2003); P6- BARNWELL et al. (1998).

Em síntese, de acordo com a quantificação espectrofotométrica analisada para todas as amostras, os melhores protocolos (citando-os na categoria decrescente a partir do melhor valor quantificado na extração) foram P1, P2, P5, P4, P3 e P6. Corroborando em grande parte os dados obtidos para a análise feita a partir do gel de eletroforese, onde foi observado como melhores protocolos P1, P4 e P5. Ao avaliar a fotografia do gel de agarose, comparativamente com os dados espectrofotométricos, observou-se que as amostras CB e MPG de P3, e CB de P2 não permitiram visualização no gel apesar dos valores de absorbância serem significativos (CB= 2.13 e MPG=2.11, P3; CB= 2.01, P2), o que pode ser explicado porque apesar da presença de ácidos nucleicos, as amostras encontravam-se degradadas impedindo que houvesse a formação de marcas, sendo possível visualizar apenas o arraste no gel. Esse mesmo resultado pode ser observado para a amostra CB de P6, cujo valor de absorbância A_{260}/A_{280} foi igual a 9.56.

No geral, considera-se que a amostra do tecido CI pertencente aos protocolos P1, P2, P3 e P5, que por sua vez, correspondem à metade dos protocolos utilizados neste estudo, apresentaram valores da razão A_{260}/A_{280} entre 1.8 e 2.0 e por isso a análise espectrofotométrica confirma as boas condições de extração de DNA para a espécie *Atta sexdens* já indicada pela análise do gel.

CONCLUSÕES

A eficiência diferenciada dos protocolos foi confirmada, sendo possível, a despeito da possibilidade de uso de diferentes protocolos, indicar preferencialmente o protocolo SUNNUCKS & HALES (1996), seguido dos protocolos Método modificado por RUSSEL et al. (2010) e MOGG & BOND (2003) para extração de DNA em *Atta sexdens*. Não foi constatada a necessidade de separar partes do corpo para a extração, sendo possível, ao menos para os protocolos selecionados a utilização do Corpo Inteiro da formiga, para obtenção de melhor obtenção de DNA genômico de *A. sexdens*.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), BA, Brasil, pela infraestrutura fornecida para a condução dos experimentos, à FAPESB (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia) pela concessão da bolsa de estudo aos três primeiros autores.

REFERÊNCIAS

- ASGHAR, U.; MALIK, M.F.; ANWAR, F.; JAVED, A.; RAZA, A. DNA extraction from insects by using different techniques: A Review. **Advances in Entomology**, v.3, p.132-138, 2015. Disponível em: <http://file.scirp.org/pdf/AE_2015082615372116.pdf>. DOI: <http://dx.doi.org/10.4236/ae.2015.34016>
- BACCARO, F.B.; FEITOSA, R.M.; FERNANDEZ, F.; FERNANDES, I.O.; IZZO, T.J.; SOUZA, J.L.P.; SOLAR, R. **Guia para o gênero de formigas do Brasil**. Editora Inpa – Manaus, 2015. Disponível em: <https://ppbio.inpa.gov.br/sites/default/files/Livro_Formigas_2015_0.pdf>.
- BARNWELL, P.; BLANCHARD, A.N.; BRYANT, J.A.; SMIRNOFF, N. Isolation of DNA from the highly mucilaginous succulent plant *Sedum telephium*. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 16, p.133-138, 1998. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1023/A:1007473302551>>. DOI: 10.1023/A:1007473302551
- CANTAGALLI, L.; MANGOLIN, C.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M.C. Population genetics of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Acta Biológica Colombiana**, v.18, n.1, p. 179– 190, 2013. Disponível em: <<http://www.scielo.org.co/pdf/abc/v18n1/v18n1a13.pdf>>.
- CARVALHO, A.; VIEIRA, L. Determinação das Condições Ótimas para Análises de PCR-RAPD em *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). **Neotropical Entomology**, v.30, n.4, p. 593-600, 2001. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/ne/v30n4/a13v30n4.pdf>>. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2001000400013>
- SILVA, C.B.M.C.; SANTOS, E.S.L.; NUNES, O.; VIEIRA, J.G.P.; MORI, G.M.; CORREA, R.X.; SOUZA, A.P. Molecular Genetic Variability of Commercial and Wild Accessions of Passion Fruit (*Passiflora* spp.) Targeting ex Situ Conservation and

Breeding. **International Journal of Molecular Sciences**, v.15, p. 22933-22959, 2014.

DALBOSCO, E.Z.; SILVA, C.G.; LOMBERTI, E.A.; MIRANDA, M.A.F.; SILVA, C.A. Otimização do protocolo para extração de dna genômico de *Epidendrum viviparum* Lindl. (Orchidaceae). **Enciclopédia Biosfera**, v.11, p.3236-3243, 2015. Disponível em: <<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2015b/multidisciplinar/Otimizacao.pdf>>

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p. 13-15, 1990. DOI: 10.1007/978-3-642-83962-7_18

GRUTZMACHER, D.D.; ZIMMER, P.D.; OLIVEIRA, A.C.; LOECK, A.E.; FISCHER, S.; ELIAS, A.S.; VARGAS, C.C.J. Comparação De Protocolos Para Extração de DNA de *Acromyrmex heyeri*. **Revista brasileira Agrocência**, v.8 n.2, p. 165-167, 2002. Disponível em: <<https://periodicos.ufpel.edu.br/ojs2/index.php/CAST/article/view/445/450>>. DOI:<http://dx.doi.org/10.18539/cast.v8i2.445>

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. **The Ants**. Cambridge, MA: Belknap (Harvard University Press), 1990.

KAKAZU, S.; SANCHES, A.; BACCI JR., M. Microsatellite loci characterize in the leaf-cutter ant *Atta laevigata*. **BMC Research Note**, v.6, p.328-331, 2013. Disponível em: <<http://bmcresearchnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-0500-6-328>>. DOI: 10.1186/1756-0500-6-328

LEAL, I.R.; WIRTH, R.; TABARELLI, M. The multiple impacts of leaf-cutting ants and their novel ecological role in human-modified neotropical forests. **Biotropica**, v.46 , n.5, p. 516–528, 2014. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/263446164_The_Multiple_Impacts_of_Leaf-Cutting_Ants_and_Their_Novel_Ecological_Role_in_Human_Modified_Neotropical_Forests>. DOI: 10.1111/btp.12126

MOGG, R.J.; BOND, J.M. A cheap, reliable and rapid method of extracting high-quality DNA from plants. **Molecular Ecology Notes**, v.3, p. 666-668, 2003. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1471-8286.2003.00548.x/abstract>>. DOI: 10.1046/j.1471-8286.2003.00548.x

REIS, E.; SALOMÃO, T.; CAMPOS, L.; TAVARES, M. Genetic diversity and structure of *Atta robusta* (Hymenoptera, Formicidae, Attini), an endangered species endemic to the restinga ecoregion. **Genetics and Molecular Biology**, v. 37 , n.3, p. 581-586, 2014. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/gmb/v37n3/a15v37n3.pdf>>. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572014000400015>

RUSSELL, A.; SAMUEL, R.; RUPP, B.E.; BARFUSS, M.H.J. Phylogenetics and cytology of a pantropical orchid genus *Polystachya* (Polystachyinae, Vandaeae, Orchidaceae): Evidence from plastid DNA sequence data. **Taxon**, v.59, p. 389- 404, 2010. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Michael_Barfuss/publication/233498181_Phylogenetics_and_cytology_of_a_pantropical_orchid_genus_Polystachya_Polystachyinae>

[_Vandaeae_Orchidaceae_Evidence_from_plastid_DNA_sequence_data/links/0fcfd513e0061e6974000000.pdf](#)>. DOI: 10.2307/25677598

ROCHA, T.O.; FREITAS, J.S.; SANTOS, E.S.L.; SCALDAFERRI, M.M.; OLIVEIRA, C.G.; Cerqueira-Silva, C.B.M. Estimate of diversity and structure genetic in cassutinga (*Croton heliotropiifolius*) based on molecular markers. **African Journal of Biotechnology**, v.15, p.518-523, 2016. DOI: 10.5897/AJB2015.15009
Disponível em <<http://academicjournals.org/journal/AJB/article-abstract/D2C5E6E57773>>

SANTOS, E.S.L.; CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; MORI, G.M.; AHNERT, D.; MELO, D.; PIRES, J.L.; CORREA, R.X.; SOUZA, A.P. Genetic Structure and Molecular Diversity of Cacao Plants Established as Local Varieties for More than Two Centuries: The Genetic History of Cacao Plantations in Bahia, Brazil. **Plos One**, v.10, p. e0145276-, n. 2015. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0145276>> Doi:
10.1371/journal.pone.0145276

SCALDAFERRI, M.M.; FREITAS, J.S. SANTOS, E.S.L.; VIEIRA, J.G.P. et al. Comparison of protocols for genomic DNA extraction from 'velame pimenta' (*Croton linearifolius*), a species native to the Caatinga, Brazil. **African Journal of Biotechnology**, v.12, p. 4761- 4766, 2013. Disponível em: <www.ajol.info/index.php/ajb/article/download/134029/123639>. DOI: 10.5897/AJB2013.12182

ŠTORCHOVÁ, H.; HRDLIČKOVÁ, R.; CHRTEK, J.; TETERA, M. An improved method of DNA isolation from plants collected in the field and conserved in saturated NaCl/CTAB solution. **Taxon**, v. 49, p. 79-84, 2000. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Judith_Fehrer/publication/231168415_An_Improved_Method_of_DNA_Isolation_from_Plants_Collected_in_the_Field_and_Conserved_in_Saturated_NaClCTAB_Solution/links/02e7e5236ce9a82188000000/An-Improved-Method-of-DNA-Isolation-from-Plants-Collected-in-the-Field-and-Conserved-in-Saturated-NaCl-CTAB-Solution.pdf>. DOI: 10.2307/1223934

SUNNUCKS, P.; HALES, D.F. Numerous Transposed Sequences of Mitochondrial Cytochrome Oxidase I-II in Aphids of the Genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae). **Molecular Biology and Evolution**, v.13, p. 510-524, 1996. Disponível em: <<http://mbe.oxfordjournals.org/content/13/3/510.full.pdf>>. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025612>

VIANA, J.P.G.; BORGES, A.N.C.; LOPES, A.C.A.; GOMES, R.L.F.; BRITTO, F.B.; LIMA, P.S.C.; VALENTE, S.E.S. Comparison of eight methods of genomic DNA extraction from babassu. **Genetic and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 18003-18008, 2015. Disponível em:
<<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1032404/1/gmr7709.pdf>>. DOI: <http://dx.doi.org/10.4238/2015>.

WALDSCHMIDT, A.M.; SALOMÃO, T.M.F.; BARROS, E.G; CAMPOS, L.A.O. Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). **Brazilian Journal of Genetics**, v.20, p, 421-423, 1997. Disponível em:

< http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-84551997000300011>.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-84551997000300011>

WARD, P.; BRADY, S.; FISHER, B.; SCHULTZ, T. The evolution of myrmicine ants: phylogeny and biogeography of a hyperdiverse ant clade (Hymenoptera: Formicidae). **Systematic Entomology**, p.1-21, 2014. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/syen.12090/pdf>>.DOI: 10.1111/syen.12090

ZORTÉA, K.E.M.; MIKOVSKI, A.I.; CASTRILLON, R.G.; RUZZA, D.A.C.; ROSSI, A.A.B. Estabelecimento de protocolo de extração de DNA para *Eugênia stipitata* mc. vaung, visando estudos moleculares. **Enciclopédia Biosfera**, v.13, p.495-502, 2016. Disponível em: <<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2016b/agrarias/Estabelecimento%20de%20protocolo.pdf>>

CAPÍTULO II

Nota científica aceita para publicação pelo periódico Multi-Science Journal Comunicação breve

Caracterização e seleção de regiões ISSR para análise genético-populacional de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae)

Characterization and selection of ISSR regions for genetic-population analysis in *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae)

Título resumido: Caracterização e seleção de marcadores moleculares em *Atta sexdens*

Carla Faine Matos-Oliveira¹, Cibelle Santos Dias², Elisa S.L. Santos³, Carlos B.M. Cerqueira-Silva^{1,3,*}

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, Bahia, 45700-000.

²Curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, Bahia, 45700-000.

³Departamento de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, Bahia, 45700-000. * Autor de Correspondência (csilva@uesb.edu.br)

Resumo: Com o intuito de gerar subsídios para realização de estudos genéticos em formiga cortadeira (especificamente *Atta sexdens*), caracterizou-se o padrão de amplificação de DNA gerado por iniciadores ISSR. Para tanto, operárias médias de *A. sexdens* tiveram DNA genômico extraído utilizando a cabeça, mesossoma e pernas. Os padrões de amplificação foram analisados em géis de agarose 2%. Dentre os 23 iniciadores ISSR testados 17 geraram produtos de amplificação (sendo 12 destes iniciadores classificados como “tipo ideal” e cinco como “tipo razoável”). O percentual de polimorfismo variou entre 0% (iniciadores TRICAC3’YC, TRITGT3’YC, TRIACA3’RC, TRITGG3’RC, TRICGA3’RC, TRIGCA3’RC) e 100% (iniciador DiCA 3’YG). Os resultados atestam que os iniciadores ISSR selecionados apresentam um grau de polimorfismo adequado e, portanto, são adequados para estudos de diversidade genética em formigas cortadeiras, especialmente para *A. sexdens*.

Palavras-chave: formigas cortadeiras, ISSR, marcadores moleculares, “saúva”

Abstract: In order to generate subsidies for the genetic studies on cutter ant (specifically *Atta sexdens*), the pattern of DNA amplification generated by ISSR primers was characterized. For this, average workers of *A. sexdens* had genomic DNA extracted using the head, mesosome and legs. Amplification patterns were analyzed on 2% agarose gels. Among the 23 ISSR primers tested 17 generated amplification products (12 of these primers being classified as "ideal type" and five as "reasonable type"). The percentage of polymorphism ranged from 0% (TRICAC3’YC, TRITGT3’YC, TRIACA3’RC, TRITGG3’RC, TRICGA3’RC, TRIGCA3’RC) to 100% (DiCA3’YG). Therefore, they are suitable for studies of genetic diversity in leaf-cutting ants, especially for *A. sexdens*.

Keywords: leaf-cutting ant, ISSR, molecular markers, “saúva”

1. Introdução

As regiões ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) constituem-se sequências de 100 a 3.000 pares de bases contidas no genoma, localizadas entre sequências microssatélites que podem ser acessadas a partir de marcadores ISSR (Zietkiewicz et al., 1994). Os ISSR

possuem herança de padrão dominante (não diferindo os *loci* em homozigose dos em heterozigose) (Faleiro, 2007) e baseiam-se na técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) com a aplicação sendo realizada a partir de iniciadores que têm de 16 a 25 pares de bases (Zietkiewicz et al., 1994).

Os marcadores ISSR são amplamente utilizados em estudos genéticos, visto que são potencialmente aplicáveis para qualquer espécie, não exigindo sequenciamento prévio (Faleiro, 2007), além do que oferecem vantagens por gerar número significativo de sequências polimórficas (Nagaoka & Ogihara, 1997). Portanto, são destinadas à estudos genéticos de *fingerprinting*, diversidade genética e análise filogenética (Faleiro, 2007). Considerando as vespas, abelhas e formigas (classe Insecta, ordem Hymenoptera) é possível verificar um número bem superior de estudos com estes marcadores em espécies pertencente ao grupo das abelhas (Ceksteryte et al., 2012, Shouhani et al., 2014, Rahimi et al., 2016) e vespas (De Leon et al., 2010, Ardeh, 2013) quando comparado ao grupo das formigas, em especial as formigas cortadeiras (Reis et al., 2014).

As formigas cortadeiras, *Atta* e *Acromyrmex*, são organismos eussociais cujas características biológicas lhe permitem nidificar tanto em ambientes naturais, como em ambientes modificados pela ação antrópica (Hölldobler & Wilson, 1990, Vasconcelos et al., 2006). *Atta sexdens* (Myrmicinae: Attini) ou “saúva”, como é popularmente conhecida, realiza intensa atividade forrageadora em busca de partes vegetais para o cultivo do fungo simbiote (Hölldobler & Wilson, 1990). Devido ao hábito de cortar folhas *A. sexdens* é considerada uma praga importante na agricultura e silvicultura brasileira (Della Lucia, 1993).

Estudos ecológicos e genéticos contribuem para a compreensão das populações de formigas cortadeiras em diversos ambientes (Cantagalli et al., 2013, Reis et al., 2014). Entretanto, para *A. sexdens* há carência de estudos genético-moleculares. Uma importante etapa na realização de estudos genético-moleculares é a caracterização e a seleção de marcadores adequados (com boa visualização dos produtos de amplificação, reprodutibilidade e presença de polimorfismo). Neste contexto, objetivou-se caracterizar o padrão de amplificação de 23 marcadores ISSR e selecionar um conjunto de marcadores que potencialize o sucesso de estudos genético-populacionais de *A. sexdens*.

