

PATRÍCIA REGINA STRÖHER

**NOVOS MARCADORES MOLECULARES E FILOGEOGRAFIA
COMPARADA DE FORMIGAS (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) DO SUL
DA FLORESTA ATLÂNTICA**

CURITIBA

2013

PATRÍCIA REGINA STRÖHER

**NOVOS MARCADORES MOLECULARES E FILOGEOGRAFIA
COMPARADA DE FORMIGAS (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) DO SUL
DA FLORESTA ATLÂNTICA**

Dissertação apresentada à Coordenação do curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Marcio Roberto Pie

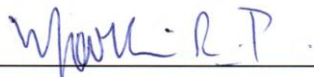
CURITIBA

2013

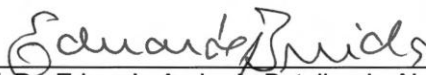
PATRÍCIA REGINA STHÖHER

**"NOVOS MARCADORES MOLECULARES E FILOGEOGRAFIA COMPARADA
DE FORMIGAS (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) DO SUL DA FLORESTA
ATLÂNTICA"**

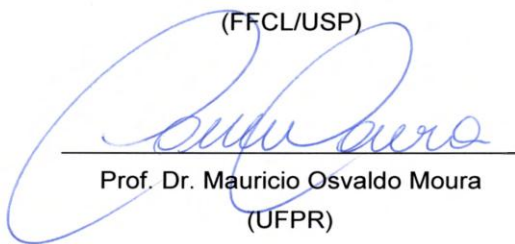
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de "Mestre em Ciências Biológicas", no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:



Prof. Dr. Márcio Roberto Pie (Orientador)
(UFPR)



Prof. Dr. Eduardo Andrade Botelho de Almeida
(FFCL/USP)



Prof. Dr. Mauricio Osvaldo Moura
(UFPR)

Curitiba, 28 de fevereiro de 2013.

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente a orientação do Prof. Marcio Roberto Pie. Obrigada pela paciência e por seu amplo e notório conhecimento que permitiram a realização desta dissertação.

Agradeço a todos os meus colegas de laboratório pelas conversas e discussões acadêmicas que muito contribuíram para minha formação. Muito obrigada em especial à Deborah Aline de Oliveira pelas contribuições no dia-a-dia no laboratório de biologia molecular, e ao Ricardo Belmonte Lopes e Carina Firkowski pelas contribuições nas análises e ao Rogério R. Silva pelo envio dos espécimes usados nesta dissertação.

A minha família deixo meus sentimentos de gratidão por sempre me incentivarem e torcerem por mim, torcerem pra que as PCRs funcionassem e para as “listrinhas” no gel aparecerem, mesmo não entendendo muito bem o que isto significava, mas sabiam que era importante para o meu trabalho e comemoravam junto comigo. Obrigada!

RESUMO

A Filogeografia é definida como o estudo da distribuição geográfica de linhagens genéticas dentro da mesma espécie ou de espécies próximas filogeneticamente. Esta característica permite investigar padrões de biogeografia histórica como migrações, colonizações e isolamento em refúgios, revelando também o passado evolutivo do ambiente onde as espécies estudadas estão inseridas. Neste trabalho duas espécies de formigas foram avaliadas filogeograficamente a fim de melhor entender o passado evolutivo do sul da Floresta Atlântica (um dos ambientes de maior biodiversidade e ameaçados mundialmente). Inicialmente foram desenvolvidos novos marcadores nucleares para formigas seguindo a abordagem EPIC- “*exon-primed intron-crossing*”, que utiliza primers em regiões exônicas conservadas que flanqueiem um íntron de interesse, o qual, por não ter um papel direto na transcrição gênica, tende a acumular mutações a uma taxa muito mais alta do que regiões codificantes. Estes marcadores foram testados em quatro espécies de formigas: *Gnamptogenys striatula*, *Hylomyrma reitteri*, *Brachymyrmex* sp. e *Pheidole incisa*. As duas primeiras espécies foram usadas no segundo trabalho, o filogeográfico, aliando ao DNA mitocondrial (citocromo b) um destes novos marcadores EPIC produzidos. Estimativas do tamanho populacional ao longo do tempo e reconstrução das árvores filogenéticas foram realizadas através de *Bayesian Skyline Plots* e Inferência Bayesiana, respectivamente. Os novos marcadores EPIC funcionaram com todas as espécies testadas neste trabalho. No estudo filogeográfico nenhuma estruturação geográfica, com linhagens distintas, foi encontrada em ambas as espécies. Padrões demográficos mostraram uma manutenção no tamanho populacional ao longo do tempo, também em ambas as espécies. Concluiu-se que esta estabilidade populacional vem ao encontro da hipótese de que áreas do sul da Floresta Atlântica mantiveram suas populações relativamente estáveis, mesmo durante períodos de instabilidade na última era glacial.

Palavras-chave: Filogeografia, EPIC, Floresta Atlântica.

ABSTRACT

The Phylogeography is defined as the study of the geographic distribution of genetic lineages within the same species or closely related species phylogenetically. This feature allows investigating patterns of historical biogeography as migration, colonization and isolation in refuges, revealing the evolutionary past of the environment where these species are living. In this study two species of ants were evaluated in their phylogeography for the better understand the evolutionary past of the southern Atlantic Rainforest (one of the most diverse and threat environments worldwide). Initially, new nuclear markers were developed for Formicidae using the EPIC "exon-intron-primed crossing" approach, which uses exonic primers in conserved regions that flank an intron of interest, which by not having a direct role in gene transcription, tends to accumulate mutations at a much higher rate than coding regions. These markers were tested in four ant species: *Gnamptogenys striatula*, *Hylomyrma reitteri*, *Brachymyrmex* sp. and *Pheidole incisa*. The first two species were used in the second study, the phylogeographical, combining the mitochondrial DNA (cytochrome b) with one of these new EPIC markers. Estimates of population size over time and reconstruction of phylogenetic trees were performed using Bayesian Skyline Plots and Bayesian Inference, respectively. The new markers EPIC worked with all species tested in this study. In the phylogeographical work, no geographic structure with distinct lineages is found in both species. Demographic patterns showed maintenance of population size through time in both species. It was concluded that this population stability is consistent with the hypothesis that southern Atlantic Forest kept their populations, even during periods of instability in the last ice age.

Key words: Phylogeography, EPIC, Atlantic Rainforest

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: Considerações sobre a Floresta Atlântica e sua Biogeografia.....	7
CAPÍTULO 2: Marcadores Moleculares Exon-Primed Intron-Crossing (EPIC) como uma Ferramenta para a Filogeografia de Formigas.....	26
CAPÍTULO 3: Filogeografia Comparada de Formigas (Hymenoptera: Formicidae) do Sul da Floresta Atlântica.....	39

CAPÍTULO 1

Considerações sobre a Floresta Atlântica e sua Biogeografia

CAPÍTULO 1

Consideradas como um dos ambientes mais ricos em biodiversidade, as florestas tropicais úmidas ocupam apenas 7% da superfície do planeta, mas abrigam mais de 50% das espécies dos ambientes terrestres (MYERS et al., 2000). Neste cenário é que se destaca a Floresta Atlântica como um dos *hotspots* de biodiversidade do mundo (MYERS et al., 2000). O termo *hotspot* é usado para designar uma área de altíssima diversidade de espécies endêmicas que estão perdendo rapidamente seu habitat e, portanto é considerada como prioritária em termos de conservação. A Floresta Atlântica compreende um conjunto de fitofisionomias vegetais que variam desde florestas ombrófilas densas até restingas e mangues em regiões costeiras, com uma extensão original que ocupa praticamente todo litoral brasileiro (IBGE, 1992). O número total de espécies da Floresta Atlântica é difícil de ser estimado, mas mamíferos, aves, répteis e anfíbios somam cerca de 1.809 espécies conhecidas, sendo 389 endêmicas (MMA, 2000). Além disso, estima-se que a floresta possua cerca de 20 mil espécies vegetais, representando 35% das espécies brasileiras. Neste ambiente o número de espécies ameaçadas de extinção chega a 510 (GALDINO-LEAL & CÂMARA, 2005), mas muitas espécies já foram ou serão extintas sem que tomemos conhecimento da sua existência. Há também na Floresta Atlântica um excepcional patrimônio genético que ainda está desconhecido e inexplorado (FRANKE et al., 2005). Explicações para esta vasta biodiversidade e altos níveis de endemismo na Floresta Atlântica incluem desde sua grande distribuição latitudinal, sua ampla variação em altitude (desde o nível do mar até 2.700m) (GALDINO-LEAL & CÂMARA, 2005), até fortes mudanças climáticas sofridas ao longo do tempo geológico que propiciaram a formação de múltiplos microhabitats e áreas de refúgio, aumentando a possibilidade de evolução e diversificação de espécies (ex. CARNAVAL et al., 2009).