2. Materiais e métodos

O material biológico utilizado para as extrações de DNA e posteriores testes de amplificação é oriundo de expedição de coleta realizada em quatro ninhos localizados no fragmento de Floresta Estacional Semidecidual ou “mata de cipó” (15°15'S e 040°17'N), em Itapetinga, Bahia. Foram coletadas quatro amostras, sendo cada uma destas compostas por cinco indivíduos (operárias médias 1,5mm), totalizando 20 formigas. As amostras foram armazenadas em eppendorfs contendo álcool 70% para manter a integridade do material biológico até que se procedesse à etapa de extração.

A extração de DNA genômico de cada amostra (*mix* de cinco formigas) foi realizada pelo método descrito por Sunnucks e Halles (1996), sendo este definido como mais adequado para *A. sexdens* a partir de testes previamente realizados (Matos-Oliveira et al., 2015). As análises quali-quantitativas das extrações foram avaliadas em eletroforese em gel de agarose 1% (durante 90 minutos em uma corrente elétrica de 90 V) e visualizados com tampão *Gel Red* (adotando-se as especificações do fabricante) em sistema de fotodocumentação Kodak, com a incidência de luz ultravioleta. Após extração, as amostras foram armazenadas em ultrafreezer no Laboratório de Genética Molecular Aplicada da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *campus* de Itapetinga.

O padrão de amplificação de 23 iniciadores ISSR foi caracterizado de acordo com o proposto por Santos et al. (2011). As amplificações foram conduzidas em termociclador MJ 96 (Biocycler) em um volume total de 15 µL e 15 ng do DNA extraído, tampão de PCR 1X

(20 mM Tris-HCl [pH 8,4] e 50 mM de KCl), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 1 pM do marcador e 1U de polimerase de DNA Taq (*Invitrogen*, Carlsbad, Califórnia, EUA). O programa de amplificação adotado para as reações de PCR foi: 94°C durante 5 min, seguido por 34 ciclos (94°C por 50 s, 48°C por 60 s e 72°C por 60 s) e extensão final de 72°C por 5 min. Os produtos de amplificação foram separados em eletroforese em gel de agarose a 2% (m/v) em tampão de corrida TBE 1X e 120 volts por 2 horas. A coloração do gel e a aquisição de imagens foram realizadas como descrito para a quantificação de ácidos nucleicos.

Os iniciadores foram classificados a partir do padrão de amplificação em: (i) Ideal - amplificações em todas as amostras e com fácil visualização, (ii) Razoável - amplificação em partes das amostras e/ou com difícil visualização e (iii) Ausente - ausência de produtos de amplificação visível (**Figura 1**).

Análises descritivas considerando o total de marcas e o número de marcas monomórficas (presentes em todas as amostras) e polimórficas (ausente em ao menos uma das amostras) também foram realizadas.

3. Resultados e Discussão

Aproximadamente 75% dos 23 iniciadores testados possibilitaram a amplificação de fragmentos úteis para estimativas genéticas, sendo 12 destes classificados como ideais e cinco classificados como razoáveis (**Figure 1; Tabela 1**).

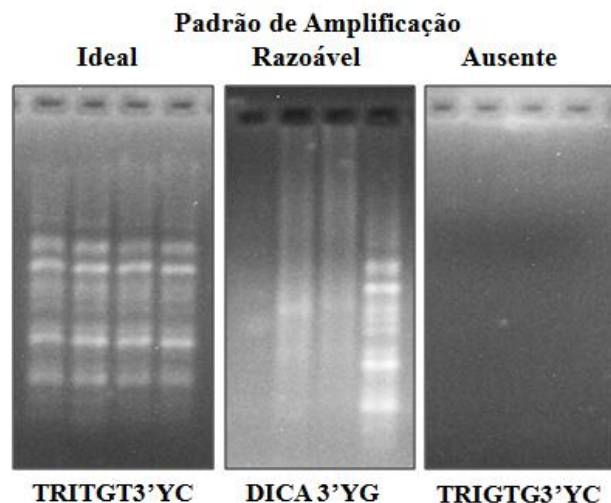


Figura 1 - Exemplo ilustrativo da classificação do padrão de amplificação observado a partir de três dos 23 iniciadores ISSR testados para espécie *Atta sexdens*. O padrão observado com o iniciador TRITGT3'YC também observado para outros 11 iniciadores, sendo por sua vez o padrão observado para DICA3'YG e TRITGT3'YC observado para outros 4 e 5 iniciadores, respectivamente.

Foram observadas um total de 88 marcas (aproximadamente cinco marcas por marcador), sendo observada uma ampla variação em relação ao número de marcas (entre duas e nove) e em relação ao percentual de polimorfismo (entre 0% e 100%) (**Tabela 1**). Destaca-se que a maioria dos padrões de amplificação gerados (independente da classificação) foram polimórficos, atestando para eficiência dos marcadores ISSR em identificar polimorfismo.

Considerando estudos de diversidade genética já realizados com insetos, onde o número de iniciadores utilizados variou entre cinco (Shouhani et al., 2014), nove (Nascimento et al., 2010) e 15 (Zhu et al., 2012), é esperado que os 17 iniciadores caracterizados com padrão de amplificação ideal ou razoável possibilitem a condução de robustas estimativas genéticas para *A. sexdens*.

Tabela 1. Descrição do padrão de amplificação observado a partir de 23 iniciadores ISSR em amostras de DNA genômico da formiga cortadeira *Atta sexdens*.

Iniciadores		Número de marcas			Polimorfismo (%)	Padrão de amplificação
Nome	Sequência	Total	Monomórficas	Polimórficas		
DIGA3'G	(CA) ₈ G	—	—	—	—	Ausente
DICA3'RG	(CA) ₈ RG	—	—	—	—	Ausente
DICA3'YG	(CA) ₈ YG	7	0	7	100%	Razoável
DIGA3'C	(GA) ₈ C	6	3	3	50%	Ideal
DIGA3'RC	(GA) ₈ RC	4	1	3	75%	Razoável
DIGA3'T	(GA) ₈ T	5	3	2	40%	Ideal
TRICAC3'RC	(CAC) ₅ RC	5	4	1	20%	Ideal
TRICAC3'YC	(CAC) ₅ YC	3	3	0	0%	Ideal
TRICAC5'CY	CY(CAC) ₅	5	1	4	80%	Ideal
TRICAG3'RC	(CAG) ₅ RC	—	—	—	—	Ausente
TRIGTG3'YC	(GTG) ₅ YC	—	—	—	—	Ausente
TRITGT3'YC	(TGT) ₅ YC	5	5	0	0%	Ideal
TRIAAC3'RC	(AAC) ₅ RC	9	1	8	89%	Ideal
TRIAAG3'RC	(AAG) ₅ RC	9	5	4	44%	Ideal
TRIACA3'RC	(ACA) ₅ RC	3	3	0	0%	Ideal
TRIAGA3'RC	(ACG) ₅ RC	5	4	1	20%	Razoável
TRITGG3'RC	(CGC) ₅ RC	4	4	0	0%	Ideal
TRICGA3'RC	(GCA) ₅ RC	3	3	0	0%	Ideal
TRICGC3'RC	(GGA) ₅ RC	5	2	3	60%	Razoável
TRIGAC3'RC	(GAC) ₅ RC	8	2	6	75%	Ideal
TRIGCA3'RC	(GCA) ₅ RC	2	2	0	0%	Razoável
TRIGCC3'RC	(CGC) ₅ RC	—	—	—	—	Ausente
TRIGGA3'RC	(GGA) ₅ RC	—	—	—	—	Ausente
TOTAL		88	46	42		
Média		5,18	2,88	3,82	59,4%	

Nota: Os iniciadores foram classificados como ideal (excelente visualização), razoável (não permitiram uma boa visualização), ausente (não apresentaram marcas definidas).

4. Conclusão

O sucesso observado neste estudo para as ampliações realizadas com os iniciadores ISSR atesta para a eficiência dos mesmos em subsidiar estimativas genéticas em *Atta sexdens*, devendo ser priorizados para futuros estudos os 12 iniciadores classificados como ideal, visto que apresentam características favoráveis. Os iniciadores selecionados deverão potencializar a obtenção de informações populacionais associadas à diversidade e estrutura genética em populações naturais de *A. sexdens* presentes em diferentes biomas e regiões.

5. Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) e ao programa de pós-graduação em Ciências Ambientais (PPGCA) da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) pela concessão da bolsa de estudo.

6. Referências

- Ardeh, M. J. (2013). The utility of ISSR-primers to make difference among populations of parasitoid, *Eretmocerus mundus* Mercet (Hymenoptera: Aphelinidae). *Journal of Crop Protection*, 2 (3): 263-269.
- Cantagalli, L. B., Mangolin, C. A. & Ruvolotakasusuki, M. C. C. (2013). Population genetics of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) *Acta biológica Colombiana*, 18 (1), 179 – 190. Disponível em: < <http://www.scielo.org.co/pdf/abc/v18n1/v18n1a13.pdf>>. Acesso em junho de 2015.
- Ceksteryte, V., Paplauskiene, V., Tamasauskiene, D., Pasakinskiene, I. & Mazeikiene, I. (2012). Genetic characterization of Lithuanian honeybee lines based on ISSR polymorphism. *Apidologie*, 43, 652.
- Della Lucia, T. M. C. (1993). (Ed.) *As formigas cortadeiras*. Ed. Folha da Mata, Viçosa.
- Faleiro, F. (2007). *Marcadores moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos*. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, 102 p.
- Hölldobler, B. & Wilson, E. O. (1990). *The Ants*. Belknap Press of Harvard University, Cambridge, MA.
- De León, J. H., Neumann, G., Follett, P. A., Hollingsworth, R. G. (2010). Molecular markers discriminate closely related species *Encarsia diaspidicola* and *Encarsia berlesei* (Hymenoptera: Aphelinidae): biocontrol candidate agents for white peach scale in Hawaii. *Journal of Economic Entomology*, 103 (3):908-16.
- Matos-Oliveira C. F., Rocha, S. O., Dias, C., Santos, E. S. L. & Cerqueira-Silva, C.B.M. (2015). Comparison of methods of genomic DNA extraction from leaf-cutter ant *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae). Resumo expandido. Semana de Biologia, Ciências: Rompendo fronteiras englobando conhecimento, 24 à 26 de junho fevereiro, 2016. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Jequié.
- Nagaoka, T. & Ogihara, Y. (1997). Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 94, 597-602.

- Nascimento, M. A., Batalha-Filho, H., Waldschmidt, A. M, Tavares, M. G., Campos, L. A. O. & Salomão, T. M. F. (2010). Variation and genetic structure of *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae) populations based on ISSR pattern. *Genetics and Molecular Biology*, 33 (2), 394-397. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/gmb/v33n2/2009-185.pdf>. Acesso em março de 2016.
- Rahimi, A., Mirmoayedi, A., Kahrizi, D., Zarei, L. & Jamali, S. (2016). Genetic diversity of Iranian honey bee (*Apis mellifera* meda Skorikow, 1829) populations based on ISSR markers. *Journal Cellular and molecular biology (Noisy-le-grand)*, 30-62 (4),53-8.
- Reis, E. P., Salomão, T. M. F., Campos, L. A. O. & Tavares, M. G. (2014). Genetic diversity and structure of *Atta robusta* (Hymenoptera, Formicidae, Attini), an endangered species endemic to the restinga ecoregion. *Genetics and Molecular Biology*, 37(3), 581-586. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/gmb/v37n3/a15v37n3.pdf>>. Acesso em Março de 2015.
- Santos, L. F., Oliveira, E. J., Silva, A. S., Carvalho, F. M., Costa, J. L. & Padua, J. G. (2011). ISSR markers as a tool for the assessment of genetic diversity in Passiflora. *Biochemical Genetics*, 49, 540-554.
- Shouhani, H., Dousti, A., Radjabi, R. & Zarei M. (2014). Application of ISSR to study the genetic diversity of honeybee (*Apis mellifera* L.) populations in some areas of Iran. *Journal of BioScience and Biotechnology*, 3(2), 127-131. Disponível em: [http://www.jbb.uni-plovdiv.bg/documents/27807/352486/jbb_2014-3\(2\)-pages_127-131.pdf](http://www.jbb.uni-plovdiv.bg/documents/27807/352486/jbb_2014-3(2)-pages_127-131.pdf). Acesso em Junho de 2016.
- Sunnucks, P. & Hales, D. F. (1996). Numerous Transposed Sequences of Mitochondrial Cytochrome Oxidase I-II in Aphids of the Genus Sitobion (Hemiptera: Aphididae). *Molecular Biology and Evolution*, 13, 510-524.
- Vasconcelos, H. L., Vieira-Neto, E., Mundim, F. & Bruna, E. (2006). Roads alter the colonization dynamics of a keystone herbivore in neotropical savannas. *Biotropica*, 38, 661–665.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A. & Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20, 176-183.
- Zhu, X., Yang, J., Wu, Q., Li, J., Wang, S., Guo, Z., et al. (2012). Genetic diversity of different geographical populations of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) from China based on ISSR analysis. *Acta Entomologica Sinica*, 55(8), 981-987. Disponível em: <http://www.insect.org.cn/EN/volumn/current.shtml>. Acesso em junho de 2016.

CAPÍTULO III

Artigo a ser submetido ao periódico *Genetics and Molecular Biology*

Estimativas de diversidade e estrutura genética em populações de formigas cortadeiras (*Atta sexdens*) presentes em dois fragmentos de caatinga e “mata de cipó” no interior da Bahia, Brasil

Autores: C.F. Matos-Oliveira¹, C. Dias², C. Bottcher³, P.S.D. Silva⁴, A.G.D. Bieber⁴, E.S.L. Santos⁴, C.B.M. Cerqueira-Silva⁴

Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, Bahia, [45700-000](#)

² Curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, Bahia, [45700-000](#)

³ Programa Nacional de Pós Doutorado da CAPES (PNPD/CAPES), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, Bahia, [45700-000](#)

⁴Departamento de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, Bahia, [45700-000](#)

Resumo

Atta sexdens (Hymenoptera: Formicidae) é uma espécie de formiga cortadeira conhecida por seu hábito de cortar folhas para o cultivo do fungo simbiote. Em ambientes antropizados, esta espécie tende a ocorrer em maior densidade de ninhos o que influencia consideravelmente a intensidade de sua atividade forrageadora tornando-as pragas agrícolas. A presença dessa espécie em ambientes antropizados tem ocasionado mudanças ecológica e econômica, fato que impulsiona o interesse por estudos ecológicos e genético-moleculares com vistas ao entendimento das populações de formigas cortadeiras. Com o intuito de contribuir para o avanço de estudos genéticos para a espécie *A.sexdens* este trabalho teve como objetivo estudar a diversidade genética das populações desta espécie com marcadores ISSR. A diversidade genética de *A.sexdens* foi acessada através de seis marcadores ISSR em 32 ninhos, aqui entendidos como populações, sendo cada uma delas representadas por um conjunto de 15 formigas. Neste estudo dentre as 32 populações estudadas, 17 pertencem à região 1, área de caatinga pertencente á Fazenda Lagoa das Covas (FLC), zona de amortecimento da Floresta Nacional Contendas do Sincorá (FNCS), Contendas do Sincorá, Bahia; e as outras 15 populações pertencem à região 2, fragmento de “mata de cipó” (Floresta Estacional Semidecidual), Itapetinga, Bahia. Os resultados mostraram que a genotipagem das populações gerou um total de 49 marcas, das quais 85% foram polimórficas. A análise molecular de variância apresentou elevados valores de estruturação para ambas as regiões (média de 0,47 e 0,74 para as regiões 1 e 2, respectivamente), bem como para a metapopulação (média de 0,81). Na Análise de variância molecular (AMOVA) foi obtido um

nível elevado de diversidade intrapopulacional para a caatinga (84%), “mata de cipó” (71%), metapopulação com uma região (73%) e duas regiões (69%). De acordo com a análise bayesiana, as regiões estudadas são individualmente compostas por três pools gênicos distintos ($K = 3$). Também é indicada a possibilidade, para uma suposta metapopulação que contemple as duas regiões, de subestruturação para dois ou quatro *pools gênicos*, corroborando com os dados obtidos com a AMOVA. Os resultados corroboraram de que as populações da “mata de cipó” encontram-se mais estruturadas que as da caatinga, fato que pode ser influenciado pelo fluxo gênico específico de cada região. Em relação à suposta existência da metapopulação sugere-se que embora haja semelhanças genéticas entre as regiões da caatinga e “mata de cipó” existem características genéticas exclusivas e, portanto, entende-se que as regiões passaram por diferentes eventos evolutivos, os quais permitem considerá-las como duas regiões efetivamente distintas.

Palavras chave: Genética de populações, ISSR, Saúva, Floresta Estacional Semidecidual, caatinga.