Devido à sua localização geográfica, a Floresta Atlântica foi o primeiro ambiente a ser explorado durante a colonização europeia no Brasil. Os ciclos econômicos e a expansão humana seguinte comprometeram profundamente a integridade de seus ecossistemas. Atualmente 120 milhões de pessoas vivem em seu domínio, onde é gerado aproximadamente 70% do PIB brasileiro (MMA, acesso em

2012). Este longo histórico de exploração fez com que atualmente reste menos de 8% da extensão original da floresta, colocando-a como provavelmente o ecossistema mais devastado e ameaçado do planeta (GALDINO-LEAL & CÂMARA, 2005). Restam apenas 300 mil quilômetros quadrados altamente fragmentados dos mais de 1,1 milhão de km² originais do ambiente Floresta Atlântica e seus ecossistemas associados, os quais representavam 13% do território brasileiro (MMA, 2010).

Todos estes dados sobre a destruição da Floresta Atlântica nos mostram que há também um grande perigo à biodiversidade brasileira: a extinção de nossas espécies. A extinção é, infelizmente, um fato irreversível ao qual espécies das florestas tropicais, ao perderem seus habitats, estão mais suscetíveis. Estas espécies muitas vezes possuem estreitas e complexas interações ecológicas entre si, como certas plantas e seus polinizadores, predadores e suas presas. Assim, a extinção de uma espécie que possui interações de dependência com outras pode levar ao desaparecimento de várias outras com as quais ela interage (MYERS, 1987). Além das ameaças tradicionais, as recentes mudanças climáticas também chamam a atenção pelos seus possíveis efeitos em florestas tropicais. Em um recente trabalho estima-se que devido às mudanças climáticas de 600 a 900 espécies de aves sejam extintas até o ano de 2100, a maioria (89%) em ambientes tropicais (ŞEKERCIOĞLU, et al., 2012). Outro fato preocupante é apontado por LOARIE et al. (2009), onde estima-se que 92 % das atuais áreas de conservação serão inadequadas dentro de um século. Certamente estes fatores aumentam ainda mais a complexidade em se definir estratégias de conservação para as regiões tropicais, o que torna entender como estes ambientes reagiram às alterações climáticas no passado muito importante.

A grande biodiversidade da Floresta Atlântica, bem como das demais florestas neotropicais, gera um questionamento que há muito tempo vem intrigando os pesquisadores: como tal riqueza se originou e se sustenta? Com isso em mente desenvolveram-se modelos de especiação e diversificação destas florestas que tentam explicar esta grande diversidade e seus padrões de distribuição e endemismo. Um dos modelos amplamente utilizados é a Teoria dos Refúgios (HAFFER, 1969; VANZOLINI & WILLIAMS, 1970; VANZOLINI, 1992). Contudo, ao longo das últimas décadas, essa teoria foi substituída por uma tendência em se buscar a integração de diversos modelos se complementando historicamente, incluindo mudanças geológicas, climáticas

e vegetacionais com relações bastante complexas entre as áreas (SILVA, 2008). Falando especificadamente da Floresta Atlântica, existem hipóteses que tratam de suas relações biogeográficas com a Floresta Amazônica (BIGARELLA et al., 1975; OLIVEIRA-FILHO & RATTER, 1995). Há fortes evidências para a conectividade entre estes dois ambientes no passado, como a existência de 277 gêneros de plantas comuns à Floresta Atlântica e à Floresta Amazônica (RIZZINI, 1967), certos animais tipicamente amazônicos que vivem hoje nos remanescentes da Floresta Atlântica nordestina como o guariba-de-mãos-ruivas (*Alouatta belzebul*) e o tamanduá-i (*Cyclopes didactylus*) (GALDINO-LEAL & CÂMARA, 2005), além de um recente estudo com aves, que combina dados de distribuição e filogenias, apontando duas conexões espaço-temporais distintas entre Floresta Atlântica e Amazônica (BATALHA-FILHO et al., 2013). Finalmente, quando se leva em conta as relações históricas das subáreas da Floresta Atlântica, apesar de cada vez mais estudos serem realizados recentemente (ex. SILVA, 2008; D'HORTA, 2009) ainda existem discordâncias entre os resultados encontrados como entre CARNAVAL et al. (2009) e THOMÉ et al. (2010), mostrando que estudos mais abrangentes com um maior número de dados são necessários para o melhor entendimento destas relações, principalmente usando organismos que apresentem padrões de distribuição adequados ao longo da Floresta Atlântica.

Além dos esforços atuais por parte do governo e de organizações não governamentais para a preservação do que resta da Floresta Atlântica, é necessário para a delimitação de novas áreas de preservação, aliarmos dados taxonômicos, de distribuição das espécies e conhecimento de sua história evolutiva. Isto permitirá uma base mais robusta na tomada de decisão, levando em conta também fatores passados que contribuíram para a distribuição atual das espécies e que podem voltar a influenciar no futuro. Contar a história evolutiva de determinado ambiente ou de apenas uma espécie não é uma tarefa fácil. Porém, a biologia molecular nos trouxe uma nova ferramenta muito útil para o entendimento da distribuição atual de espécies: a Filogeografia. Este termo cunhado por AVISE e colaboradores em 1987 refere-se ao estudo dos princípios e processos que determinam a distribuição geográfica de linhagens genealógicas. A filogeografia tem o poder de investigar padrões de biogeografia histórica como migrações, colonizações e isolamento em refúgios (AVISE, 2000), o que a torna muito oportuna para estudos de diversificação nas florestas neotropicais. No entanto, este

potencial ainda não foi bem explorado, pois ainda são poucos os trabalhos filogeográficos na região neotropical em comparação com o restante do mundo (MARTINS & DOMINGUES, 2011).

Biogeografia- Filogeografia

Biogeografia é o estudo da distribuição geográfica dos seres vivos tanto no passado quanto no presente (BROWN & LOMOLINO, 2006). No entanto, esta aparente simplicidade esconde uma ciência complexa que envolve geologia, geografia e biologia (CRISCI, et al., 2003). O interesse pela biogeografia remonta à Grécia Antiga, no entanto, foi somente a partir do século XVIII, com a viagem de naturalistas por grande parte do mundo, que o conhecimento a respeito da distribuição dos organismos ganhou maior estímulo. Ainda em um tempo dominado pelo pensamento criacionista, vários cientistas entre o final do século XVIII e início do século XIX, contribuíram significativamente para a identificação dos problemas biogeográficos, entre eles vale ressaltar: Carolus Linnaeus, Comte de Buffon, Joseph Banks, Johann Reinhold Forster, Karl Willdenow, Alexander Von Humboldt e Augustin P. de Candolle. No entanto algumas das maiores contribuições à Biogeografia no século XIX podem ser creditadas aos naturalistas britânicos Charles Darwin e Alfred Russel Wallace. A ideia de seleção natural, evolução das espécies e dispersão abalaram a longa visão estática da Biogeografia. Também no século XIX, destacaram-se as contribuições de Joseph Dalton Hooker (importância de mudanças climáticas e estudos insulares) e Philip Lutley Sclater (regiões biogeográficas continentais) (BROWN & LOMOLINO, 2006). Foi justamente nesta época que se iniciou uma divisão da biogeografia: 1) a biogeografia histórica, que lida com eventos ocorridos no passado e 2) a biogeografia ecológica, que trata da influência dos fatores atuais. Hoje, esta divisão é vista como artificial e redundante, uma vez que as duas visões devem ser vistas como complementares e não divergentes (EBACH & GOUJET, 2003).