Introdução

As formigas cortadeiras, gênero *Atta* e *Acromyrmex*, são popularmente conhecidas como saúvas e quenquéns, respectivamente, e apresentam-se distribuídas na região Neotropical (Hölldobler e Wilson, 1990). Estes insetos mantêm uma relação mutualística com seus jardins de fungos, cujo hábito de forragear em busca de folhas, flores e frutos têm como objetivo cortar e/ou coletar esses materiais para servirem de substrato aos seus fungos cultiváveis. Esses, por sua vez, encontram-se dentro dos ninhos protegidos contra patógenos e viáveis a qualquer momento para serem dispersos pela rainha durante a fundação de um novo ninho (Weber 1972, 1982; Hölldobler e Wilson, 2010). Em troca, parte das hifas dos fungos cultivados serve de alimento para todas as larvas e alimentam também formigas adultas (Hölldobler e Wilson, 1990; 2010).

Quando presente em ambientes antropizados, as formigas cortadeiras encontram facilmente sítios para nidificação e recursos para o seu forrageamento, aumentando a densidade de seus ninhos (Terborgh *et al.*, 2001; Wirth *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2009) fato que as tornam conhecidas como pragas ou herbívoros dominantes nos Neotrópicos (Hölldobler e Wilson, 1990; Leal *et al.*, 2014). O gênero *Atta* contém 17 espécies (Bolton, 2016) e dentre as 12 espécies que ocorrem no Brasil somente cinco delas *A. bisphaerica*,

A.laevigata, *A.capiguara*, *A.sexdens rubropilosa* e *A.sexdens sexdens* destacam-se sob o ponto de vista econômico por influenciar negativamente os agrossistemas (Della Lucia, 1993).

A formiga cortadeira *Atta sexdens* tem sido observada frequentemente no sudoeste da Bahia, no fragmento de caatinga pertencente à Fazenda Lagoa das Covas (FLC), zona de amortecimento da Floresta Nacional de Contendas do Sincorá (FNCS) em Contendas do Sincorá, o que motivou a realização de estudos ecológicos relacionados à dieta (Oliveira, 2012), forrageamento (Carmo, 2012), à distribuição de ninhos e comportamento da espécie nessa área degradada (Cruz, 2015). Além disso, a espécie também foi vista no fragmento de “mata de cipó” (Floresta Estacional Semidecidual) localizada em Itapetinga, Bahia. No entanto, até o momento não há conhecimento de estudos genéticos populacionais embasados em dados moleculares realizado para *A. sexdens* nessa área.

Os estudos ecológicos podem tornar-se mais completos quando aliado a estudos genéticos moleculares. Assim, as populações naturais são analisadas sob o ponto de vista genético, isto é, estudam-se como as informações genéticas (*pool* gênico) estão arranjas numa população natural, pois este fato influencia diretamente na transmissão dessas características para seus descendentes ao longo de gerações (Salman, 2007). Sabe-se que qualquer alteração da diversidade genética das formigas cortadeiras poderá refletir em consequências ecológicas sobre a população, sobre a comunidade e também em diferentes níveis ecossistêmicos (Hugues *et al.*, 2008).

O estudo a nível molecular das populações naturais tornou-se possível com a evolução de técnicas moleculares e o desenvolvimento de marcadores moleculares (Lacerda *et al.*, 2002; Guimarães *et al.*, 2009). Dentre os inúmeros marcadores moleculares existentes, os marcadores dominantes são vantajosos por apresentarem caráter aleatório, podendo ser utilizados para estudar qualquer espécie, sem necessidade de conhecimento prévio da sequência de DNA genômico da espécie de estudo (Simpson, 1997; Scaldaferrri, 2013).

Considerando a importância ecológica e econômica de *Atta sexdens*, bem como a escassez de informações genético-moleculares (a exceção dos estudos de Carvalho e Vieira 2001; Cantagalli *et al.*, 2013) e o potencial destes estudos em complementar estudo ecológicos já realizados, o objetivo deste trabalho foi estimar a diversidade e a estrutura genética de populações de *A. sexdens* que residem em duas regiões da Bahia: fragmento de caatinga localizado na Fazenda Lagoa das Covas (FLC), zona de amortecimento da Floresta Nacional Contendas do Sincorá (FNCS), localizada em Contendas do Sincorá e o fragmento de “mata de cipó” (Floresta Estacional Semidecidual) localizado na cidade de Itapetinga.

Ambas as regiões de estudo encontram-se modificadas por ação antrópica e com presença de gado dentro dos fragmentos.

Material e método

Área de estudo

O material biológico foi coletado em duas regiões de estudo, sendo ambos os fragmentos de mata localizados no estado da Bahia. A primeira região corresponde à área de caatinga na qual está inserida a Fazenda Lagoa das Covas (FLC) (13°54'S, 41°07'O), localizada na zona de amortecimento da Floresta Nacional Contendas do Sincorá (FNCS), Contendas do Sincorá (**Figura 1**). A segunda região corresponde ao fragmento de “mata de cipó” ou Floresta Estacional Semidecidual (15°15"S e 040°17'N), localizado em Itapetinga (**Figura 2**).

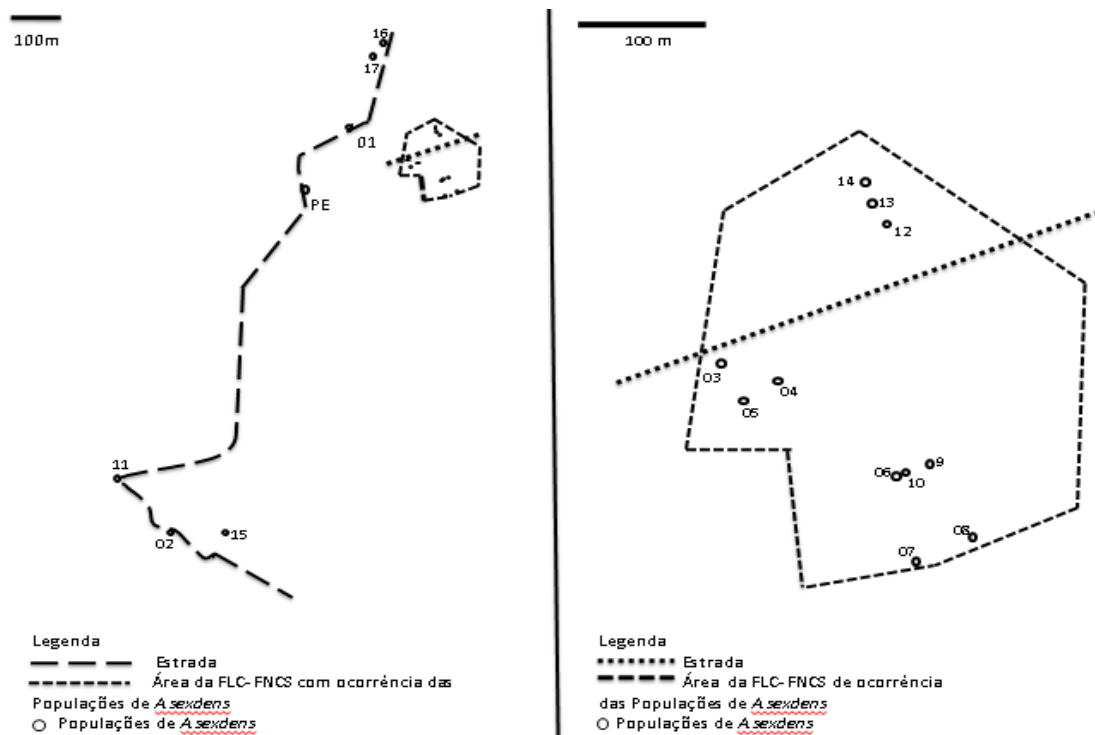


Figura 1- Área de ocorrência dos ninhos de *Atta sexdens* na zona de amortecimento da Floresta Nacional Contendas do Sincorá (FNCS), localizado em Contendas do Sincorá, Bahia. As populações estão dispostas na estrada que liga Contendas do Sincorá-Tanhaçu e também numa área na caatinga pertencente à Fazenda Lagoa das Covas (FLC).

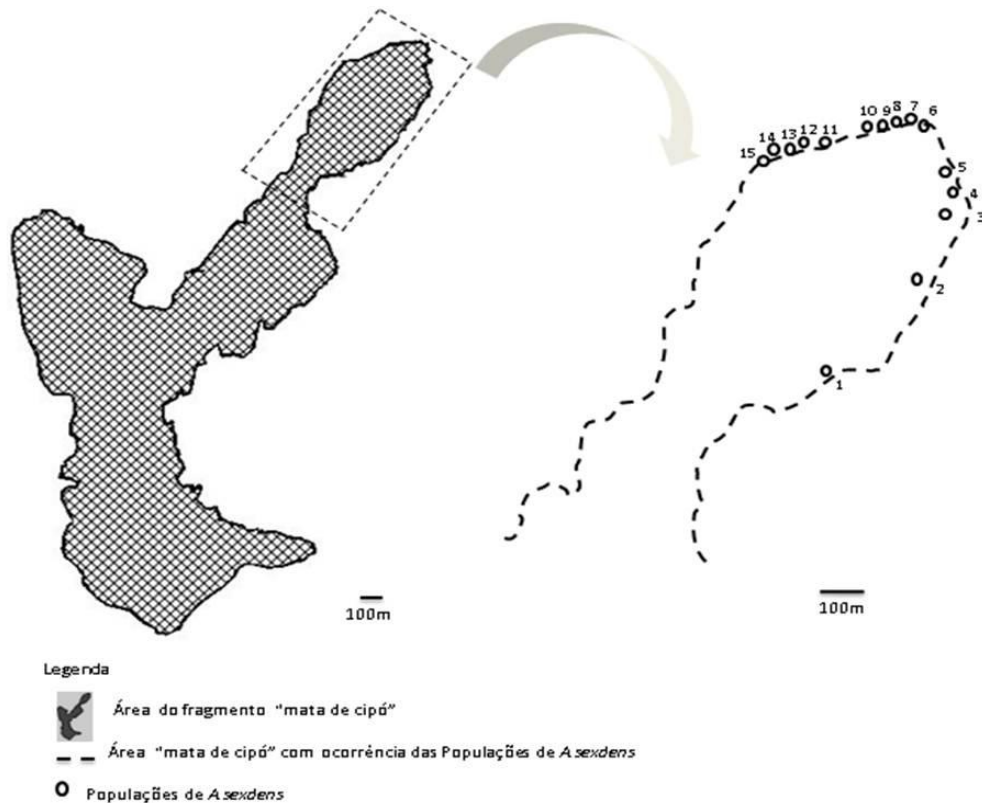


Figura 2- Fragmento de "mata de cipó" ou Floresta Estacional Semidecidual localizado em Itapetinga, Bahia, com destaque para área de ocorrência das populações de *Atta sexdens*.

A Floresta Nacional Contendas do Sincorá (FNCS) possui aproximadamente 11 mil hectares de Caatinga, a qual está situada em uma microrregião da Chapada Diamantina, no município de Contendas do Sincorá, Bahia (Brasil, 2006). A vegetação da região é decidual e xerófila, constituída de vários tipos fitofisionômicos: Caatinga arbórea arbustiva, Caatinga arbustiva fechada e complexo herbáceo - arbustivo. No entanto, a matriz predominante é arbustiva (maior que 2 metros), e a vegetação arbórea (chegam até 8 metros) é restrita apenas às regiões de mata ciliar (Souza, 2003; Brasil, 2006).

Na área preservada de Caatinga não há presença de ninhos de formigas cortadeiras, porém, a ocorrência dessas formigas foi observada na zona de amortecimento da FNCS, localizada nos arredores da FNCS, que compreende uma área com cerca de 65 mil ha. Apesar desta área já ter apresentado a mesma fitofisionomia encontrada na FNCS, boa parte dela atualmente encontra-se modificada por ação antrópica, onde é comum observar pastagens para a criação do gado, bem como, a ocupação humana do povoado de Palmeiras (Brasil, 2006). Sabe-se que as formigas cortadeiras são comuns em ambientes modificados por ação humana e especialmente na Fazenda Lagoa das Covas (FLC), zona de amortecimento da FNCS, foi registrada a presença da formiga *Atta sexdens*, desde então a espécie tem sido alvo

de estudos sobre a dieta (Oliveira, 2012), o forrageamento (Carmo, 2012) e a densidade de ninhos (Cruz, 2015).

Por sua vez, a segunda região considerada neste estudo, a Floresta Estacional Semidecidual, conhecida popularmente como “mata de cipó”, apresenta fisionomia estratificada, com porte arbóreo entre 18 e 30 m de altura, ocorrendo em ambientes com maior disponibilidade hídrica (Veloso, Rangel & Lima, 1991; Barbosa & Thomas, 2002).

O referido fragmento de “mata de cipó” (15°15'S e 040°17'O) adotado neste estudo apresenta cerca de 323,5 ha, com dossel semiaberto e vegetação arbórea típica de mata úmida (chegando a atingir uma altura de até 30m), além disso, apresenta também arbustos, uma vegetação xerófita espinhosa e cipós que emaranham-se em meio a vegetação Estacional Semidecidual (L. Krause, informação pessoal). O solo na maior parte do fragmento está coberto por uma camada fina de serapilheira, apresenta a formação de enormes montes de terra seca e compactada (com cerca de 2 m de altura) abandonados por cupins, e por vezes, habitados por formigas cortadeiras (C.F., Matos-Oliveira, observação pessoal). A distribuição ds ninhos de *Atta sexdens* nesta área encontram-se apenas à margem do fragmento conforme pode ser observado na figura 2, e vale ressaltar, que conforme aumenta a densidade vegetacional na região 1, nota-se a ausência de populações de *Atta sexdens*.

Coleta de Material Biológico

Nas regiões 1 e 2 foram coletados um total de 255 e 225 formigas (operárias médias) respectivamente, buscando-se uma amostragem de 15 formigas em cada um dos 32 ninhos. Aqui neste estudo cada ninho passou a ser considerado como uma população, assim, foram encontrados e amostrados um total de 17 populações para a região 1 e 15 populações para a região 2. As populações foram amostradas mantendo uma distância mínima de 10 m entre elas, para evitar que uma população fosse amostrada duas vezes.

Após a coleta realizada com o uso de pinça entomológica, as formigas foram acomodadas em tubos devidamente etiquetados e preenchidos com álcool 70%. Posteriormente os exemplares coletados foram armazenados em Ultra freezer no Laboratório de Genética Molecular Aplicada da UESB, Campus de Itapetinga.

Descrição da etapa de extração de DNA genômico de *Atta sexdens*

A extração do DNA foi realizada utilizando como fonte de tecido os corpos das formigas (sem gáster) por meio do protocolo 1, Sunnucks & Hales (1996) (conforme definido no Capítulo I). A retirada do gáster foi importante, especialmente, devido ao uso de marcadores moleculares de ordem arbitrária para estimativa de diversidade, evitando assim, o acesso a marcas moleculares oriundas de fragmentos de DNA indesejáveis (presentes nos restos alimentares possivelmente presentes no trato digestivo das formigas). Todo o DNA genômico obtido através da extração foi utilizado para montar um Banco de DNA genômico de *A. sexdens* para as duas localidades, no Laboratório de Genética Molecular Aplicada.

Com o referido protocolo de extração, Sunnucks & Hales (1996), as amostras foram incubadas durante 3 h a 55°C em solução tampão contendo Solução de Dodecilsulfato de Sódio (SDS) e invertido a cada 20 min. No final do período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 12000xg, durante 10 min, a 15°C; o sobrenadante foi removido e 700 µl de isopropanol frio foram adicionados. As amostras foram cuidadosamente homogeneizadas e novamente centrifugadas a 12000 xg durante 10 min a 15°C. O sobrenadante foi removido e 800 µl de etanol 70% frio foram adicionados. As amostras foram centrifugadas a 12.000 xg durante 5 min a 15°C; o sobrenadante foi removido e 800 µl de etanol 95% frio foram adicionados; elas foram em seguida centrifugadas a 12.000 xg, durante 5 min, a 15°C; o sobrenadante foi descartado. Quando completamente secas, o sedimento (pellet) foi ressuspensão em 60 µl de água ultrapura.

A avaliação da qualidade das amostras de DNA em gel de agarose a 1% (m/v) por eletroforese (90 min em uma corrente eléctrica de 90 V) e visualizados com Gel Red (adotando-se as especificações do fabricante) num sistema de documentação fotográfica Kodak, com a incidência de luz UV. Para quantificação da concentração de DNA (ng/ml-1) adotou-se um marcador de peso padrão (DNA Lambda não digerido) nas concentrações de 50, 100 e 200ng.

Genotipagem

Foram utilizados seis marcadores ISSR previamente selecionados por apresentar ótimo padrão de amplificação (Matos-Oliveira et al., 2017 – artigo referente ao capítulo 2 e submetido para publicação). Na genotipagem das 32 populações de *A. sexdens* As reações de amplificação e as corridas eletroforéticas foram realizadas conforme descrito por Santos et al. (2011).