A proposta de Wegener sobre a tectônica de placas no início do século XX e o desenvolvimento de novas abordagens filogenéticas por HENNIG em 1966 podem ser citados como marcos importantes da biogeografia no século XX que deram novas fases à biogeografia histórica. A Sistemática Filogenética criada por HENNIG, e que mais tarde seria chamada de Cladística, teve um grande efeito na sistemática e na

biogeografia com a ideia de delimitar grupos monofiléticos (grupos com todos os descendentes de um ancestral comum) usando apenas caracteres derivados (apomorfias) (FUNK, 2004). Durante a década de 50 e 60 temos a exposição da Panbiogeografia por Leon Croizat e mais tarde da Biogeografia de Vicariância por Platnick e Nelson (COLACINO, 1997). Em 1973 foi publicado o primeiro volume do *Journal of Biogeography*, o primeiro periódico dedicado exclusivamente à Biogeografia (BROWN & LOMOLINO, 2006). Enquanto estas novas fundamentações teóricas em Biogeografia eram propostas e consolidadas outra revolução estava a caminho: a biologia molecular. Após a descoberta das enzimas de restrição (Linn & Arber, 1968; Meselson & Yuan, 1968) e posteriormente com o desenvolvimento da reação em cadeia da polimerase (Mullis, 1985), que permite encontrar e amplificar fragmentos específicos de DNA, a biologia comparada foi nutrida de novos acervos de caracteres e novos métodos capazes de interpretá-los em uma perspectiva evolutiva (D'HORTA, 2009). E assim em meio a esta revolução molecular surge este recente ramo da biogeografia, a filogeografia, que teve seu termo proposto por Avise e colaboradores em 1987 e que pode ser definido como “o campo de estudo que lida com os princípios e os processos que governam a distribuição geográfica de linhagens genéticas, especialmente aquelas dentro e entre espécies proximamente relacionadas” (AVISE, 2000).

O marcador molecular mais utilizado na filogeografia é o DNA mitocondrial (DNAm) (AVISE, 2000). Isto se deve ao fato de algumas vantagens que o material genético desta organela possui: mesmo variável, está espalhada em uma variedade de organismos, permitindo comparações até em grupos distantes filogeneticamente; é de fácil isolamento e amplificação; não apresenta regiões repetitivas; não apresenta recombinação nem rearranjos genéticos; devido a sua herança exclusivamente materna e conseqüente menor tamanho efetivo, quando comparado a marcadores nucleares revela uma história relativamente mais recente das espécies (SHIRAI, 2008). No entanto estudos com répteis (GODINHO et al. 2006) e com morcegos (WORTHINGTON et al. 1994, 1999, CASTELLA et al. 2001) mostraram que analisar apenas um gene pode levar a erros, pois a árvore do gene pode ter sido inferida corretamente sem, no entanto, corresponder à árvore da espécie (PAMILO & NEI, 1988). Apesar desta “superioridade” do DNAm, é importante que os estudos aliem tanto dados de DNAm como de genes nucleares, pois o uso apenas de DNAm pode levar a inferências errôneas. Como

exemplo podemos citar o trabalho de Alves et al. (2003), com lebres europeias, em que os resultados obtidos com genes nucleares e mitocondriais foram contraditórios e a explicação dos autores para o fato foi uma introgressão quando as glaciações ocorreram na Europa, fazendo com que espécies que ocupam a Europa Central migrassem para um refúgio na Península Ibérica. Se apenas DNAmT tivesse sido usado neste estudo, conclusões errôneas teriam sido feitas a respeito da relação filogenética daquelas espécies (MARTINS, 2008). O estudo de amplas regiões do genoma abre a possibilidade de inferências mais confiáveis a cerca da história evolutiva, reduzindo o risco de se perder um evento ou processo devido à falta de uma mutação adequada no tempo e espaço em uma sequência de DNA em particular (TEMPLETON, 2004).

Como vimos, a Biogeografia passou por grandes transformações ao longo do tempo, novas teorias foram aceitas, enquanto outras foram suplantadas. Hoje contamos com tecnologias como os sistemas geográficos de informação que nos dão as localizações precisas dos espécimes e análises de DNA com relógios moleculares que fornecem datações cada vez mais precisas quanto ao tempo de divergência entre as linhagens, além de outras tecnologias e conhecimentos que não estavam disponíveis aos antigos biogeógrafos. No entanto, mesmo como todas estas revoluções a sua grande pergunta até hoje ainda é a mesma: “por que os organismos estão distribuídos como eles estão atualmente?”.

Biogeografia- Filogeografia da Floresta Atlântica

A alta diversidade de espécies dos trópicos e em especial das Américas sempre despertou a atenção da biogeografia. A Região Neotropical caracteriza-se por um mosaico formado por extensas áreas de florestas separadas por formações abertas (D’HORTA, 2009). Várias hipóteses biogeográficas não excludentes tentam explicar como surgiu e se organiza tamanha diversidade, dentre elas destacam-se: Teoria dos Refúgios (HAFFER, 1969; VANZOLINI & WILLIAMS, 1970; VANZOLINI, 1992); Hipótese dos Rios (WALLACE, 1852; SICK, 1967; AYRES & CLUTTON-BROCK, 1992); Hipótese de Gradientes Ecológicos (ENDLER, 1977; SMITH et al., 1997); Hipótese Distúrbio-Vicariância (COLINVAUX, 1998); Hipótese dos Museus (FJELDSA, 1999); hipóteses paleogeográficas (em que HAFFER & PRANCE, 2001 agrupam Hipótese de “Ilhas”, NORES, 1999; Hipótese Rios-Refúgios, AYRES &

CLUTTON-BROK 1992; Hipótese da Laguna, MARROIG & CERQUEIRA, 1997 e; Hipótese dos Arcos, PATTON et al., 2000). Com o acúmulo de informações e de novos métodos analíticos pode-se desenvolver trabalhos voltados à análise de hipóteses biogeográficas a partir da descrição de suas predições, seguida de testes de suas predições (MORITZ et al., 2000). Mesmo assim, a maioria dos estudos e teorias em diversificação na região neotropical concentra-se e baseiam-se na Floresta Amazônica, enquanto a Floresta Atlântica, mesmo sendo a segunda maior formação florestal da região Neotropical, até recentemente tinha recebido pouca atenção quanto à sua história biogeográfica (D'HORTA, 2009).

Apesar de o nome 'Floresta Atlântica' sugerir uma unidade homogênea, este ambiente possui uma grande diversidade ao longo de sua distribuição geográfica, destacando-se várias subunidades com identidade própria. O padrão atual de distribuição e variação que as espécies animais exibem ao longo da Floresta Atlântica é determinado por vários fatores históricos e ecológicos que propõem uma história biogeográfica bastante complexa, agregando fluxos passados entre esta e outras regiões florestais neotropicais e processos de diferenciação ao longo da mesma (D'HORTA, 2009). Várias evidências indicam que esta floresta, mesmo atualmente isolada das demais florestas sul-americanas em vários momentos do passado, possuía conexões com outras formações florestais (AULER & SMART, 2001; AULER et al., 2004, BIGARELLA et al., 1975, LEDRU, 1993; LEDRU et al., 1996; PRADO & GIBBS, 1993), em particular com a floresta amazônica (BIGARELLA et al., 1975; GALDINO-LEAL & CÂMARA, 2005; BATALHA-FILHO et al., 2013). Com a sobreposição de eventos de diversificação ao longo da Floresta Atlântica e alterações climáticas que determinaram os ciclos de isolamento e contato entre este e outros ambientes florestais, temos como resultado um padrão complexo de relações filogenéticas e biogeográficas a ser desvendado. Estes mesmos eventos de transformação da paisagem atuaram não só provendo o isolamento e a conexão entre a Floresta Atlântica e outros ecossistemas florestais, mas também nos processos de diversificação criando cenários para que processos como vicariância e dispersão ocorressem (D'HORTA, 2009).

Dentre todas as hipóteses biogeográficas que se aplicam à Floresta Atlântica, a Teoria dos Refúgios merece uma atenção especial devido às suas implicações e controvérsias geradas desde que foi proposta. Esta hipótese, sugerida por Haffer (1969)

e Vanzolini & Williams (1970), para a diversificação biológica da Floresta Amazônica durante o Pleistoceno, diz que períodos secos e frios coincidentes com as glaciações foram concomitantes com o retrocesso das florestas até remanescentes isolados (paleorefúgios) por áreas abertas. Nos paleorefúgios, organismos isolados por tempo suficiente teriam divergido até a formação de novas espécies (especiação alopátrica). Mas muitos autores afirmam que a expansão de áreas abertas e formação de paleorefúgios florestais não ocorreram (BUSH, 1994; COLINVAUX & DE OLIVEIRA, 2000; COLINVAUX et al., 2000). No entanto, para a Floresta Atlântica, há trabalhos de palinologia (BEHLING & LICHTER, 1997; BEHLING & NEGRELLE 2001; LEDRU et al. 1998) e de outras áreas (CARNAVAL & MORITZ, 2008) que sugerem que grandes áreas abertas teriam substituído parte das florestas no pico da última era glacial, entre 25.000 - 18.000 anos atrás (CABANNE, 2009). A teoria dos refúgios é um modelo de especiação, mas, segundo alguns estudos, a diversificação entre espécies seria mais antiga que o Pleistoceno e os refúgios só teriam afetado a estrutura genética no nível de populações (PATTON & SILVA, 2005; SCHNEIDER & MORITZ, 1999).

Estudos com répteis (VANZOLINI, 1988), aves (BATES et al., 1998) e mamíferos (COSTA et al., 2000) mostraram que há uma quebra latitudinal na distribuição de vertebrados na Floresta Atlântica, e que há uma relação entre grupos irmãos oriundos do norte e do sul da floresta. Percebe-se que, na Floresta Atlântica, o modelo de distribuição temporal e espacial das florestas é muito dinâmico. Dados de CABANNE (2009) indicam que o norte e o sul desta floresta seriam locais mais instáveis, devido à influência de mudanças climáticas locais e globais. Esta descrição é reforçada por dados de palinologia (ex. BEHLING, 2002), por modelos alcançados para a simulação de cobertura florestal de CARNAVAL & MORITZ (2008) e pelo estudo de CARNAVAL et al. (2009) com sapos, que evidencia a retração da Floresta Atlântica durante o Pleistoceno e a formação de um grande refúgio climático para as espécies neotropicais na Floresta Atlântica central. No entanto, um estudo publicado também com sapos logo após o artigo de CARNAVAL et al., 2009 por THOMÉ et al., 2010 chegam a conclusões divergentes, refutando a colonização do sul da Floresta Atlântica por um refúgio ao norte durante o Holoceno como foi proposto por CARNAVAL et al.(2009). Na verdade, devido ao recente interesse sobre a história

evolutiva e diversificação da Floresta Atlântica em comparação com outros ambientes, ainda são poucos os estudos para que se tenha uma visão mais abrangente e segura de como estes processos ocorreram e como estes influenciaram de forma distinta ou similar os diferentes grupos de organismos. Uma boa alternativa seria um estudo que se concentrasse na região sul da Floresta Atlântica, permitindo entender se há algum tipo de estruturação nessas populações. Segundo a hipótese de CARNAVAL et al. (2009), não esperaríamos encontrar nenhum tipo de separação genética para esta região. Mas, caso tenha ocorrido um refúgio mais ao sul, esperaríamos a formação de linhagens distintas das populações do sudeste e registros de expansão populacional quando da re-colonização. Por outro lado, seguindo o que foi sugerido por THOMÉ et al. (2010), caso o sul tenha mantido áreas estáveis, não esperaríamos encontrar registros de expansão, independentemente da separação de linhagens.

Estudos filogeográficos já realizados com Formicidae em outros ambientes, trouxeram resultados promissores na elucidação da história evolutiva destes locais, como o trabalho de AHRENS et al. (2005) com *Solenopsis invicta* em toda sua área nativa (América do Sul), o estudo de PUSCH et al. (2006) com duas espécies do gênero *Temnothorax*, que sugere que as mesmas evoluíram de uma espécie ancestral, em diferentes refúgios glaciais, e re-emigraram para a Europa Central após a última era glacial. Um estudo usando a espécie *Formica exsecta* em toda a Eurásia (GOROPASHNAYA et al., 2007) que também usa os refúgios glaciais para explicar a distribuição genética e re-colonização posterior re-colonização destas áreas. Devido ao seu grande potencial como espécie invasora, a espécie *Wasmannia auropunctata*, foi avaliada filogeograficamente em um estudo de MIKHEYEV & MUELLER (2007) em que foram comparados espécimes nativos (América Central) e invasores espalhados pelo mundo. Outro trabalho de 2007 realizado por QUEK et al. em florestas tropicais da Ásia que usou filogeografia de formigas foi capaz de reconstruir o tempo de diversificação e expansão das espécies, além de indicar áreas que podem ter sido refúgios ou centro de diversificação para as formigas naquele ambiente. É preciso também destacar o trabalho de SOLOMON et al. (2008) com o gênero *Atta* na Floresta Amazônica que permitiu inferências não apenas para a história evolutiva das formigas, mas também sobre o ambiente em questão evidenciando a importância das mudanças climáticas do Pleistoceno e de incursões marinhas no Mioceno.

Como se vê, a maioria dos trabalhos Filogeográficos com formigas restringem-se a poucas espécies. Os táxons da América do Sul, e em especial, da Floresta Atlântica, ainda carecem deste tipo de estudo. Também se faz necessário uma análise abrangente da evolução da Floresta Atlântica, para entender a distribuição atual de suas populações e como elas comportaram-se geograficamente a mudanças climáticas passadas. Isto permitirá uma melhor escolha de novas áreas de conservação, além de permitir uma melhor elucidação com relação a resultados divergentes encontrados na literatura.

REFERÊNCIAS

- AHRENS, M.E.; ROSS, K.G.; SHOEMAKER, D.D. 2005. **Phylogeographic structure of the fire ant *Solenopsis invicta* in its native South American range: roles of natural barriers and habitat connectivity.** *Evolution* 59:1733–1743.
- ALVES, P.C.; FERRAND, N.; SUCHENTRUNK, F.; HARRIS, D.J. 2003. **Ancient introgression of *Lepus timidus* mtDNA into *L. granatensis* and *L. europaeus* in the Iberian Peninsula.** *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 27: 70–80.
- AULER, A. S.; SMART, P.L. 2001. **Late Quaternary paleoclimate in semiarid Northeastern Brazil from U-series dating of travertine and water-table speleothems.** *Quaternary Research*, 55 (2): 159-167.
- AULER, A. S.; WANG, X.; EDWARDS, R. L.; CHENG, H.; CRISTALLI, P. S.; SMART, P. L.; RICHARDS, D. A. 2004. **Quaternary ecological and geomorphic changes associated with rainfall events in presently semi-arid Northeastern Brazil.** *Journal of Quaternary Science*, 19: 693-701.
- AVISE, J. C. 2000. **Phylogeography. The history and formation of species.** Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 447 pp.
- AVISE, J. C.; BALL, J.M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T. 1987. **Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics.** *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 18:489–522.
- AYRES, J. M.; CLUTTON-BROCK, T.H. 1992. **River boundaries and species range size in Amazonian primates.** *American Naturalist*, 14: 531-537.
- BATALHA-FILHO, H.; FJELDSA, J.; FABRE, P.; MIYAK, C.Y. 2013. **Connections between the Atlantic and the Amazonian forest avifaunas represent distinct historical events.** *Journal of Ornithology* 154 (1): 41-50.
- BATES, J.M.; HACKETT, S.J.; CRACRAFT, J. 1998. **Area-relationships in the Neotropical lowlands: an hypothesis based on raw distributions of passerine birds.** *Journal of Biogeography*, 25: 783–793.
- BEHLING, H. 2002. **South and southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: a synthesis.** *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 177: 19-27.