O padrão de marcas presente nos géis foi transformado em tabela de dados binários (adotando-se um para presença de marca, zero para ausência de marca e nove para dados faltantes). Avaliação descritiva foi realizada tendo-se como objetivo calcular o número de marcas por marcadores, o número total de marcas e o percentual de polimorfismo em cada região isoladamente e em conjunto (considerando-as como uma metapopulação).

Análises Estatísticas

O programa GenALEX v.6.5 (Peakall e Smouse, 2012) foi utilizado para realizar Análise Molecular de Variância (AMOVA), objetivando-se estimar a diversidade genética dentro e entre populações, bem como entre as regiões consideradas neste estudo. Nestas análises foi adotado um total de 999 permutações. Análise de coordenadas principais (PCoA) foi realizada, considerando tanto as regiões separadamente, como conjuntamente.

Estimativas de diversidade foram também realizadas por meio do programa Genes (Cruz, 2006), adotando-se como estratégia de cálculo o complemento do coeficiente de similaridade de *Jaccard* e o Método de Agrupamento Não Ponderado baseado na Média das Distâncias (UPGMA) (Cruz, 2006).

Análise Bayesiana, visando estimativas de estruturação genética e definição de prováveis *pools* gênicos, foi realizada com o uso do programa STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000) e com o auxílio da ferramenta *on line* STRUCTURE Harvester (Earl e vonHoldt, 2012). Entre os principais parâmetros adotados nas análises Bayesianas, destacam-se: uso do modelo admixture (que admite fluxo genético entre as amostras e populações), realização de 10 corridas para cada um dos possíveis *pools* gênicos testados (adotando-se um intervalo de k_1 a k_6) e adoção de 20,000 corridas para os períodos de pré-análise (burning) e 200,000 corridas para o desenvolvimento da MCMC (cadeia de Markov), respectivamente.

Resultados

A genotipagem das populações realizada com seis dos marcadores, classificados como tipo ideal (Matos-Oliveira *et al.* 2017, artigo submetido), gerou um total de 49 marcas (**Tabela 1**). O menor e o maior número de marcas foram observados com os marcador TriCAC5'CY (seis marcas) e TriCAC 3'YC (10 marcas), respectivamente. O percentual de polimorfismo variou ente 43% a 100%, sendo representado pelos marcadores DiGA 3'C, TriCAC 5'CY, TriTGT 3'YC, respectivamente (**Tabela 1**).

Considerando a genotipagem das populações de cada região separadamente, a média do número de marcas geradas foi de 7,2 (para caatinga) e 6,2 (para “mata de cipó”). Por sua vez, o percentual de polimorfismo observado foi de 82,6% (para caatinga) e 76% (para “mata de cipó”).

Tabela 1- Genotipagem realizada a partir de seis marcadores ISSR aplicados em estudos de diversidade genética para populações da espécie *Atta sexdens* localizadas na área de caatinga (Fazenda Lagoa das Covas, zona de amortecimento da FNCS) e “mata de cipó” (Floresta Estacional Semidecidual).

Marcadores	Número de Marcas	Número de Monomórficas	Número de Polimórficas	Polimorfismo(%)
DiGA 3'C	7	4	3	43%
DiGA 3'T	9	1	8	89%
TriCAC 3'RC	9	1	8	89%
TriCAC 3'YC	10	1	9	90%
TriCAC 5'CY	6	0	6	100%
TriTGT 3'YC	8	0	8	100%
\bar{X}	8,17	1,17	7	85%
Região	Número de Marcas	Número de Monomórficos	Número de Polimórficos	Polimorfismo (%)
caatinga \bar{X}	7,2	1,3	5,8	82,6%
'mata cipó' \bar{X}	6,2	1,3	4,6	76%

A Análise Molecular de Variância apresentou elevados valores de estruturação ($Phit > 0,25$) para ambas as regiões, média de 0,47 e 0,74 para as regiões 1 e 2, respectivamente, bem como para a metapopulação, média de 0,81 (**Tabela 2**).

Tabela 2. Principais valores de estruturação (Phit) observados a partir da Análise Molecular de Variância (AMOVA) para os pares de Populações (P) da formiga cortadeira *Atta sexdens* localizadas na região 1 (caatinga), na região 2 (“mata de cipó”) e metapopulação. Os valores de (Phit) maiores que 0,25 indicam estruturação nas populações.

Estrutura genética região 1 (caatinga)			
Pares com maior estruturação	Valores	Pares com menor estruturação*	Valores
P04-P09	0,505	P01-P02	0
P06-P09	0,450	P01-P03	0
P07-P09	0,462	P02-P03	0
P06-P16	0,476	P05-P08	0
P04-P06	0,478	P10-P11	0
Estrutura genética região 2 (“mata cipó”)			
Pares com maior estruturação	Valores	Pares com menor estruturação*	Valores
P3-P10	0,906	P01-P02	0
P3-P14	0,823	P01-P06	0
P4-P10	0,78	P06-P07	0
P5-P10	0,73	P06-P08	0
P4-P06	0,478	P07-P08	0
Estrutura genética região 1 e 2 (Metapopulação)			
Pares com maior estruturação	Valores	Pares com menor estruturação*	Valores
P20-P27	0,906	P01-P02	0
P04-P27	0,848	P01-P03	0
P20-P31	0,823	P02-P03	0
P06-P27	0,776	P05-P08	0
P07-P27	0,744	P10-P11	0

*O número dos pares menores com valor igual a zero foi maior que cinco amostras e diferiu entre caatinga (25 pares), “mata de cipó” (20 pares) e a metapopulação (55 pares).

Os resultados obtidos através da AMOVA demonstraram ser menor a estruturação genética existente entre as populações da região 1 (16%) do que entre as populações da região 2 (29%) (**Figura 3**). Ao se considerar as duas regiões como apenas uma única metapopulação, o valor de estruturação estimado foi semelhante a 27% entre as populações. Para a análise da metapopulação utilizando-se duas regiões separadas, estimou-se um valor de 18% mostrando que a estrutura genética entre as populações é influenciada pelos indivíduos de cada população e apenas 13% da estrutura indica um percentual considerável de diversidade restrita a cada uma destas regiões.

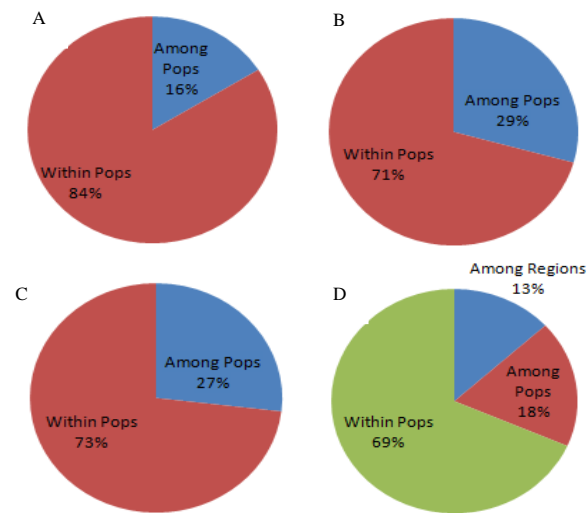


Figura 3- Estrutura genética dentro (*Within*) e entre (*Among*) as populações de *Atta sexdens* obtidos a partir da Análise Molecular de Variância (AMOVA) para as regiões: (A) região 1, área de caatinga (Fazenda Lagoa das Covas, zona de amortecimento da Floresta Nacional Contendas do Sincorá) e (B) região 2, a “mata de cipó” (Floresta Estacional Semidecidual); (C) metapopulação um, considerando que as populações localizam-se em apenas uma região (caatinga e “mata de cipó”) (D) e a metapopulação dois, adotando-se que as populações encontram-se em duas regiões separadas (caatinga e “mata de cipó”).

Na análise de coordenadas principais (PCoA), com enfoque para diversidade entre as populações, pode-se observar que a maioria das populações da caatinga se distribuíram de maneira mais próxima, a exceção das populações Pop 09 e Pop13 (**Figura 4-A**). No entanto, a análise de diversidade genética dentro das populações mostrou dispersão entre as amostras que representam cada população da caatinga (**Figura 4-B**).

Para a “mata de cipó” a diversidade genética observada entre as populações apresentou uma maior dispersão, destacando a distribuição aleatória das populações 01, 02, 03, 04, 05 e 13 (**Figura 5-A**). Na análise de distancia genética dentro das populações, as amostras da “mata de cipó” mostraram formação de subgrupos com mistura entre amostras de diferentes populações, bem como, ocorreu o isolamento de algumas amostras (sem participar de nenhum grupo) destas populações (**Figura 5-B**).

Ao considerar que caatinga e “mata de cipó” formam uma metapopulação, a diversidade genética permitiu que houvesse a formação de subgrupos com populações de mesma região, bem como, a formação de subgrupos com mistura entre as populações de ambas as regiões. Apenas algumas populações se dispersaram dos subgrupos formados, a saber, população 09 e 13 (da caatinga) e população 32 (da “mata de cipó”) (**Figura 6**).

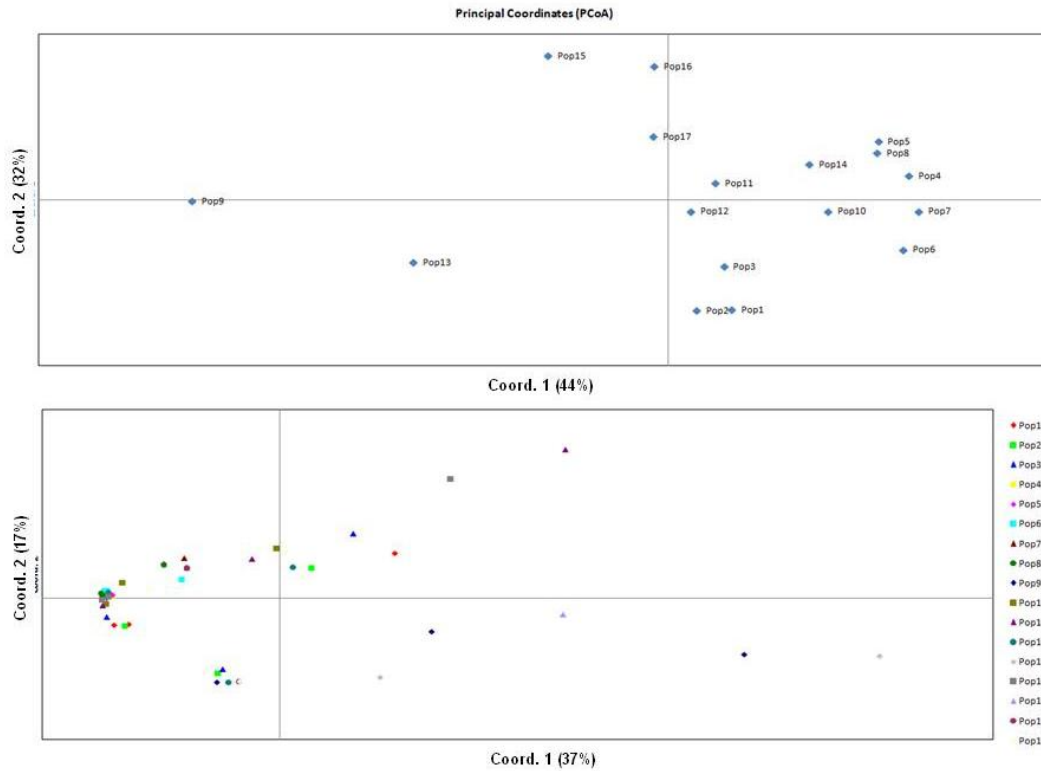


Figura 4- Dispersão das populações (ou seja, colônias) da formiga cortadeira *Atta sexdens* da região 1, área de caatinga (Fazenda Lagoa das Covas, zona de amortecimento da Floresta Nacional Contendas do Sincorá), baseada na análise de coordenadas principais (PCoA); (A) a diversidade genética entre as populações; (B) a diversidade genética dentro das populações representada por diferentes indivíduos.

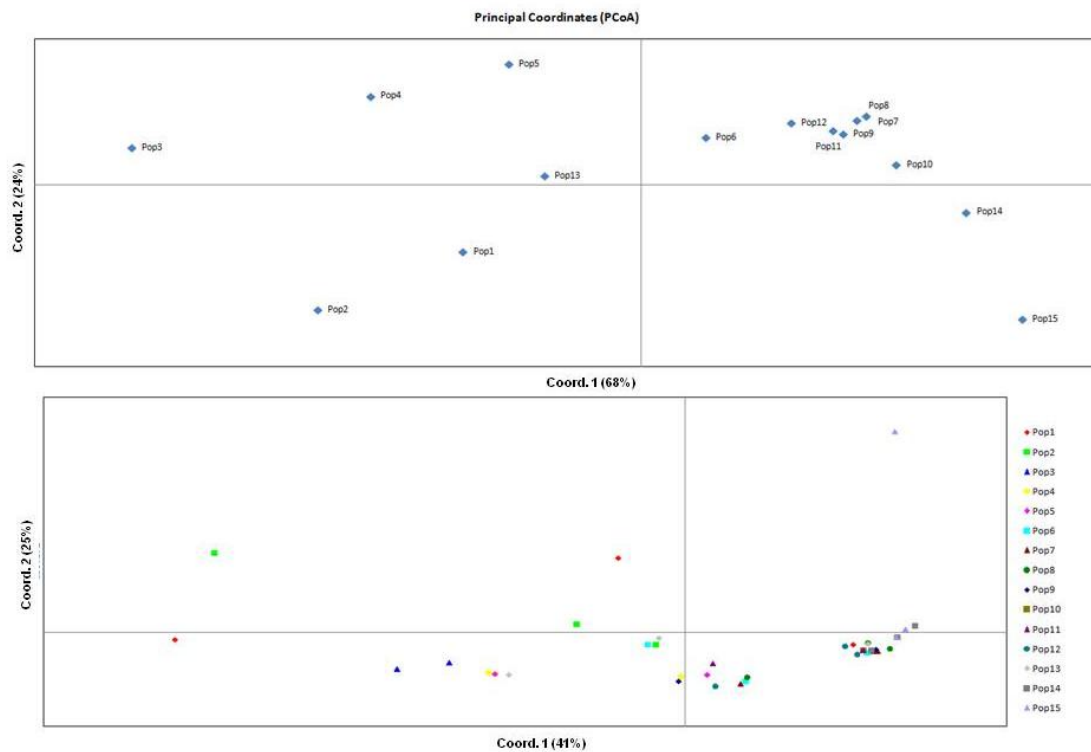


Figura 5- Dispersão das populações (ou seja, colônias) da formiga cortadeira *Atta sexdens* da região 2, a “mata de cipó” (Floresta Estacional Semidecidual), baseada na análise de coordenadas principais (PCoA); (A) a

diversidade genética entre as populações; **(B)** a diversidade genética dentro das populações representada representada por diferentes indivíduos.

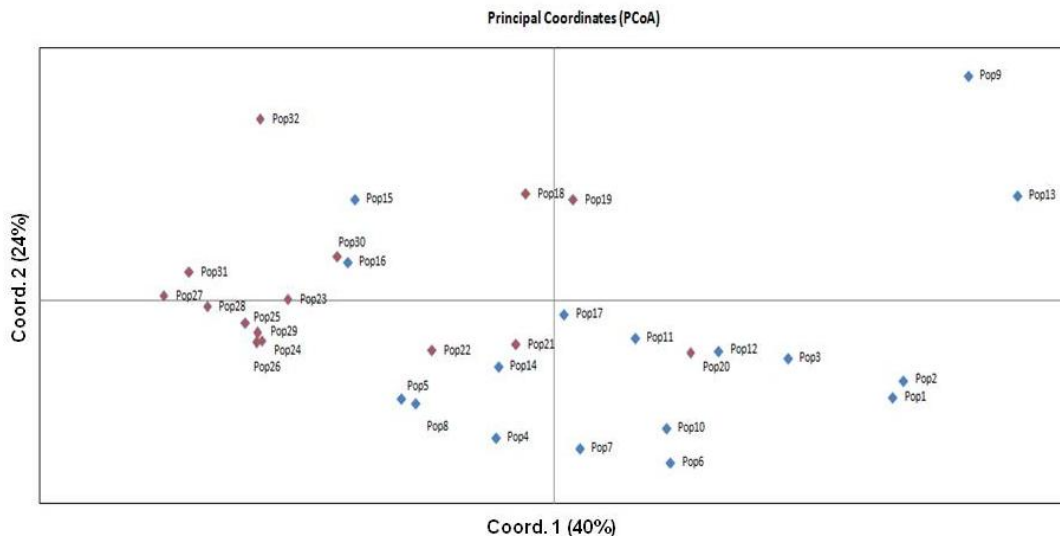


Figura 6- Dispersão das populações (ou seja, colônias) da formiga cortadeira *Atta sexdens* baseada na análise de coordenadas principais (PCoA). A dispersão teve por base a diversidade genética entre as populações que representam a metapopulação. As populações localizadas na região 1, área de caatinga (Fazenda Lagoa das Covas, zona de amortecimento da Floresta Nacional Contendas do Sincorá) estão representados pelos símbolos de cor azul (Código Pop1 – Pop17). As populações presentes na região 2, “mata de cipó” (Floresta Estacional Semidecidual) estão representados pelos símbolos de cor vermelha (Código Pop18 – Pop32).

A estimativa de delta K obtida indicou estruturação baseada em diferentes *pools* gênicos em todos os testes realizados para cada região. A probabilidade associada ao valor de delta obtido foi K=18 para a região 1- caatinga (**Figura 7A**), delta K=72 para região 2 - “mata de cipó” (**Figura 8A**) e delta K=15 para a metapopulação (**Figura 9A**). Com base nos prováveis *pools* gênicos estimados foi possível a construção de histogramas para as regiões 1, 2 e para metapopulação.

Para a região da caatinga observou-se valor de delta K=3, com tendência de subestruturação de delta K=2 (**Figura 7A**). Considerando esses valores e a construção do histograma correspondente na caatinga, para a subestruturação em K=2 houve tendência de populações homogêneas, com predominância do *pool* gênico representado em cor verde (abrangendo as populações de 04 a 12 e entre 14 à 17), seguido do *pool* gênico vermelho (abrangendo as populações 01, 02, 03 e parte da população 13) (**Figura 7B**). Para K=3 houve a predominância do *pool* gênico representado em cor verde (populações 04 à 12 e 14), azul (populações 15, 16, 17) e vermelho (populações 01, 02, 03 e 13) (**Figura 7C**).

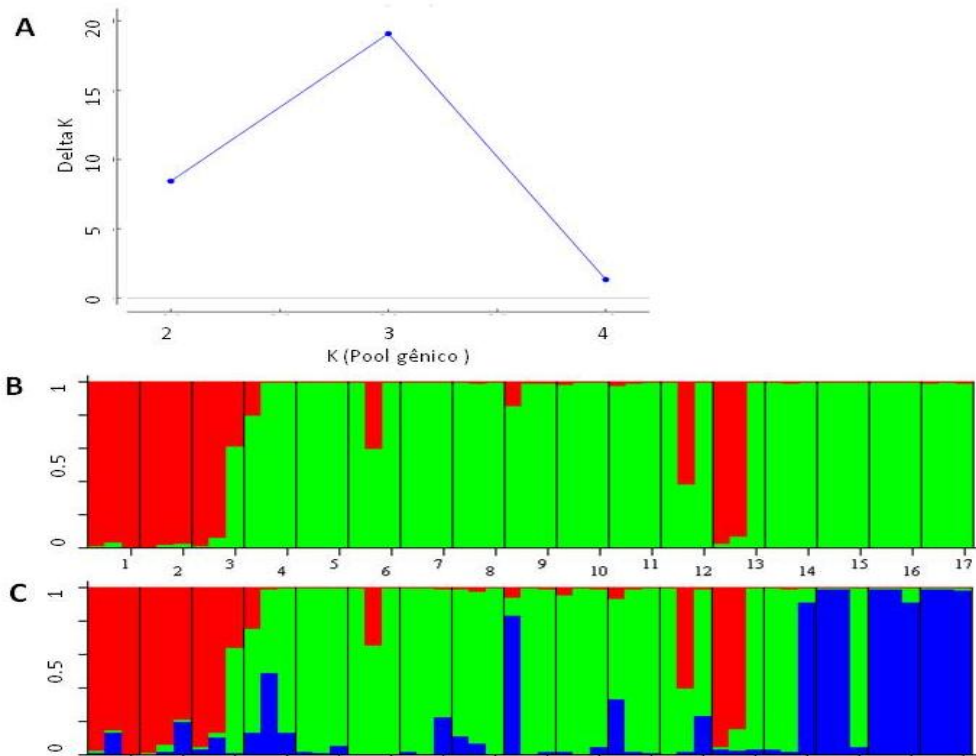


Figura 7- Prováveis *pools* gênicos obtidos de acordo com o método descrito por Evanno et al. (2006), a partir de marcadores ISSR para as populações da formiga cortadeira *Atta sexdens* localizadas na região 1, área de caatinga (Fazenda Lagoa das Covas, zona de amortecimento da Floresta Nacional Contendas do Sincorá). **(A)** Estimativa de delta $K=3$ e com subestruturação em $K=2$ para as populações; **(B)** a distribuição de dois *pools* gênicos estimado para caatinga; **(C)** a distribuição de três *pools* gênicos estimado para caatinga. Cada população está representada por três amostras contendo um *mix* de cinco indivíduos, totalizando 51 amostras para a região 1.

Por sua vez, a “mata de cipó” apresentou valor de delta $K=4$ (**Figura 8A**) e não apresentou tendência a subestruturação. O histograma obtido mostrou a origem genética predominantemente para o *pool* gênico vermelho (predominando nas populações 06, 07, 08, 09, 10, 11), verde (presente nas populações 03, 04 e 12), seguido do *pool* gênico azul (representado pelas populações 01, 02, 05, 13) e finalmente o *pool* gênico amarelo (majoritariamente na população 14 e 15) (**Figura 8B**).

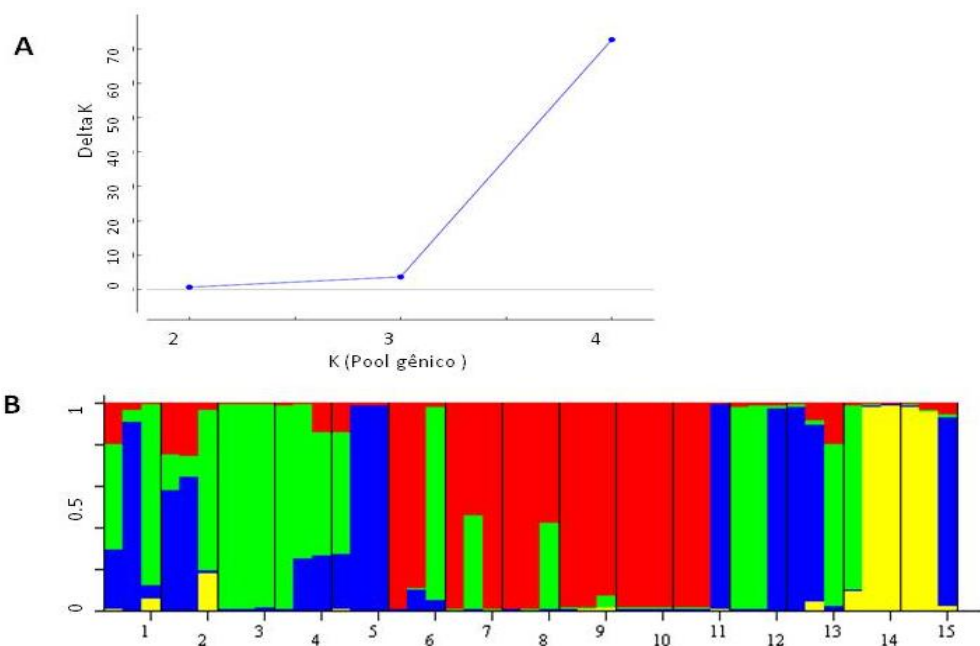


Figura 8- Prováveis números de *pools* gênicos obtidos de acordo com o método descrito por Evanno et al. (2006), a partir de marcadores ISSR para as populações da formiga cortadeira *Atta sexdens* localizadas na região 2, “mata de cipó” (Floresta Estacional Semidecidual). **(A)** Estimativa de delta K=4 para as populações; **(B)** a distribuição de quatro *pools* gênicos estimados para “mata de cipó”. Cada população está representada por três amostras contendo *mix* de cinco indivíduos, totalizando 45 amostras para região 2.

A metapopulação apresentou valor de delta K=2, tendo tendência à subestruturação em K=3 e K=4 *pools* gênicos (**Figura 9A**). Para o valor de K=2, embora tanto o pool gênico um (representado pela cor verde), quanto o *pool* gênico dois (representado pela cor vermelha) ocorram nas duas regiões avaliadas, é possível perceber a predominância do *pool* gênico verde na primeira região e do *pool* gênico vermelho na segunda região (**Figura 9B**). Considerando a existência de três *pools* gênicos (K=3), não é possível observar predominância de *pools* gênicos nas duas regiões, estando o terceiro *pool* gênico (representado pela cor azul), igualmente distribuído nas duas regiões (**Figura 9C**). Essa mesma tendência foi observada para a estimativa baseada em K=4 (dados não apresentados).

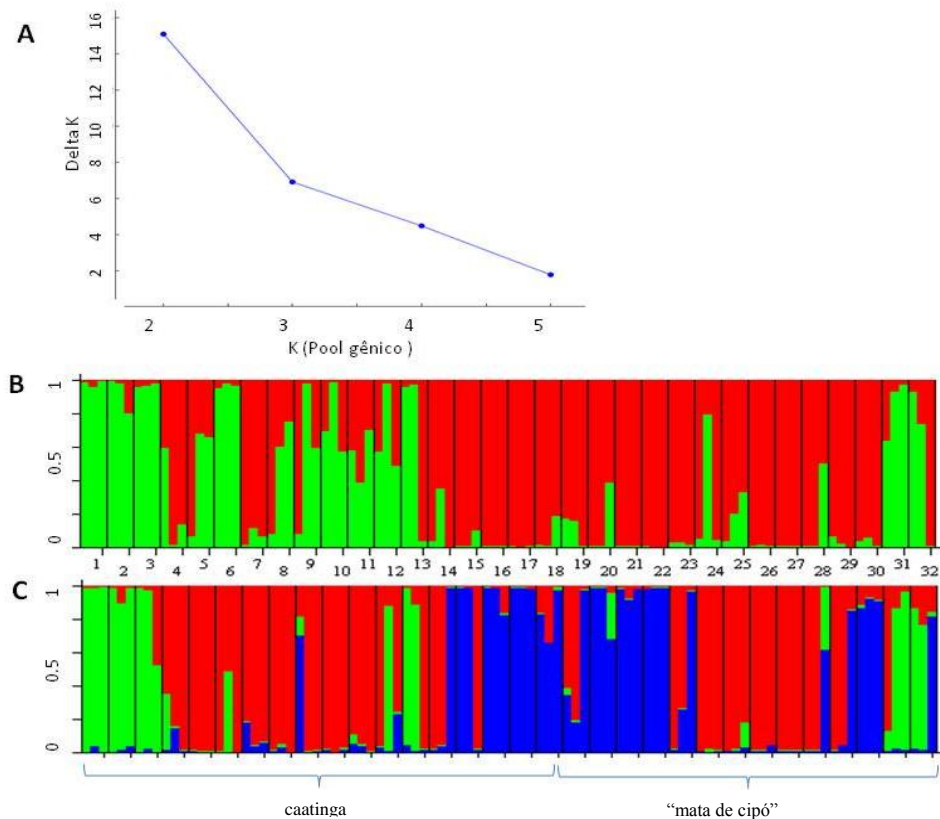


Figura 9- Padrão de distribuição dos prováveis *pools* gênicos para as populações da formiga cortadeira *Atta sexdens* obtido de acordo com o método descrito por Evanno et al. (2006). A estimativa foi realizada adotando-se 32 populações para a metapopulação, correspondendo à 17 populações da caatinga (Fazenda Lagoa das Covas, zona de amortecimento da Floresta Nacional Contendas do Sincorá) e 15 pertencente à “mata de cipó” (Floresta Estacional Semidecidual). Cada população está sendo representada por três amostras com cinco indivíduos (93 amostras). A metapopulação apresentou a existência de dois *pools* (A) e a possibilidade de subestruturação para três (A) e quatro *pools* gênicos (histograma não apresentado para esta última estimativa).

Apesar de haver populações compostas por apenas um *pool* gênico, foi possível observar nas regiões estudadas que algumas populações demonstraram uma mistura com relação à origem genética (populações formadas por mais de um *pool* gênico predominante), a exemplo das populações 03, 04, 12, 13 e 15 da caatinga (com $K=3$) e as populações 01, 02, 04, 05, 06, 11, 12 e 13 (com $K=4$) da “mata de cipó”. Em relação à metapopulação (com $K=2$) a mistura de *pools* gênicos foi observada para as populações 05, 08, 09, 10, 11 e 12 pertencente à caatinga, sendo que para a “mata de cipó” foi observada mistura para as populações 24, 28 e 32. Para o gráfico com $K=3$ as populações que apresentaram mistura foram 03, 06, 09, 12, 13 e 15 (caatinga) e 18, 23, 28, 31 e 32 (“mata de cipó”); Para $K=4$ destacam-se pela mistura das populações 04, 12, 13, 14 (caatinga) 19, 23, 29, 30, 31, 32 (“mata de cipó”).

Discussão

O presente estudo fez uso de seis marcadores ISSR para a análise genético-populacional de *Atta sexdens* em duas localidades do Sudoeste Baiano. O número de marcadores é similar ao utilizado por outros estudos de diversidade genética com insetos, que em geral fazem uso entre cinco e 15 marcadores ISSR (Luque *et al.*, 2002, Paplauskienė *et al.*, 2006, Souza *et al.*, 2008, Al-Otaibi 2008, Nascimento *et al.*, 2010, Zhu *et al.*, 2012, Shouhani *et al.*, 2014, Reis *et al.*, 2014).

Muito embora os marcadores ISSR ainda venham sendo pouco aplicados em estudos de diversidade genética com formigas cortadeiras, estes marcadores são utilizados em estudos de insetos, com destaque para a ordem Hymenoptera, que agrupa além das formigas, as vespas e abelhas, sendo que a gama de estudos de diversidade genética com ISSR contemplam especialmente o grupo das abelhas (Paplauskienė *et al.*, 2006, Nascimento *et al.*, 2010, Ceksteryte *et al.*, 2012, Shouhani *et al.*, 2014, Rahimi *et al.*, 2016).

A análise da diversidade das populações da formiga *Atta sexdens* revelaram que os dados obtidos através dos programas apoiam-se mutuamente entre si (os valores de Phit, AMOVA e a estrutura mostrada pelos gráficos de PCoA), mostrando que as populações da caatinga encontram-se menos estruturadas que as da “mata de cipó”. A estruturação pode ocorrer quando a diversidade genética não está distribuída uniformemente entre as populações de uma espécie, levando a formação de subgrupos que compartilham pools gênicos diferentes, contribuindo assim, para o grau de isolamento entre as subpopulações (Chakrabort, 1993).

De acordo com a análise bayesiana, as regiões estudadas pertencem a origens genéticas distintas e por sua vez, a variação de *pools* em cada população indica estruturação nas regiões. Os dados do *Structure* corroboram com os dados da AMOVA e PCoA, destacando que existem populações estruturadas em cada região e que a formação de subgrupos dessas populações no PCoA é influenciado pelo *pool* gênico compartilhado entre elas.

Dentre as 17 populações estudadas na caatinga e os três *pools* gênicos existentes foi possível visualizar as populações em subgrupos um, dois e três. Aqui podemos observar claramente que mesmo com as distâncias entre as populações elas compartilham *pools* gênicos semelhantes, ou seja, essas populações de *Atta sexdens* conseguem se dispersar em distâncias consideráveis e realizar o fluxo gênico. Esses dados corroboram com Cruz (2015) que estudou a mesma espécie nessa localidade e observou que quando indivíduos de diferentes populações (colônias) são conduzidos ao confronto não há ocorrência de brigas, ou

seja, os indivíduos se reconhecem quimicamente, sugerindo a existência de certo grau de parentesco entre às populações dessa região.

Para a “mata de cipó” foram formados quatro subgrupos de acordo com os *pools* gênicos estabelecidos através do delta K, assim temos a estrutura genética dividida em subgrupo um, dois, três e quatro. Neste caso, pode-se observar que o grau de estruturação entre as populações é maior que o grau encontrado para as populações da caatinga, pois a maioria das populações vizinhas compartilham características genéticas semelhantes, com exceção das populações 11, 12 e 13. As populações que apresentaram mistura de mais de dois *pools* gênicos devem ser fruto de interações reprodutivas (poliândricas), comportamento comum para formigas, inclusive as cortadeiras.

A análise da diversidade genética intrapopulacional (representado por 15 indivíduos por população) avaliada pela AMOVA e PCoA se mostrou mais similar para as populações da caatinga (84%) do que para “mata de cipó” (71%), e portanto, a distribuição dos populações da caatinga, se dá de maneira mais agrupada que a “mata de cipó”. Neste caso, uma maior taxa de acasalamento poliândrico pode estar ocorrendo para as populações presente na caatinga e por isso estas encontram-se menos estruturadas. Em se tratando da metapopulação, a diversidade genética intrapopulacional apresentou diferentes níveis de diversidade. Foram observados para apenas uma região e duas regiões, mostrando que ao se considerar duas regiões, a diversidade diminui com o aumento da estruturação entre as regiões.