BEHLING, H.; LICHTER, M. 1997. **Evidence of dry and cold climatic conditions at glacial times in tropical southeastern Brazil.** Quaternary Research, 48:348-358.

BEHLING, H.; NEGRELLE, R. R. B. 2001. **Tropical Rain Forest and climate dynamics of the Atlantic lowland, Southern Brazil, during the Late Quaternary.** Quaternary Research, 56:383-389.

BIGARELLA, J. J.; ANDRADE LIMA, D.; RIEHS, P. J. 1975. **Considerações a respeito das mudanças paleoambientais na distribuição de algumas espécies vegetais e animais no Brasil.** Anais da Academia Brasileira de Ciências, São Paulo, v. 47, p. 411-464.

BROWN, J.H.; LOMOLINO, M.V. 2006. **Biogeografia.** 2ªed. Funpec, Ribeirão Preto, 691p.

BUSH, M.B. 1994. **Amazonian speciation: a necessarily complex model.** Journal of Biogeography, 21:5-17.

CABANNE, G. S. 2009. **Padrões de distribuição geográfica de linhagens intra-específicas e processos demográficos históricos em aves da floresta atlântica.** Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo. Recuperado em 2012-11-22, de <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41131/tde-22052009-111755/>.

CARNAVAL, A.C.; MORITZ, C. 2008. **Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest.** Journal of Biogeography, 35:1187–1201.

CARNAVAL, A.C.; HICKERSON, M.J.; HADDAD, C.F.B.; RODRIGUES, M.T.; MORITZ, C. 2009. **Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot.** Science, 323: 785-789.

CARVALHO, C.J.B. 2004. **Ferramentas atuais da biogeografia histórica para utilização em conservação.** Em Unidades de Conservação: Atualidades e tendências. Milano, M.S; Takahashi, L.Y.; Nunes, M.L. (eds.). Fundação O Boticário de Proteção a Natureza, Curitiba, p. 92-103.

COSTA, L.P.; LEITE, Y.L.R.; FONSECA, G.A.B. & FONSECA, M.T. 2000. **Biogeography of South American forest mammals: endemism and diversity in the Atlantic Forest.** Biotropica, 32: 872–881.

- CASTELLA, V.; RUEDI, M.; EXCOFFIER, L. 2001. **Contrasted patterns of mitochondrial and nuclear structure among nursery colonies of the bat *Myotis myotis***. *Journal of Evolutionary Biology*, 14(5): 708-720.
- COLACINO, C. 1997. **Léon Croizat's Biogeography and Macroevolution, or... "Out of Nothing, Nothing Comes"**. *Philippines Scientist*, 34:73-88.
- COLINVAUX, P. A. 1998. **"A new vicariance model for Amazonian endemics"**. *Global Ecology and Biogeography Letters*, 7,p. 95-96.
- COLINVAUX, P.A.; DE OLIVEIRA, P. E. 2000. **Palaeoecology and climate of the Amazon basin during the last glacial cycle**. *Journal of Quaternary Science*, 15: 347-56.
- COLINVAUX, P. A.; DE OLIVEIRA, P. E.; BUSH, M.B. 2000. **Amazonian and Neotropical plant communities on glacial time scales: The failure of the aridity and refuge hypotheses**. *Quaternary Science Reviews*, 19:141-69.
- CRISCI, J.V.; KATINAS, L.; POSADAS, P. 2003. **Historical Biogeography: An introduction**. Harvard University Press, Cambridge, MA 250p.
- D'HORTA, F. M. 2009. **Filogenia molecular e filogeografia de espécies de passeriformes (Aves): história biogeográfica da região neotropical com ênfase na Floresta Atlântica**. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo. Recuperado em 2012-11-22, de <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41131/tde-21052009-142032/>.
- EBACH, M.C.; GOUJET, D.F. 2006. **The first biogeographical map**. *Journal of Biogeography*, 33: 761-769.
- ENDLER, J. A. 1977. **Geographic variation, speciation, and clines**. Princeton, NJ: Princeton University Press, 246p.
- FJELDSÅ, J.; LAMBIN, E.; MERTENS, B. 1999. **Correlation between endemism and local ecoclimatic stability documented by comparing Andean bird distributions and remotely sensed land surface data**. *Ecography*, 22:63-78.
- FRANKE, C. R.; ROCHA, P. L. B.; KLEIN, W.; GOMES, S. L. 2005. **Mata Atlântica e biodiversidade**. Salvador, Edufba, 461p.

FUNK, V.A. 2004. **Revolutions in historical biogeography**. Em: Lomolino, M.V.; Sax, D.F.; Brown, J.H (eds.). *Foundations of biogeography: classic papers with commentaries*. University of Chicago Press, Chicago and London, p. 647-657.

GALDINO-LEAL, C.; CÂMARA, I.G. (eds) 2005. **Mata Atlântica Biodiversidade, Ameaças e Perspectivas**. Título original: *The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats, and Outlook*. Belo Horizonte: Conservação Internacional e Fundação SOS Mata Atlântica.

GODINHO, R.; MENDONÇA, B.; CRESPO, E. G.; FERRAND, N. 2006. **Genealogy of the nuclear β -fibrinogen locus in a highly structured lizard species: comparison with mtDNA and evidence for intragenic recombination in the hybrid zone**. *Heredity* 9: 454–463.

GOROPASHNAYA, A. V.; FEDOROV, V. B.; SEIFERT, B.; PAMILO, P. 2007. **Phylogeography and population structure in the ant *Formica exsecta* (Hymenoptera, Formicidae) across Eurasia as reflected by mitochondrial DNA variation and microsatellites**. *Annales Zoologici Fennici*, 44: 462-474.

HAFFER, J. 1969. **Speciation in amazonian forest birds**. *Science*, Washington, 165: 131-137.

HAFFER, J.; Prance, G.T. 2001. **Climate forcing of evolution in Amazonia during the Cenozoic: on the refuge theory of biotic differentiation**. *Amazoniana* 16:579–607.

HENNIG, W. 1966. **Phylogenetic Systematics**. University of Illinois Press, Urbana.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 1992. **Manual Técnico da Vegetação Brasileira**. Número 1. Rio de Janeiro.

LEDRU, M.P. 1993. **Late Quaternary environmental and climatic changes in Central Brazil**. *Quaternary Research*, 39:90-98.

LEDRU, M.P.; BRAGA, P.I.S; SOUBIÈS, F.; MARTIN, L.; SUGUIO, K.; TURCQ, B. 1996. **The Last 50.000 years in the neotropics (Southern Brazil): evolution of vegetation and climate**. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 123: 239-257.

LEDRU, M.P.; SALGADO-LABOURIAU, M.L. & LORSCHREITER, M.L. 1998. **Vegetation dynamics in southern and central Brazil during the last 10.000 yr B.P.** *Review of Palaeobotany and Palynology* 99:131-142.

LINN, S.; ARBER, W. 1968. **Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*, X. In vitro restriction of phage fd replicative form.** Proceedings of the National Academy of Sciences 59(4):1300–1306.

LOARIE, S.R.; DUFFY, P.B.; HAMILTON, H.; ASNER, G.P.; FIELD, C.B.; ACKERLY, D.D. 2009. **The velocity of climate change.** Nature 462: 1052–1055.

MARROIG, G.; R. CERQUEIRA. 1997. **Plio-Pleistocene South American history and the Amazon Lagoon hypothesis: a piece in the puzzle of Amazonian diversification.** Journal of Computational Biology, 2:103-19.

MARTINS, F. M. 2008. **Filogeografia intraespecífica do morcego hematófago *Desmodus rotundus* (Chiroptera, Phyllostomidae).** Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo. Recuperado em 2012-11-22, de <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41131/tde-05092008-114747/>.

MARTINS, F.M.; DOMINGUES, M.V. 2011. **Filogeografia.** Em CARVALHO, C.J.B.; ALMEIDA, E.A.B. (Eds). Biogeografia da América do Sul: Padrões e Processos. São Paulo: Editora Roca.