Sabe-se que a diversidade genética intrapopulacional em formigas cortadeiras pode ser aumentada com a poliandria (acasalamento da rainha com mais de um macho) (Boomsma *et al.*, 1999, Evison & Hugues, 2011), tornando as populações mais resistentes a doenças (Boomsma *et al.*, 1999) e também contribuindo significativamente para o comportamento eussocial (Hugues & Boomsma, 2007, Oldroyd & Fewell, 2007) uma vez que, populações (ou colônias) geneticamente diversas podem ter melhor variação genotípica e conseqüentemente, melhor divisão do trabalho (Constant *et al.*, 2012).

Embora as espécies de formigas cortadeiras sejam favorecidas pela poliandria (Boomsma *et al.*, 1999, Evison & Hugues, 2011) e capazes de se adaptar em ambientes modificados (Farji-Brenner & Corley, 1998, Vasconcelos *et al.*, 2006, Silva *et al.*, 2009) isso não significa que as populações encontram-se com diversidade genética alta ou que essa diversidade esteja distribuída uniformemente entre elas.

Tanto no grupo das plantas como no dos animais, a estrutura e diversidade genética refletem em grande parte do sistema reprodutivo da espécie. Mas existem fatores como a

diminuição do número de populações, acompanhada da perda de diversidade genética e fragmentação que tendem a refletir sobre a estrutura genética populacional (Pinto e Carvalho, 2004, Rocha & Gasca, 2007).

A fragmentação, por exemplo, causada por questões naturais ou antrópicas, criam barreiras entre as populações impedindo que alguns dos fatores evolutivos (o fluxo gênico, a migração e o acasalamento aleatório) ocorram livremente e propiciem o aumento da diversidade genética (Pinto e Carvalho, 2004, Salman, 2007). Apesar das formigas cortadeiras se adaptarem bem em ambientes antropizados, as populações podem ainda assim sofrer os efeitos da fragmentação. Reis *et al.* (2014) observou que a estrutura genética encontrada para *Atta robusta* é decorrente da perda do habitat, fator que tem interferido no fluxo gênico dessa espécie endêmica das restingas dos estados do RJ e ES.

Por outro lado, algumas populações conseguem romper as barreiras geográficas e manter o fluxo gênico a depender das distâncias que se encontram. Cantagalli *et al.* (2013) encontrou alto grau de polimorfismo nas cinco populações de *Atta sexdens rubropilosa* presente em diferentes regiões do estado de São Paulo e Paraná. Mesmo com a estruturação encontrada, os autores revelam que ainda há troca gênica entre populações de *A. sexdens rubropilosa* das regiões estudadas em Maringá e Ivatuba (PR) cuja distância genética e geográfica é de 42,3 km.

Ambas as regiões deste estudo encontram-se fragmentadas. No entanto, a região 1, apresenta áreas mais abertas, quando comparada à região 2. Na caatinga, as colônias de *Atta sexdens* ocorrem em áreas que foram fragmentadas para a criação de gado, e também para construção de estradas. Como nos últimos anos houve uma redução na densidade da vegetação (Cruz, 2015) a espécie *Atta sexdens* parece ter se favorecido nesta área, colonizando em áreas mais abertas que permitem melhor distribuição e fluxo gênico entre as populações. Na região 2, o fragmento se resume à uma área de borda, apresentando em seu interior uma maior densidade de espécies arbóreas, arbustivas e cipós. Isso pode explicar o porquê da distribuição das populações de *Atta sexdens* localizarem-se apenas à margem deste fragmento, mas por outro lado é responsável por reduzir o fluxo gênico entre as populações e induzir a fundação de ninhos de maneira sequencial neste fragmento. Estes fatores podem estar influenciando no padrão de estrutura genética ($K=4$) retratado para as populações de *Atta sexdens* da “mata de cipó”.

Como pode ser visto a densidade vegetacional pode influenciar diretamente a distribuição das populações na área de ocorrência, e conseqüentemente gera efeito sobre a

estruturaco genética. Nas regiões estudadas, quanto menor a densidade vegetacional menor foi a estrutura encontrada nas regiões.

No caso da possibilidade de existência da metapopulao, as populaes da região 1 e 2 mesmo compartilhando características genéticas semelhantes não compõem uma metapopulao, pois as regiões encontram-se bastante isoladas geograficamente (aproximadamente 187,30 km em linha reta) limitando a capacidade de dispersão entre as duas regiões estudadas. Assim os dados obtidos corroboram o que a distancia geográfica já sugeria que não havia formao de uma metapopulao.

Em síntese, os resultados obtidos neste estudo de diversidade genética das populaes de *Atta sexdens*, permitem concluir que quando consideramos cada região separadamente (caatinga e “mata de cipó”), as amostras da “mata de cipó” indicaram maior grau de estruturaco. Apesar das regiões estudadas compartilharem características genéticas em comum, elas não compõem uma metapopulao, pois as regiões encontram-se relativamente isoladas geograficamente.

Agradecimentos

 Fundao de Amparo  Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), ao programa de ps-graduao em Ciências Ambientais (PPGCA) pela concessão da bolsa de estudo e ao grupo BIOGEN do Laboratório de Genética Molecular Aplicada (LGMA).

Referências

- Andrade-Lima D (1971) Vegetao de Jaguaquara-Maracs, Bahia. Ciência e Cultura. São Paulo, Sociedade Brasileira para o progresso da Ciência (SBPC) 23(3): 317-319.
- Al-Otaibi SA (2008) Genetic variability in mite-resistant honey bee using ISSR molecular markers. Arab J. Biotech., 11(2) 241-252.
- Brasil (1981) Ministério das Minas e Energia/Secretária Geral. Projeto RADAM BRASIL, Folha SD 24 Salvador: geologia, geomorfologia, pedologia, vegetao e uso potencial da terra. Rio de Janeiro: Ministério de Minas energia/Secretária Geral (Levantamento de Recursos Naturais, 24).
- Brasil (2006) Plano de Manejo Floresta Nacional Contendas do Sincorá. Informaes Gerais sobre a Floresta Nacional. Brasília: Ministério do Meio Ambiente/IBAMA. v.1, pp.90.
- Boomsma J, Fjerdingstad E e Frydenberg J (1999) Multiple paternity, relatedness and genetic diversity in *Acromyrmex* leafcutter ants. Proceedings of the Royal Society, 266: 249-254.
- Bolton, B. 2016. An online catalog of the ants of the world. Disponível em: <http://antcat.org>. Acesso em: 20 de agosto de 2016.
- Cantagalli LB, Mangolin CA e Ruvolotakasukuki MCC (2013) Population genetics of *Atta sexdens* rubropilosa (Hymenoptera: Formicidae) Acta biol. Colomb., 18(1):179 – 190.
- Carvalho AOR e Vieira LGE (2000) Comparison of Preservation Methods of *Atta* spp. (Hymenoptera: Formicidae) for RAPD Analysis. An. Soc. Entomol. Brasil 29(3): 489-496.

- Carvalho AOR e Vieira LGE (2001) Determinação das Condições Ótimas para Análises de PCR-RAPD em *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). *Neotropical Entomology*, 30(4): 593-600.
- Carvalho KS, Souza ALB, Pereira MS, Sampaio CP e Delabie JHC (2004) Comunidade de formigas epígeas no ecótono mata de cipó, domínio da mata atlântica, Ba, Brasil. *Acta Biol Leopold*, 26(2):249-257.
- Carmo, TNN (2012) Atividade de forrageamento de *Atta sexdens rubropilosa* em uma área de Caatinga no município de Contendas do Sincorá, Bahia. 47p. Monografia (Especialização em Meio Ambiente e Desenvolvimento), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, UESB, Itapetinga – BA.
- Ceksteryte V, Paplauskiene V, Tamasauskiene D, Pasakinskiene I e Mazeikiene I (2012) Genetic characterization of Lithuanian honeybee lines based on ISSR polymorphism. *Apidologie*, 43: 652.
- Constant N, Santorelli LA, Lopes JFS e Hughes WHO (2012) The effects of genotype, caste, e age on foraging performance in leaf-cutting ants. *Behav. Ecol.* 23: 1284–1288.
- Cruz CD (2006) Programa Genes: Aplicativo Computacional em Genética e Estatística. Editora UFV, Viçosa.
- Cruz, Ianí Aparecida de Souza. Densidade de ninhos e interações agonísticas da formiga cortadeira *Atta sexdens* (Hymenoptera: formicidae) em região de caatinga no Sudoeste da Bahia. 2015. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciências ambientais). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, UESB, Itapetinga – BA, 2015.
- Della Lucia, TMC (1993) (Ed.) As formigas cortadeiras. Ed. Folha da Mata, Viçosa. pp.262.
- Earl DA e vonHoldt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv Genet Resour.* 4: 359–361. <http://dx.doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- Evison SEF e Hughes WOH (2011) Genetic caste polymorphism and the evolution of polyandry in *Atta* leaf-cutting ants. *Naturwissenschaften* 98:643–649. DOI 10.1007/s00114-011-0810-3
- Farji-Brener AG e Corley JC (1998) Successful invasions of hymenopteran insects into NW Patagonia. *Ecol. austral*, v. 8, p.273-249.
- Guimarães CT, Magalhães JV, Lanza MA e Scliuster I (2009) Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, 30 (253).
- Hamrick, JL (1983) The distribution of genetic variation within e among natural plant population. In *Genetics and conservation* (C.M. Schone-Wald-Cox, S.H. Chambers, B. MacByde & L. Thomas, eds.). Benjamin Cummings Publishing Company, Menlo Park, p.335-348.
- Hughes WHO e Boomsma JJ (2007) Genetic polymorphism in leaf-cutting ants is phenotypically plastic. *Proc R Soc Lond B.* 274:1625–1630.
- Hughes WOH e Boomsma JJ (2008) Genetic royal cheats in leaf-cutting ant societies. *PNAS* 105 (13): 5150–5153.
- Hölldobler B e Wilson EO (1990) *The Ants*. Belknap Press of Harvard University, Cambridge, MA, 733 pp.
- Hölldobler B e Wilson EO (2010) *The Leafcutter Ants*. W.W. Norton & Company, Original edition, 192 pp.
- Lacerda DR, Macedo MDP, Lemos Filho JP e Lovato MB (2002) Review: A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. *Lundiana*, 3(2): 87-92, 2002.
- Leal IR, Wirth R e Tabarelli M (2014) The multiple impacts of leaf-cutting ants and their novel ecological role in human-modified neotropical forests. *Biotropica*, 46 (5): 516–528.

- Matos-Oliveira CF, Dias C, Santos ELS, Cerqueira-Silva CBM (2017) Caracterização e seleção de marcadores ISSR para análise genético-populacional de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae). Artigo submetido a revista Multi- Science.
- Nascimento MA, Batalha-Filho H, Waldschmidt AM, Tavares MG, Campos LAO e Salomão TMF (2010) Variation and genetic structure of *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae) populations based on ISSR pattern. *Genetics and Molecular Biology*, 33, 2, 394-397.
- Oldroyd BP e Fewell JH (2007) Genetic diversity promotes homeostasis in insect colonies. *Trends Ecol. Evol* 305, 402–404. doi:10.1016/j.tree.2007.06.001
- Oliveira, GV (2012) Dieta da formiga cortadeira *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em uma área de Caatinga do Sudoeste da Bahia. 2012. 42 p. (Monografia – Especialização em Meio Ambiente e Desenvolvimento). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, UESB, Itapetinga – BA.
- Paplauskienė V, Čeksterytė V, Pašakinskienė I, Tamašauskienė D e Račys J (2006) The use of ISSR method for the assessment of bee genetic diversity. *Biologija*, 3:16–20.
- Peakall R e Smouse PE (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28: 2537–2539. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
- Perrier X e Jacquemoud-Collet JP (2006) DARwin Software. Disponível em: <http://darwin.cirad.fr/>.
- Pinto SIC e Carvalho D (2004) Estrutura genética de populações de pindaíba (*Xylopiá brasiliensis* Sprengel) por isoenzimas. *Revista Brasil. Bot.*, 27, (3): 597-605.
- Pritchard JK, Stephens M e Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.
- Rahimi A, Mirmoayedi A, Kahrizi D, Zarei L e Jamali S (2016) Genetic diversity of Iranian honey bee (*Apis mellifera* meda Skorikow, 1829) populations based on ISSR markers. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, Apr 30;62(4):53-8.
- Reis EP, Salomão TMF, Campos LAO e Tavares MG (2014) Genetic diversity and structure of *Atta robusta* (Hymenoptera, Formicidae, Attini), an endangered species endemic to the restinga ecoregion. *Genetics and Molecular Biology*, 37(3):581-586.
- Rocha M e Gasca J (2007) Ecología molecular de la conservación. In: Eguiarte, L.E., Souza, V. & Aguirre, X. (eds.). *Ecología Molecular*. 1ª edición, (Semarnat-Ine-UNAM-Conabio), pp 251.
- Ranajit Chakraborty (1993) Analysis of Genetic Structure of Populations: Meaning, Methods, and Implications. In: PP Majumder (ed.). *Human Population Genetics*. 1nd edition. Springer US, Plenum Press, New York, pp 189-206.
- Santos LF, Oliveira EJ, Silva AS, Carvalho FM, Costa JL e Padua JG (2011) ISSR markers as a tool for the assessment of genetic diversity in Passiflora. *Biochem. Genet*, 49:540-554.
- Simpson J (1997) Amplified fragment length polymorphisms. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 60: 73-76.
- Salman AKD (2007) Conceitos básicos de genética de populações. Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 27 p. (Documentos / Embrapa Rondônia, ISSN 0103-9865;118).
- Silva PSD, Bieber AGD, Leal IR, Wirth R e Tabarelli M (2009) Decreasing abundance of leaf-cutting ants across a chronosequence of advancing Atlantic forest regeneration. *J. Trop Ecol*, 25: 223-227.
- Scaldeferri, M.M (2013) Diversidade genética em Velame Pimenta (*Croton linearifolius*) e Cassutinga (*Croton heliotropiifolius*) em ambientes silvestres no Sudoeste da Bahia. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) p.89. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

- Scaldferrri MM, Freitas JS, Santos ESL, Vieira JGP et al. (2013) Comparison of protocols for genomic DNA extraction from 'velame pimenta' (*Croton linearifolius*), a species native to the Caatinga, Brazil. *Afr. J. Biotechnol.*, 12: 4761- 4766.
- Souza CL (2003) Avaliação da pressão antrópica sobre a cobertura vegetal nos municípios de Cedro e Solidão (sertão pernambucano) com o uso de imagens TM Landsat e Sistemas de Informações Geográficas / C. L. Sousa. – São José dos Campos: INPE, 2003.
- Shouhani H, Dousti A, Radjabi R e Zarei M (2014) Application of ISSR to study the genetic diversity of honeybee (*Apis mellifera* L.) populations in some areas of Iran. *J. BioSci. Biotech.* 3(2): 127-131.
- Sunnucks P e Hales DF (1996) Numerous Transposed Sequences of Mitochondrial Cytochrome Oxidase I-II in Aphids of the Genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae). *Revista Mol. Biol. Evol.*, 13: 510-524.
- Terborgh J, Lopez L, Nuñez P, Rao M, Shahabuddin G, Orihuela G, Riveros M, Ascanio R, Adler GH, Lambert TD e Balbas L (2001) Ecological meltdown in predator-free forest fragments. *Science*, 294:1923-1926.
- Weber NA (1972) Gardening Ants The Attines. Philadelphia: Am. Philosc. Soc. 92. 146 pp.
- Weber NA (1982) Fungus ants. en social insects. Vol.4 H.R.Hermann (Ed.). Academic Press, London. pp.255-363.
- Wirth R, Herz H, Ryel R, Beyschlag W e Hölldobler B (2003) The herbivory of leaf-cutting ants. A case study on *Atta colombica* in the tropical rainforest of Panama. *Ecological Studies* 164. Heidelberg, Springer Verlag, pp.230.
- Wirth R, Meyer ST, Almeida WR, Júnior MVA, Barbosa VS e Leal IR (2007) Increasing densities of leaf-cutting ants (*Atta* spp.) with proximity to the edge in a Brazilian Atlantic forest. *J Trop Ecol*, 23:501-504.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A espécie *Atta sexdens*, umas das formigas cortadeiras de maior importância econômica no Brasil, apresenta estudos preliminares em sua maioria de cunho ecológico, havendo poucos estudos genético-moleculares em nível de gênero e espécie. Este estudo gerou contribuições de natureza metodológica, bem como gerou informações genético-moleculares para a compreensão da variabilidade e a estrutura genética de populações de *A. sexdens* em diferentes fragmentos no sudoeste da Bahia.

Para *Atta sexdens* testou-se quais as partes do corpo propiciariam maior obtenção de DNA genômico e quais dos seis protocolos aplicáveis até o presente momento para o grupo das plantas seriam viáveis para extração de DNA da espécie. Os protocolos selecionados foram Sunnucks & Hales (1996), método modificado por Russel et al. (2010) e Mogg & Bond (2003) sendo indicada a realização da extração com Corpo Inteiro, excluindo apenas o Gáster em casos de uso com marcadores moleculares aleatórios.

No que refere a atividades voltadas à amplificação, dentre os 23 marcadores ISSR testados, 17 marcadores são passíveis de serem utilizados em estudos de diversidade genética para espécie *Atta sexdens*. Com base nesta etapa de seleção, seis dos 17 marcadores selecionados foram aplicados em populações de *A. sexdens* localizada na caatinga e ‘mata de cipó’. Os resultados revelaram que ambas as regiões estudadas encontram-se estruturadas, porém o maior grau de estruturação pertence às populações da “mata de cipó”. A variação genética intrapopulacional encontrada para as populações de *A. sexdens* é provavelmente influenciada pelo acasalamento poliândrico existente em formigas cortadeiras, sendo a estrutura genética ocasionada pela interferência do fluxo gênico entre as populações (ou ninhos) de cada região. Muito embora as populações estudadas compartilhem características genéticas em comum (provavelmente fruto da mesma ancestralidade), elas não compoem uma metapopulação, pois se encontram distantes geograficamente impedindo o fluxo gênico entre as populações de ambas as regiões.

8. ANEXO 1

Apresentação das normas da revista escolhida para submissão do capítulo I: ENCICLOPÉDIA BIOSFERA

1) Forma de apresentação: O Trabalho deverá ser apresentado de forma completa – Digitado em formato DOC (não sendo aceito formato DOCX, PDF ou outro), contendo Título, nome(s) completo(s) do(s) autor(es) (sem abreviações), e-mail do autor principal, incluindo instituição de origem, cidade e país.

2) O trabalho deve ter: resumo em língua portuguesa, palavras-chave (em ordem alfabética), Título em língua estrangeira, resumo em língua estrangeira (abstract), palavras-chave em língua estrangeira (keywords). O resumo deve ter o máximo de 250 palavras.

3) O artigo científico regular deve apresentar as seções: introdução, material e métodos, resultados e discussão, conclusão (se for o caso), agradecimentos (opcional) e referências bibliográficas. A revisão bibliográfica deve conter as seções: introdução, desenvolvimento, conclusão, agradecimentos (opcional) e referências bibliográficas.

Regras de formatação:

- corpo do texto justificado;
- espaçamento simples;
- margem superior e esquerda de 3 cm, margem inferior e direita de 2 cm;
- fonte: Arial 12;
- as páginas não devem ser numeradas;
- Artigo científico regular: mínimo de sete (7) páginas, máximo de 15 páginas;
- Revisão bibliográfica: mínimo de 15 páginas, máximo de 25 páginas.

4) Figuras: Deverão ser apresentadas em formato jpg, com resolução mínima de 300 dpi. Orientamos para que o trabalho tenha preferencialmente tamanho máximo de 1.000Kb. As figuras devem informar a fonte.

5) As situações não previstas devem seguir o que é determinado pelas normas da ABNT. É fundamental observar exemplo de trabalho dentro destas normas, disponível aqui.

Importante:

Para as referências oriundas de artigos científicos, **OBRIGATORIAMENTE** inserir a URL e o número de identificação de DOI:

Exemplo:

VIJAYARAGHAVAN, K.; JOSHI, U. M. Hybrid Sargassum-sand sorbent: A novel adsorbent in packed column to treat metal-bearing wastewaters from inductively coupled plasma-optical emission spectrometry. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, v. 48, n. 13, p. 1685-1693, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/10934529.2013.815503>>. doi: 10.1080/10934529.2013.815503

6) São aceitos trabalhos nos idiomas: português, espanhol e inglês.

7) Para todas as publicações: devem conter, pelo menos, 60% das referências citadas sendo dos últimos cinco anos. Não citar trabalhos oriundos de resumos de congressos, teses e dissertações.

8) TRABALHOS QUE NÃO ESTIVEREM DENTRO DA FORMATAÇÃO INDICADA NO EDITAL PODERÃO SER RECUSADOS SUMARIAMENTE.

9) As submissões de trabalhos devem ser feitas durante o período de vigência do edital, obedecendo as regras do mesmo.

10) Trabalhos resultantes de pesquisa com pessoas ou animais devem informar o parecer do comitê de ética e número de registro. (esta informação pode ser enviada anexa ao trabalho)

11) Orientações para desenvolvimento do texto:

- Trabalho científico deve ser escrito de forma impessoal.

- Referências no texto devem constar na lista final e vice-versa.

- NÃO SÃO ACEITOS ARTIGOS DE OPINIÃO.

- Todos os artigos submetidos recebem resposta dos avaliadores e orientações para que os autores possam melhorar seus trabalhos (quando é o caso).

- Parte de textos de terceiros que não é citada de forma correta é considerado como plágio e o artigo é recusado.

13) Orientamos para a utilização das normas NBR 6023 e NBR 10520 da ABNT.

9. ANEXO 2

Apresentação das normas da revista escolhida para submissão do capítulo II: MULTI-SCIENCE JOURNAL

INFORMAÇÕES PRELIMINARES

1) A simples remessa dos originais para apreciação implica autorização para publicação na Multi-Science Journal. O conteúdo do(s) artigo(s) publicados na Multi-Science Journal, inclusive quanto a veracidade, atualização e precisão dos dados, é de única e exclusiva responsabilidade do(s) autor(es). A Multi-Science Journal não se responsabiliza pelos ideários, conceitos, apreciações, julgamentos, opiniões e considerações lançados nos textos dos artigos. Além disso, não se responsabiliza ainda por quaisquer desvio de natureza ética, tais como plágios e não cumprimento de resoluções nacionais sobre a experimentação com seres humanos e animais, bem como o cumprimento de acordos internacionais, ligados à bioética. OS TRABALHOS PUBLICADOS NA REVISTA SÃO DE INTEIRA E EXCLUSIVA RESPONSABILIDADE DE SEUS AUTORES.

2) Os autores deverão indicar NA PRIMEIRA PÁGINA do manuscrito, além das informações sobre o trabalho, A CATEGORIA DE ARTIGO QUE O MANUSCRITO SE ENCAIXA (artigo original, comunicação breve, revisão ou carta ao editor).

3) Os autores deverão fornecer informações de contato detalhado (nome, instituição de origem e e-mail) de pelo menos 3 (TRÊS) POTENCIAIS REVISORES PARA O SEU TRABALHO. Estas informações deverão ser digitadas no campo “COMENTÁRIOS AO EDITOR”, durante a submissão. Os potenciais revisores deverão ser especialistas na área de concentração do trabalho enviado. Qualquer um dos revisores sugeridos não deverá ter publicado qualquer trabalho com os autores nos últimos três (3) anos, nem ser membro da mesma instituição. Revisores sugeridos serão considerados revisores em potencial de acordo com a análise e recomendação dos Editores.

1. FORMATAÇÃO DOS TRABALHOS

Não há requisitos de formatação rigorosos para submissão à Multi-Science Journal, mas todos os manuscritos devem conter os elementos essenciais necessários para transmitir cientificamente as informações do manuscrito, tais como, Resumo (Abstract), Palavras-chaves (Keywords), Introdução, Material e Métodos, Resultados, Conclusões, assim como elementos gráficos (quadros, tabelas, esquemas, dentre outros), com títulos e legendas.

Sugerimos que os autores dividam os manuscritos em seções bem definidas. Os elementos gráficos devem ser encaixados no corpo do texto, próximo às suas citações.

Os textos devem ser digitados em extensão .doc, .txt ou .rtf, espaçamento entre linhas de 1,5, com letras Times New Roman, corpo 12, página em tamanho A-4, incluindo resumos, agradecimentos, referências e tabelas. Todas as páginas deverão ser numeradas. Deve-se evitar no texto o uso indiscriminado de siglas, excetuando as já consagradas.

2. CATEGORIAS DE ARTIGOS

2.1. Artigos originais

Incluem estudos observacionais, experimentais, descritivos ou teóricos. Cada artigo deve conter objetivos claros, desenho e métodos utilizados, resultados, discussão e conclusões. Além disso, incluem ensaios teóricos (críticas e formulação de conhecimentos teóricos relevantes) e artigos dedicados à apresentação e discussão de aspectos metodológicos

e técnicas utilizadas na pesquisa científica. Neste caso, o texto deve ser organizado em tópicos para guiar os leitores quanto aos elementos essenciais do argumento desenvolvido.

Limite máximo de páginas: 25 laudas. Artigos com extensão maior serão avaliados pelo corpo editorial.

Número de tabelas e figuras: preferencialmente 5 (cinco) no conjunto, devendo ser incluídos apenas os elementos gráficos imprescindíveis, evitando-se tabelas muito longas.

2.2. Comunicações breves

São relatos curtos de achados que apresentam interesse para as áreas da Multi-Science Journal, mas que não comportam uma análise mais abrangente e uma discussão de maior fôlego.

Limite máximo de páginas: 6 laudas, incluindo resumo, tabelas, figuras e referências.

2.3. Artigos de revisão

Revisão sistemática e meta-análise - Por meio da síntese de resultados de estudos originais, quantitativos ou qualitativos, objetiva responder à pergunta específica e de relevância para uma determinada área. Descreve com pormenores o processo de busca dos estudos originais, os critérios utilizados para seleção daqueles que foram incluídos na revisão e os procedimentos empregados na síntese dos resultados obtidos pelos estudos revisados (que poderão ou não ser procedimentos de meta-análise).

Revisão narrativa/crítica - A revisão narrativa ou revisão crítica apresenta caráter descritivo-discursivo, dedicando-se à apresentação compreensiva e à discussão de temas de interesse científico. Deve apresentar formulação clara de um objeto científico de interesse, argumentação lógica, crítica teórico-metodológica dos trabalhos consultados e síntese conclusiva. Deve ser elaborada por pesquisadores com experiência no campo em questão ou por especialistas de reconhecido saber. Poderão ser publicados mediante convite do corpo editorial da Multi-Science Journal.

Limite máximo de páginas: 30 laudas, incluindo resumo, tabelas, figuras e referências.

2.4. Cartas ao Editor

Publicam-se também Cartas Ao Editor com até 600 palavras e 5 referências.

3. IDIOMA

Aceitam-se manuscritos nos idiomas português e inglês. Independentemente do idioma empregado, todos manuscritos devem apresentar dois resumos, sendo um em português e outro em inglês.

4. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

A primeira página do manuscrito deve conter:

- a) Título do artigo - deve ser conciso e completo. Deve ser apresentada a versão do título em inglês.
- b) Título resumido, para fins de legenda nas páginas impressas.
- c) Nome e sobrenome de cada autor.
- d) Instituição a que cada autor está afiliado, acompanhado do respectivo endereço (uma instituição por autor).
- e) Nome e endereço do autor responsável para troca de correspondência.
- f) Se foi subvencionado, indicar o tipo de auxílio, o nome da agência financiadora e o respectivo número do processo.
- g) Categoria do artigo (artigo original, comunicação breve, revisão ou carta ao editor)

5. REFERÊNCIAS

IMPORTANTE: EM CASO DE ACEITE DO MANUSCRITO, ESTE SÓ SERÁ PUBLICADO APÓS A ADEQUAÇÃO DAS REFERÊNCIAS PELOS AUTORES.

Nesses casos, as referências deverão seguir **RIGOROSAMENTE** as normas da American Psychological Association (APA) (American Psychological Association (2010). Publication manual of the American Psychological Association (6th Ed.). Washington, DC: APA.

Artigos de revistas científicas

Menezes, I. P. P., Barroso, P. A. V., Silva, J. O., & Hoffmann, L. V. (2015). Distribuição do modo de ocorrência in situ de landraces de algodoeiro Semiárido Brasileiro. *Multi-Science Journal*, 1(1), 39-47.

(OBS.: Artigos com seis ou mais autores, usa-se a expressão “et al.”)

Livros

Oliveira, A. (1986). Monografia do concelho de Olhão. Faro: Algarce em Foco.

Reis, C. (2001). O conhecimento da literatura: introdução aos estudos literários (2^a ed.) Coimbra: Almedina.

Mateus, M. H. et al. (2003). Gramática da língua portuguesa. Lisboa: Caminho.

(OBS.: Livros com seis ou mais autores, usa-se a expressão “et al.”)

Capítulo de livro

Hughes, D., & Galinsky, E. (1988). Balancing work and Family lives: Research and corporate applications. In A. E. Gottfried & A. W. Machado (Eds), *Maternal employment and children’s development* (pp. 233-268). New York: Plenum.

Dissertações ou Teses

Rodrigues, A. S. L. (2012). Caracterização da bacia do rio Gualaxo do Norte, MG, Brasil: avaliação geoquímica ambiental e proposição de valores de background. (Tese de doutoramento). Universidade Federal de Ouro Preto, Brasil.

Eventos acadêmicos

Nicol, D. M., & Liu, X. (1997). The dark side of risk (what your mother never told you about time warp). In *Proceedings of the 11th Workshop on Parallel and Distributed Simulation*, Lockenhaus, Austria, 10-13 June 1997 (pp. 188-195). Los Alamitos, CA: IEEE Computer Society.

Links de internet

Bryant, P. (1999). Biodiversity and conservation. Disponível em: <<http://darwin.bio.uci.edu/~sustain/bio65/Titlpage.htm>> Acesso em: 19/10/1999.

Berenstein, I., & Puget, J. (2004). Curso de psicoanálisis de família, Nível I e II, promovido pelo Campus Virtual da APDEBA. Disponível em: <<http://www.apdeba.org>> Acesso em: 19/10/2004.

Comunicação pessoal não é considerada referência bibliográfica. Quando essencial, pode ser citada no texto, explicitando em rodapé os dados necessários. Devem ser evitadas citações de documentos não indexados na literatura científica mundial e de difícil acesso aos leitores, em geral de divulgação circunscrita a uma instituição ou a um evento; quando relevantes, devem figurar no rodapé das páginas que as citam. Da mesma forma, informações citadas no texto, extraídas de documentos eletrônicos, não mantidas permanentemente em sites, não devem fazer parte da lista de referências, mas podem ser citadas no rodapé das páginas que as citam.

AS REFERÊNCIAS DEVEM SER ORGANIZADAS EM ORDEM ALFABÉTICA, AO FINAL DO MANUSCRITO.

6. CITAÇÃO

Citações no interior do texto

(...) educação para saúde (Fisher, 1999), para prestação de serviços (Weist & Christodulu, 2000) e para a cidadania (Mulligan et al., 1997).

Segundo Fonseca (2000), o trabalho é necessário (...)

Para Machado & Santiago (2015), a população consome muitos alimentos (...)

Seguindo o raciocínio de Beatriz et al. (2014), a educação (...)

No caso em que um autor citado, ou um conjunto de autores, tiveram dois ou mais trabalhos publicados no mesmo ano, tanto no texto quanto na lista de referências, a referência deve ser seguida por letra minúscula em ordem alfabética.

Smith (2010a) ou (Smith, 2010a); Smith (2010b) ou (Smith, 2010b)

White (2009ab) ou (White, 2009ab), Souza & Garcez (2011a) ou (Souza & Garcez, 2011a); Souza e Garcez (2011b) ou (Souza & Garcez, 2011b),

Santibañes et al. (2008a) ou (Santibañes et al., 2008a); Santibañes et al. (2008b) ou (Santibañes et al., 2008b), Santibañes et al. (2008ab) ou (Santibañes et al. 2008ab)

Citações em sequência, no texto, devem ser apresentadas em ordem cronológica (e na lista de referências em ordem alfabética).

Baker (2008), Costa e Silva (2010), Dantas et al. (2011abc)

ou (Baker, 2008, Costa & Silva, 2010, Dantas et al. 2011abc)

7. SUPLEMENTOS

Temas relevantes nas áreas da Multi-Science Journal podem ser temas de suplementos. A Revista poderá publicar até dois suplementos por ano, sob demanda.

Os suplementos são coordenados por, no mínimo, três editores. Um é obrigatoriamente da Multi-Science Journal e dois outros editores-convidados podem ser sugeridos pelo proponente do suplemento.

Todos os artigos submetidos para publicação no suplemento serão avaliados por revisores externos, indicados pelos editores do suplemento. O suplemento poderá ser composto por artigos originais (incluindo ensaios teóricos), artigos de revisão, comunicações breves ou artigos no formato de comentários. Os autores devem apresentar seus trabalhos de acordo com as instruções aos autores disponíveis no site da Multi-Science Journal.

8. CONFLITO DE INTERESSES

A confiabilidade pública no processo de revisão por pares e a credibilidade de artigos publicados dependem em parte de como os conflitos de interesses são administrados durante a redação, revisão por pares e tomada de decisões pelos editores.

Conflitos de interesses podem surgir quando autores, revisores ou editores possuem interesses que, aparentes ou não, podem influenciar a elaboração ou avaliação de manuscritos. O conflito de interesses pode ser de natureza pessoal, comercial, política, acadêmica ou financeira.