MESELSON, M.; YUAN, R. 1968. **DNA restriction enzyme from *Escherichia coli*.** Nature, 217(5134):1110–1114.

MIKHEYEV, A. S.; U. G. MUELLER. 2007. **Genetic relationships between native and introduced populations of the little fire ant *Wasmannia auropunctata*.** Diversity and Distributions 13:573–579.

MMA, 2000. **Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos.** Brasília.

MMA, 2010. **Florestas do Brasil em Resumo.** Serviço Florestal Brasileiro. Brasília

MMA. 2012. Ministério do Meio Ambiente. **Mata Atlântica.** Sítio:<http://www.mma.gov.br/sitio/index.php?ido=conteudo.monta&idEstrutura=232&idConteudo=9855>. Acessado em 08 de outubro de 2012.

MORITZ, C.; PATTON, J.L.; SCHNEIDER, C.J.; SMITH, T.B. 2000. **Diversification of rainforest faunas: an integrated molecular approach.** Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 31:533-563.

- MULLIS, K.; FALOONA, F. 1987. **Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction.** *Methods in Enzymology*, 55: 335-350.
- MYERS, N. 1987. **The Extinction Spasm Impending: Synergisms at Work.** *Conservation Biology*, 1: 14–21.
- MYERS, N., R. A.; MITTERMEIER, C. G.; MITTERMEIER, G. A.B.F.; J. Kent. 2000. **Biodiversity hotspots for conservation priorities.** *Nature* 403: 853–858.
- NORES, M. 1999. **An alternative hypothesis for the origin of Amazonian bird diversity.** *Journal of Biogeography*, 26: 475–485.
- OLIVEIRA FILHO, A.T.; RATTER, J.A. 1995. **A study of the origin of central Brazilian forests by the analysis of plant species distribution patterns.** *Edinburgh Journal of Botany* 52: 141-194.
- OLIVEIRA, L.O. 2009. **História evolutiva das florestas estacionais semi-decíduais por meio da filogeografia molecular de *Cedrela fissilis* e de *Anadenanthera*.** Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG.
- PAMILO, P.; NEI, M. 1988. **Relationships between gene trees and species trees.** *Molecular Biology and Evolution* 5 (5): 568-583.
- PATTON, J. L.; SILVA, M. N. F.; MALCOLM, J. R. 2000. **Mammals of the Rio Juruá and the evolutionary and ecological diversification of Amazonia.** *Bulletin of the American Museum of Natural History* 244:1-306.
- PATTON, J.L; SILVA, M.N.F. 2005. **The history of amazonian mammals: mechanisms and timing of diversification.** Em: Bermingham, E.; Dick, C.W.; Moritz, C. (eds.). *Tropical Rainforests. Past, Present and Future.* University of Chicago Press, Chicago, pp. 107–126.
- PLATNICK, N.I; NELSON, G. 1978. **A method of analysis for historical biogeography.** *Systematic Biology*, 27(1): 1-16.
- PRADO, D.; GIBBS, P.E. 1993. **Patterns of species distributions in the dry seasonal forests of South America.** *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 80:902-927.
- PUSCH, K.; B. SEIFERT; FOITZIK, S.; HEINZE, J. 2006. **Distribution and genetic divergence of two parapatric sibling ant species in Central Europe.** *Biological Journal of the Linnean Society*, 88:223–234.

QUEK, S.P.; DAVIES, S.J.; ASHTON, P.S.; ITINO, T.; PIERCE, N.E. 2007. **The geography of diversification in mutualistic ants: a gene's-eye view into the Neogene history of Sundaland rain forests.** *Molecular Ecology*, 16:2045–2062.

RIZZINI, C. T. 1967. **Delimitação, caracterização e relações da flora silvestre hiléiana.** Atas do Simpósio sobre a Biota Amazônica. *Biota Amazônica Vol. 4 Botânica*: 13–36.

ŞEKERCIOĞLU, C. H.; PRIMACK, R. B.; WORMWORTH, J. 2012. **The effects of climate change on tropical birds.** *Biological Conservation*, 148 (1): 1-18

SCHNEIDER, C.J.; MORITZ, C. 1999. **Rainforest refugia and evolution in Australia's Wet Tropics.** *Proceedings of the Royal Society of London*, 266:191-196.

SHIRAI, L. T. 2008. **Filogeografia e biogeografia da Floresta Atlântica: um estudo de caso com *Didelphis aurita*.** Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo. Recuperado em 2012-11-22, de <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41131/tde-18032009-183544/>.

SICK, H. 1967. **Rios e enchentes na Amazônia como obstáculo para a avifauna.** Atas do Simpósio sobre a Biota Amazônica 5 *Zoologia*:495-520.

SIGRIST, M. S.; CARVALHO, C.J.B. 2008. **Detection of areas of endemism on two spatial scales using Parsimony Analysis of Endemicity (PAE): the Neotropical region and the Atlantic Forest.** *Biota Neotropica (Ed. Portuguesa)*, 8:33-42.

SILVA, M. B. 2008. **Biogeografia de opiliões Gonyleptidae na Mata Atlântica, com revisão sistemática de Hernandariinae (Arachnida, Opiliones).** Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo. Recuperado em 2012-11-22, de <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41133/tde-29052008-145445/>.

SMITH, T.B.; WAYNE, R.K.; GIRMAN, D.J.; BRUFFORD, M.W. 1997. **A role for ecotones in generating rainforest biodiversity.** *Science*, 276: 1855-187.

SOLOMON, S.E.; BACCI, M. JR.; MARTINS, J. JR.; VINHA, G.G.; MUELLER, U.G. 2008. **Paleodistributions and comparative molecular phylogeography of leafcutter ants (*Atta* spp.) provide new insight into the origins of Amazonian diversity.** *PLoS ONE* 3(7): e2738.

TEMPLETON, A.R. 2004. **Using Haplotype Trees for Phylogeographic and Species Inference in Fish Populations.** *Environmental Biology of Fishes*, 69:7-20.

THOMÉ, M.T.C.; ZAMUDIO, K.R.; GIOVANELLI, J.G.R.; HADDAD, C.F.B.; BALDISSERA F.A.; JR ALEXANDRINO, J. 2010. **Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest**. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55:1018–1031.

VANZOLINI, P.E. 1988. **Distributional patterns of South American Lizards**. In **Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns**. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, p.317-342.

VANZOLINI, P. E. 1992 **Paleoclimas e especiação em animais da América do Sul tropical**. *Estudos Avançados*, 6 (15):41-65.

VANZOLINI, P. E.; WILLIAMS, E.E. 1970. **South American anoles: the geographic differentiation and evolution of the *Anolis chrysolepis* species group (Sauria, Iguanidae)**. *Arquivos de Zoologia do Estado de São Paulo*, 19: 1-298.

WALLACE, A.R. 1852. **On the Monkeys of the Amazon**. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 20: 107-110.

WEGENER, A. **The origin of continents and oceans**. New York: Dutton, 1924. 212p.

WORTHINGTON-WILMER, J.; HALL, L.; BARRATT, E.; MORITZ, C. 1999. **Genetic structure and male-mediated gene flow in the Ghost Bat (*Macroderma gigas*)**. *Evolution* 53: 1582-1591.

WORTHINGTON-WILMER, J.; MORITZ, C.; HALL, L.; TOOP, J. 1994. **Extreme population structuring in the threatened ghost bat, *Macroderma gigas*: evidence from mitochondrial DNA**. *Proceedings of the Royal Society of London Biological Sciences* 257: 193-198.