Quando os autores submetem um manuscrito, eles são responsáveis por reconhecer e revelar conflitos financeiros ou de outra natureza que possam ter influenciado seu trabalho. Os autores devem reconhecer no manuscrito todo o apoio financeiro para o trabalho e outras conexões financeiras ou pessoais com relação à pesquisa. O revisor deve revelar aos editores quaisquer conflitos de interesse que poderiam influir em sua opinião sobre o manuscrito, e, quando couber, deve declarar-se não qualificado para revisá-lo. Se os autores não tiverem certos do que pode constituir um potencial conflito de interesses, devem contatar os Editores da Multi-Science Journal.

Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

A contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista; caso contrário, deve-se justificar em "Comentários ao editor".

O arquivo da submissão está em formato Microsoft Word, OpenOffice ou RTF.

URLs para as referências foram informadas quando possível.

O texto está em espaço simples; usa uma fonte de 12-pontos; emprega itálico em vez de sublinhado (exceto em endereços URL); as figuras e tabelas estão inseridas no texto, não no final do documento na forma de anexos.

O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em Diretrizes para Autores, na página Sobre a Revista.

Em caso de submissão a uma seção com avaliação pelos pares (ex.: artigos), as instruções disponíveis em Assegurando a avaliação pelos pares cega foram seguidas.

Declaração de Direito Autoral

Autores que publicam nesta revista concordam com os seguintes termos:

Autores mantém os direitos autorais e concedem à revista o direito de primeira publicação, com o trabalho simultaneamente licenciado sob a Licença Creative Commons Attribution que permite o compartilhamento do trabalho com reconhecimento da autoria e publicação inicial nesta revista.

Autores têm autorização para assumir contratos adicionais separadamente, para distribuição não-exclusiva da versão do trabalho publicada nesta revista (ex.: publicar em repositório institucional ou como capítulo de livro), com reconhecimento de autoria e publicação inicial nesta revista.

Autores têm permissão e são estimulados a publicar e distribuir seu trabalho online (ex.: em repositórios institucionais ou na sua página pessoal) a qualquer ponto antes ou durante o processo editorial, já que isso pode gerar alterações produtivas, bem como aumentar o impacto e a citação do trabalho publicado (Veja O Efeito do Acesso Livre).

Política de Privacidade

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.

10. ANEXO 3

Apresentação das normas da revista escolhida para submissão do capítulo III: REVISTA GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

1. Manuscripts have to be submitted through our online submission platform: <https://mc04.manuscriptcentral.com/gmb-scielo>

A cover letter addressed to the Editor-in-Chief is required

2. For submission the following instructions must be observed:

The manuscript must be submitted by the Corresponding Author, identified as such in the title page of the manuscript. This is the person who will also check the page proofs, and arranges for any payment that may incur during the editorial process.

Entering the following metadata is required: (i) the manuscript title, (ii) a short running title (max. 35 characters), (iii) the Abstract, and (iv) up to five keywords. All these items must be exactly the same as those figuring in the first two pages of the manuscript file.

Statements are required informing that the data have not been published and are not under consideration elsewhere, and that all authors have approved the submission of the manuscript. Furthermore, possible conflicts of interest (e.g. due to funding, consultancies) must also be disclosed. For statements on ethical issues in research see below (3.1.m)

The names of all co-authors, including institutional affiliations and e-mail addresses must be entered, as contact information for the Editorial Office.

In the referee suggestions field, up to five reviewer names can be entered by the author(s); valid e-mail contact addresses for these are required, in case they are selected by the editor. These suggestions can be made separately as preferred and opposed reviewer(s).

Files must be uploaded separately and identified according to file types, respecting the following sequence: main text document (title page as page 1), tables, figures and, if applicable, supplementary material. The main text file must include the title page, Abstract, References and, if applicable, figure legends, which must be typed on a separate page following the References and Internet Resources sections. Each table, figure and element containing supplementary material must be saved and uploaded in a separate file. Formats for text and tables are Word or RTF in Windows platform. Figures should be in TIFF or JPEG formats (see detailed instructions in 3.1.i).

Manuscripts including photos or any other identifiable data of human subjects must be accompanied by a copy of the signed consent by the individual or his/her guardian.

Failure to adhere to these guidelines can delay the handling of your contribution and manuscripts may be returned before being reviewed.

Special attention should be given to the structuring of the manuscript and correct language usage. These are important factors in the smooth running of the editorial and peer-review process, and can result in faster publication.

3. Categories of Contribution

3.1. Research Articles

Manuscripts must be written in English in double-spaced, 12-point type throughout; marked with consecutive line and page numbers, beginning with the title page.

The following elements must start on a new page and be ordered as they are listed below:

- a) The Title Page must contain: a concise and informative title; the authors' names (first name at full length); the authors' institutional affiliation, including department, institution, city, state or province, and country; different affiliations must be indicated with superscript Arabic numbers; a short running title of up to 35 characters (including spaces); up to five key words; the corresponding author's name, full postal, and email address.
- b) The Abstract must be a single paragraph that does not exceed 200 words and summarizes the main results and conclusions of the study. It should not contain references.
- c) The text must be as succinct as possible. Text citations: articles should be referred to by authors' surnames and date of publication; citations with two authors must include both names separated by "and"; in citations with three or more authors, name the first author and use et al. List two or more references in the same citation in chronological order, separated by semi-colons. When two or more works in a citation were published in the same year, list them alphabetically by the first author surname. For two or more works by the same author(s) in a citation, list them chronologically, with the years separated by commas. (Example: Freire-Maia et al., 1966a, 1966b, 2000). Only articles that are published or in press should be cited. In the case of personal communications or unpublished results, all contributors must be listed by initials and last name (et al. should not be used). Numbers: In the text, numbers nine or less must be written out except as part of a date, a fraction or decimal, a percentage, or a unit of measurement. Use Arabic numerals for numbers larger than nine. Do not start a sentence with an Arabic numeral. Binomial Names: Latin names of genera, species and infraspecific taxa must be printed in italics; we also recommend to present names of orders or families in the Title and/or when first mentioned in the text. URLs for programs, data or other sources should be listed in the Internet Resources Section, immediately following the References Section, not in the text.

The text includes the following elements:

Introduction - Description of the background that led to the study.

Material (or Subjects) and Methods - Details relevant to the conduct of the study. Statistical methods should be explained at the end of this section.

Results - Undue repetition in text and tables should be avoided. Statistical analyses should be presented as complete as possible, i.e. not only P-values should be shown, but also all other test variables required for full appreciation of the results. Comments on relevance of results are appropriate but broader discussion should be part of the Discussion section.

Discussion - The findings of the study should be placed in context of relevant published data. Ideas presented in other publications should not be discussed solely to make an exhaustive presentation.

Some manuscripts may require different formats appropriate to their content.

- d) The Acknowledgments must be a single paragraph that immediately follows the discussion and includes references to grant support.
- e) Conflict of Interest: Any possible conflict of interest must be disclosed here. If there is none, please state: The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicial to the impartiality of the reported research.
- f) The References Section: Only articles that are published or in press should be included in this section. Works submitted for publication but not yet accepted, personal communications and unpublished data must be cited within the text. "Personal communication" refers to

information obtained from individuals other than the authors of the manuscript being submitted; “unpublished data” refers to data produced by at least one of the authors of the manuscript under consideration. Works of restricted circulation (e.g., theses not available in public databases, congress abstracts not published in regular journals or public databases) should not be listed in this section.

References must be ordered alphabetically by the first author surname; references with the same first author should be ordered as follows: first, as single author in chronological order; next, with only one more co-author in alphabetical order by the second author; and finally followed by references with more than two co-authors, in chronological order, independent of the second author surnames. In references with more than 10 authors only the first ten should be listed, followed by et al. Use standard abbreviations for journal titles as suggested by NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/journals/>) or Thomson Reuters Web of Knowledge.

Sample journal article citation:

Breuer ME and Pavan C (1955) Behaviour of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angela* at different stages of larval development. *Chromosoma* 7:371-386.

Yonenaga-Yassuda Y, Rodrigues MT and Pellegrino KCM (2005) Chromosomal banding patterns in the eyelid-less microteiid lizard radiation: The X1X1X2X2:X1X2Y sex chromosome system in *Calyptommatus* and the karyotypes of *Psilophthalmus* and *Tretioscincus* (Squamata, Gymnophthalmidae). *Genet Mol Biol* 28:700-709.

Sample book citation:

Dobzhansky T (1951) *Genetics and Origin of Species*. 3rd edition. Columbia University Press, New York, 364 p.

Sample chapter-in-book citation:

Crawford DC and Howard-Peebles PN (2005) Fragile X: From cytogenetics to molecular genetics. In: Gersen SL and Keagle MB (eds) *The Principles of Clinical Cytogenetics*. 2nd edition. Humana Press, New Jersey, pp 495-513.

Sample electronic article citation:

Gotzek D, Ross KG (2009) Current status of a model System: The gene Gp-9 and its association with social organization in fire ants. *PLoS One* 4:e7713.

g) Internet Resources Section: this section should contain a list of URLs referring to data presented in the text, as well as software programs and other Internet resources used during data processing. Date of consultation must be stated.

Sample Internet resource citation:

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM> (September 4, 2009)

LEM Software, http://dir.niehs.nih.gov/dirbb/weinbergfiles/hybrid_design.htm (September 4, 2009)

h) Tables: Formats for tables are Word or RTF in Windows platform. They must be prepared with the table tool (do not use space bar or tabulator) and must be numbered consecutively in Arabic numerals). A concise title should be provided above the table. Each column should have a title in the box head. Footnotes typed directly below the table should be indicated in lowercase superscript letters. Tables that are to appear in the printed version must be saved in Word format and not as figures, so that they can later be fitted during typesetting. Each table must be saved and uploaded as a separate file.

i) Figures: Formats for figures are TIFF or JPEG. They must be numbered consecutively using Arabic numerals. Figures in Word, PowerPoint or Excel format cannot be published. Only sequence data can be presented in Word format. Journal quality reproduction will require resolution yielding 300 dpi for grayscale and color figures. These resolutions refer to

the output size of the file, that being the size in which it will appear printed in the journal; if it is anticipated that images will be enlarged or reduced, the resolutions should be adjusted accordingly. Figures composed of several elements should be sent as a single panel, obeying the print size definitions of the journal (single or two columns width). Scanned figures should not be submitted. Color illustrations are accepted and will be reproduced free of charge in the electronic and printed versions. Figure legends must be included at the end of the main text file and should be typed on a new page. When uploading, identify each illustration by the first author name and the number of the respective figure. Each figure/panel must be saved and uploaded as a separate file.

j) Nomenclature: Taxonomic names should be in accordance with current international standards. For rules concerning gene names and gene symbols, please see separate Instruction form.

k) Sequences may appear in text or in figure. DNA, RNA and protein sequences equal to or greater than 50 units must be entered into public databases and accession numbers must be provided upon acceptance of the article. Failure to do so will inadvertently delay publication.

l) Data access: reference should be made to availability of detailed data and materials used for reported studies.

m) Ethical issues: Reports of experiments on live vertebrates must include a statement in the text that the institutional review board approved the work and the protocol number must be provided. For experiments involving human subjects, a statement must be provided that informed consent was obtained from all subjects. If photos or any other identifiable data are included, a copy of the signed consent must be uploaded during manuscript submission.

n) Supplementary Material: Data that the authors consider of importance for completeness of a study, but which are too extensive to be included in the print version, can be submitted as Supplementary Material. At publication, this material will be made available together with the electronic version. In case a manuscript contains such material, it should be appropriately identified within the text file. Supplementary material in tables should be identified as Table S1, Table S2, etc., in case of figures they should be named accordingly, Figure S1, Figure S2. In addition, a list of this material should be presented at the end of the manuscript text file, containing the following statement:

Supplementary material - the following online material is available for this article:

Table S1 – < short title >

Figure S1 – < short title >

3.2 Short Communications

Short Communications present brief observations that do not warrant full-length articles. They should not be considered preliminary communications. They should be 15 or fewer typed pages in double spaced 12-point type, including literature cited, include an Abstract no longer than five percent of the paper's length, but no further subdivision, with introduction, material and methods, results and discussion in a single section and without headers. Up to four items (tables and/or figures) may be submitted. The title page and reference section format is that of a full-length Research Article. For Supplementary Material see instructions in item 3.1.n

3.3 Letters to the Editor

Relate or respond to recent published items in the journal. Discussions of political, social and ethical issues of interest to geneticists are also welcome in this form.

3.4 Review Articles

Review Articles are welcome.

3.5 Book Reviews

Publishers are invited to submit books on Genetics, Evolution and related disciplines, for review in the journal. Aspiring reviewers may propose writing a review.

3.6 History, Story and Memories

These are accounts on historical aspects of Genetics relating to Brazil.

4. Articles accepted for publication

Once an article is accepted, the Editorial Office will send it to copy editor for language and technical corrections. If major corrections were proposed, the manuscript with the highlighted corrections will be returned to the corresponding author for approval. The final version approved by the authors must be free of any text/correction markings when returned to the Editorial Office.

After typesetting, page proofs will be sent to the corresponding author. Changes made to page proofs, apart from typesetting errors, will be charged to the authors. Notes added in proof require Editorial approval.

Together with the proofs, a form of consent to publish and transfer of copyright is sent to the corresponding author, who will have sign this form, also on behalf of any co-authors, and send it by e-mail to the Editorial Office.

5. Availability of articles and deposition in databases

Article copies are provided as PDF-files. Authors may deposit these in their personal or institutional homepage, as well as in public databases.

6. Publication charge

There is a publication charge for manuscripts once they are accepted. For price information, exemptions and waiver policies, please consult the journal homepage <http://www.gmb.org.br>.

Gene/Protein Nomenclature Guidelines and Requirements for Genetics and Molecular Biology Authors:

1. General Guidelines

ALWAYS use approved gene/protein names and symbols in your paper (see below)

ALWAYS check out every single gene/protein name and symbol in your paper (even if you have seen it published previously and think you know what it is)

Sometimes the approved gene/protein name or symbol is no longer valid. In these cases, on first mention of the gene/protein, first use the approved designation and then add in parenthesis (previously known as xxx). Thereafter, use the correct symbol and not the previous designation.

2. Guidelines for Specific Species

Human/Non-human primates/Domestic species/and default for everything that is not a mouse, rat, fish, worm, or fly

Website for nomenclature rules and finding human gene (and mutant allele) symbols:

<http://www.genenames.org>

General rules:

Full gene names are not italicized and Greek symbols are NEVER used

eg: insulin-like growth factor 1

Gene symbols

Greek symbols are never used

hyphens are almost never used

gene symbols are italicized, all letters are in upper case

eg: IGF1 (in italics)

Proteins designations

same as the gene symbol, but not italicized and, depending on species, all in upper case, but at least first letter in upper case

eg: IGF1

mRNA and cDNA use the gene symbol and formatting conventions

eg: "... levels of IGF1 (in italics) mRNA increased when..."

Mouse/Rat/Chicken

Websites for nomenclature rules and finding gene (and mutant allele) symbols:

(mouse, rat, and chicken) <http://www.informatics.jax.org/>

(dedicated to rat) <http://rgd.mcw.edu/>

General nomenclature rules (applicable to mouse, rat, and chicken):

Full gene names are not in italics and Greek symbols are NEVER used

eg: insulin-like growth factor 1

Gene symbols

Greek symbols are never used

hyphens are almost never used

gene symbols are italicized, first letter upper case all the rest lower case

eg: Igf1 (italicized)

Proteins designations same as the gene symbol, but not italicized and all upper case

eg: IGF1 mRNA and cDNA use the gene symbol and formatting conventions

eg: "... levels of Igf1 (italicized) mRNA increased when..."

Mutant alleles should be defined when first mentioned

eg: Igf1^{tm1Arge}/Igf1^{tm1Arge} (italicized) is one of several knockout alleles of Igf1 (italicized)

All letters and numbers are italicized and the allelic designation (tm1Arge) is a superscript

After initial specification, the homozygous KO can be indicated as Igf1^{-/-} (all in italics and ^{-/-} as superscript); the heterozygote is Igf1^{+/-} etc.

For more details on these nomenclature conventions, see:

MGI Nomenclature page: <http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/index.shtml>

MGI Quick Guide for Genes:

http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/short_gene.shtml

Fish (use for all fish)

Website for nomenclature rules and gene (and mutant allele) symbols http://zfin.org/cgi-bin/webdriver?Mival=aa-ZDB_home.apg

General rules: Full gene names are italicized, all lower case, NEVER use Greek symbols. eg: cyclops (in italics)

Gene symbols are italicized, all lower case. eg: cyc (in italics)

Protein designations are the same as the gene symbol, but first letter only upper case and not italicized. eg: Cyc

Fly

Website for nomenclature rules and gene (and mutant allele) symbols <http://www.flybase.org>