CAPÍTULO 2

Marcadores moleculares exon-primed intron-crossing (EPIC) como uma ferramenta para a filogeografia de formigas

RESUMO

Marcadores moleculares exon-primed intron-crossing (EPIC) como uma ferramenta para a filogeografia de formigas

Com uma distribuição mundial, diversidade de adaptações e abundância local, as formigas são um exemplo clássico de radiação adaptativa. Apesar desta importância evolutiva e ecológica, estudos filogeográficos com formigas, na grande maioria dos casos, usam exclusivamente marcadores mitocondriais. Neste estudo desenvolvemos e testamos marcadores exon-primed intron-crossing (EPIC) que podem ser largamente usados para revelar a variação intraespecífica em formigas. Marcadores candidatos foram obtidos através da varredura de genomas de espécies de formigas já disponíveis, na busca por regiões exônicas conservadas intercaladas com íntrons. Um subconjunto de 15 marcadores foi testado *in vitro* com sucesso de amplificação em várias espécies de formigas filogeneticamente distantes. Estes marcadores representam um importante passo para a filogeografia de formigas e genética de populações, permitindo abranger a variação do DNA nuclear sem a necessidade de desenvolver marcadores espécie-específicos.

Palavras-chave: genética de populações, marcadores moleculares, Formicidae, filogenia.

ABSTRACT

Exon-primed intron-crossing (EPIC) makers as a tool for ant phylogeography

Due to their local abundance, diversity of adaptations and worldwide distribution, ants are a classic example of adaptive radiation. Despite this evolutionary and ecological importance, phylogeographical studies on ants have relied largely on mitochondrial markers. In this study we design and test exon-primed intron-crossing (EPIC) markers that can be widely used to uncover ant intraspecific variation. Candidate markers were obtained through screening the available ant genomes for unlinked conserved exonic regions interspersed with introns. A subset of 15 markers was tested *in vitro* and showed successful amplification in several phylogenetically distant ant species. These markers represent an important step forward in ant phylogeography and population genetics, allowing for more extensive characterization of variation in ant nuclear DNA without the need to develop species-specific markers.

Keywords: population genetics, molecular markers, Formicidae, phylogeny.

CAPÍTULO 2

Ants are a dominant component of terrestrial animal communities worldwide (Hölldobler and Wilson 1990). For instance, ants and termites account for nearly a third of the entire animal biomass of the Brazilian Amazon forest (Fittkau and Klinge 1973). Moreover, ant density in some temperate localities can exceed 140 workers per m² (Kajak et al. 1971). The diversity of life histories in ants is also unparalleled, including solitary foragers, seed harvesters, plant obligate mutualists, fungus-growers, and group predators (Hölldobler and Wilson 1990). As a consequence, inferring evolutionary processes related to ant population differentiation and species formation in a given biome should therefore provide a representative picture of what rest of the animal communities in a given region has experienced during its evolutionary past. Finally, the availability of efficient sampling methods that could uncover dozens of species from a given location in a time-scale of hours (e. g. Agosti and Alonso 2000) suggests that ants are among the best available model systems to investigate patterns of animal diversity and distribution of species in terrestrial ecosystems.

Until recently, most of the studies in ant phylogeography were based exclusively on mitochondrial markers (e.g. Goropashnaya et al. 2007; Solomon et al. 2008; Leppänen et al. 2011; but see Pringle et al. 2012). Such reliance on a single locus could be problematic, given that several mechanisms such as introgression, selective sweeps, and the stochastic nature of the coalescent process might cause a mitochondrial tree not to be representative of the underlying level of population differentiation of a given species (Avice 2000; Wiens et al. 2010). More robust inferences on population structure should therefore include additional unlinked loci, leading to the prevalent use of microsatellites (Schlötterer 2004). However, given that microsatellite development is a laborious process that can only be applied to at most a few closely related species, their applicability in ant phylogeography and population genetics has been limited (Goropashnaya et al. 2007; Ross et al. 2007). A promising alternative method to uncover nuclear genetic variation is the use of exon-primed intron-crossing (EPIC) markers (Lessa 1992; Slade et al. 1993; Palumbi 1996), which has been successfully used in a variety of vertebrate taxa (e.g. Li et al. 2010; Silva-Oliveira et al. 2012). In this

approach, primers bind to conserved exonic regions flanking an intron, which tends to accumulate mutations at a higher rate than transcribed regions (Graur and Li 2000). The availability of nuclear genomes for phylogenetically distinct ant species (Bonasio et al. 2010; Smith et al. 2011a; Smith et al. 2011b; Suen et al. 2011; Würm et al. 2011) provides an ideal situation in which candidate EPIC markers can be selected that could potentially allow for successful amplification in a variety of ant lineages. In this study we use a recently developed pipeline (Li et al. 2010) to screen for candidate EPIC markers based on the genomes of six ant species. Primers were synthesized for a subset of 15 EPIC markers, which were then tested *in vitro*. These markers are ready to be widely used, providing an important tool to increase the quality and accuracy in studies on ant phylogeography, as well as in the inference of phylogenetic relationships among closely related ant species.

We screened the complete nuclear genome of six ant species representing a phylogenetically diverse sample of the family: *Harpegnathos saltator* (Ponerinae), *Linepithema humile* (Dolichoderine), *Camponotus floridanus* (Formicinae), *Solenopsis invicta* (Myrmicinae), *Pogonomyrmex barbatus* (Myrmicinae), and *Atta cephalotes* (Myrmicinae) to identify conserved exons of single-copy genes. First, we retrieved coding sequences from *H. saltator* using its genome annotation information. We then compared the selected coding sequences of *H. saltator* with the genome of other ant species to identify single-copy and conserved exon among all six species. We screened for EPIC makers that are flanked by two single-copy and conserved exons. After this initial screening, potential markers were further selected based on the level of conservation of the flanking exons (to maximize the chance of cross-species successful amplification) and the size of the intron (450- 650 pb, to allow for the amplification of the entire intron in a single sequencing reaction), from which 15 candidate markers were chosen for primer design and used for further analyses.

All primers were tested *in vitro* with the following ant species: *Gnamptogenys striatula* (Ectatomminae), *Hylomyrma reitteri* (Myrmicinae), *Brachymyrmex* sp. (Formicinae), and *Pheidole incisa* (Myrmicinae). We chose those species because they are a phylogenetically diverse sample and they belong to different genera from those whose genomes were used in the initial screening. Total genomic DNA was extracted from entire ants using the PureLink™ Genomic DNA kit (Invitrogen™, USA),

according to manufacturer's instructions. Thermocycling conditions were: 5 min at 95°C, 35 cycles of 92°C for 1min, 58°C - 60°C for 1min and 70°C for 2min, followed by final extension at 72°C for 6 min. Reactions were done in 25- μ L solution with 2 units of AmpliTaq DNA polymerase, 1X PCR buffer, 1.5mM of MgCl₂, 0.5 mM of dNTPs and 0.5 μ M of each primer. PCR products were electrophoresed on 1.5% agarose gels with E-Gel ®1 Kb Plus DNA Ladder (to evaluate the size of the fragments), stained with ethidium bromide and visualized under UV light. Samples of the positive PCR products were purified using PEG 8000. All samples were sequenced in both directions. The sequencing reaction protocol was performed in 10 μ L: 0.5 μ L ABI Prism® BigDye™ v3.1 (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA), 1.0 μ L 5X buffer and 1 μ L each (3.2pmol) primer. The ultra-pure water and template to give 40–50 ng of DNA in each reaction was composed in the remainder of the mixture. The cycle sequencing reaction protocol contained an initial denature step of 96°C for 1 min, followed by 35 cycles of 10 s at 96°C denaturation, 15s at annealing 50°C and 4 min at 60°C. The final DNA precipitation was performed with isopropanol and run on an ABI 3500 sequencer to assess the level of intraspecific sequence variability. Chromatograms were edited in the StadenPackage (Staden et al. 2000) and unambiguously aligned by hand using BioEdit program version 7.1.3 (Hall 1999), all the sequences are available in the GenBank (accession numbers will become available following the acceptance of this manuscript).

The initial screening of potential fragments smaller than 3 kbp indicated 16089 candidate loci (\bar{x} =232.8 bp, SD=381.4), with a strongly skewed size distribution (figure 1). Although not explored in the present study, shorter fragments (<200 bp) might be particularly useful in the context of next-generation sequencing (Puritz et al. 2012). We were able to successfully amplify all loci selected for *in vitro* tests (Table 1). The size of the amplified product varied among species, from 50 to 500 bp (\bar{x} =196.6, table 1).

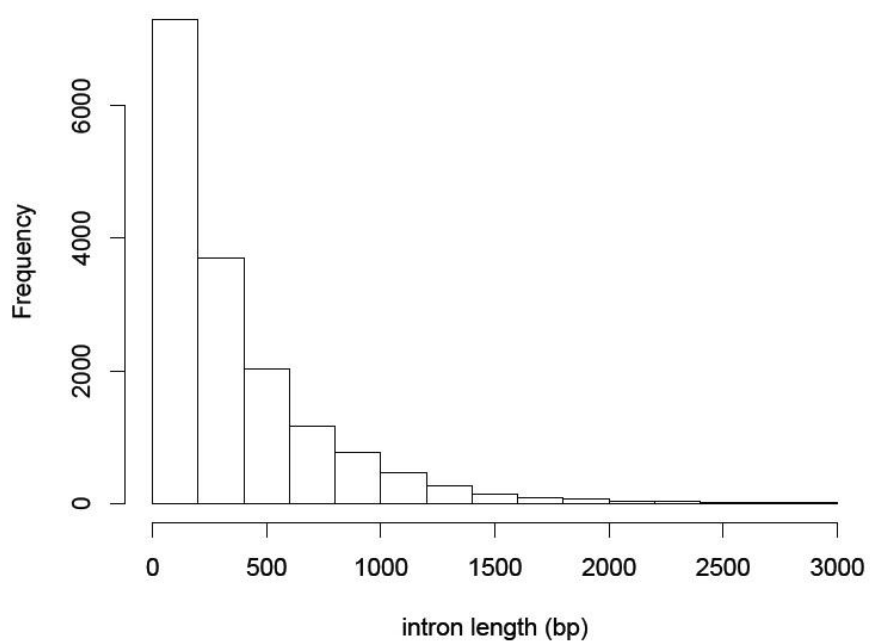


Figure 1. Size distribution of introns screened in the present study.

Table 1 (next page). EPIC primers developed in the present study and the corresponding estimated fragment sizes based on gel electrophoresis.

Primer	Length	Sequence (5' to 3')	<i>Brachymyrmex</i> sp.	<i>Pheidole</i> <i>incisa</i>	<i>Hylomyrma</i> <i>reitteri</i>	<i>Gnamptogenys</i> <i>striatula</i>
ant.1076F	24	AAAATCTNATGTGGAACACGGTCA	600	600	550	550
ant.1076R	23	CCGTATCTGATYTCCATGTAGCA				
ant.1087F	21	ACCAGCAGAGGCTGGACGTGA	700	650	800	700
ant.1087R	27	GCCAAGTTGATTGTGTACGAACTTTCT				
ant.1225F	26	TAATACRACTGAAGAGAGACCAGGAG	500	600	650	1000
ant.1225R	27	GACTAGATCCTAAGCTAGAGAGRCTGG				
ant.1281F	23	GACGCAGGTTGYAACGAAATCAC	500	500	400	550
ant.1281R	24	GCCRCTAATATCCAGCTTCACGAG				
ant.1401F	22	GYAGGAAGGACGCTCTTAATCT	700	550	600	700
ant.1401R	26	AAGCTTATCTCTAGGAAACTCCCATC				
ant.1503F	21	GRTTYGCCTTCCAGGAGATCA	800	700	800	800
ant.1503R	23	AAGTAGTCCAGGCAGAACCACAC				
ant.1F	27	CCTTCGTGCCTAYGAGAATAGYGTTAC	600	450	400	650
ant.1R	21	AACGACGTCSGACGGTTCCAT				

ant.202F	26	CCYATCAACTCTGTTAATATCGAACG	650	500	550	600
ant.202R	22	GACACAATGTTGGAAGCCCTTG				
ant.263F	27	GACTAGCTCAGAATCACACTCTTCCAC	450	550	550	600
ant.263R	24	GTTGTTTTGGWGGCAATATTGGAG				
ant.346F	23	GTGGTCCACCATCCGTKGGATCT	400	400	400	500
ant.346R	26	GGATTGTTTTGTGTAATCTGCGTTCG				
ant.384F	27	TAGTAGTCGAAGGAGTCATACCAAAGG	850	650	850	800
ant.384R	20	TGYGTGTTTCGATGCCGTTGA				
ant.389F	23	ACGGACCCACATTGAGAAGAAC	600	650	650	850
ant.389R	21	CYTTACCCACCTCCTCCACCA				
ant.505F	24	CCTCAGATGAAGTTYCGAGTTTCC	650	600	600	600
ant.505R	26	TAAYCCGRACACCCTCACTTTATACG				
ant.839F	25	CAATGGCGATTTACAACGAATTTCT	450	450	850	400
ant.839R	22	CAGGCANAGCAGCAATGTGACG				
ant.965F	24	AGTTCAAGGTTACCCGGTGCCTAA	400	500	400	650
ant.965R	25	GAGAAGGYGAAYTTAAAGACTGATG				

In order to test if the developed EPIC markers would provide sufficient intraspecific variability, we sequenced a subset of the amplified products for *Gnamptogenys striatula* from locations at least 600 km apart to more than 2,900 km of distance (Brazilian states of Santa Catarina, São Paulo, Sergipe and Pernambuco). Different loci generated varying levels of divergence, from 0.22-0.56% (ant.1F/R, ant.202F/R) to 1.1-1.4 % (ant.263F/R, ant.965F/R, and ant.1281F/R), with a maximum of 8.9 % (ant.346F/R).

The EPIC markers developed in the present study represent an important addition to the ant phylogeography toolbox, allowing for unprecedented new sources of information from nuclear markers. However, given that ants are a remarkably diverse and ancient lineage, it is possible that some markers might not be equally useful in all cases. Future studies should therefore include an initial assessment of fragment size and sequence variability for the species in question before proceeding to more extensive sampling. However, the fact that we obtained successful amplification of all loci for a phylogenetically diverse sample of ant lineages strongly suggests that these markers should be applicable to ants in general.

References

- Agosti D and Alonso LE (2000) The ALL Protocol: A Standard Protocol for the Collection of Ground-Dwelling Ants. In *Ants: Standard Methods for Measuring and Monitoring Biodiversity*. Biological Diversity Handbook Series. Smithsonian Institution Press, Washington, p.204-206.
- Avice JC (2000) *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, MA. 447pp.
- Avice JC, Ball JM, Bermingam TL, Neigel JE, Reeb CA and Saunders NC (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu Rev Ecol Sys*18: 489-522

- Bonasio R, Zhang G, Ye C, Mutti NS, Fang X, Qin N, Donahue G, Yang P, Li Q, Li C, Zhang P, Huang Z, Berger SL, Reinberg D, Wang J, Liebig J (2010) Genomic comparison of the ants *Camponotus floridanus* and *Harpegnathos saltator*. *Science*, 329:1068–1071.
- Booth W, Youngsteadt E, Schal C, Vargo E L (2009) Polymorphic microsatellite loci for the ant-garden ant *Crematogaster levior* (Forel). *Conserv Genet* 10, 1401-1403.
- Fittkau EJ and Klinge H (1973) On biomass and trophic structure of the central Amazonian rain forest ecosystem. *Biotropica*, 5:2–14.
- Garlapati, RB, Cross DC, Perera OP, Caprio MA. (2009) Characteristics of eleven polymorphic microsatellite markers in the red imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren. *Mol Ecol* 9(3): 822-824.
- Goropashnaya A, Fedorov V, Seifert B and Pamilo P (2007) Phylogeography and population structure in the ant *Formica exsecta* (Hymenoptera, Formicidae) across Eurasia as reflected by mitochondrial DNA variation and microsatellites. *Ann Zool Fennici* 44: 462-474.
- Graur D and Li WH (2000) *Fundamentals of Molecular Evolution*. Second Edition. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Grimaldi D and Agosti D (2000) A formicine in New Jersey Cretaceous amber (Hymenoptera: Formicidae) and early evolution of the ants. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:13678–13683.
- Hall, TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41: 95–98.
- Hölldobler B and Wilson EO (1990) *The Ants*. Cambridge, Belknap/Harvard University Press, 732p.
- Kajak A, Breymeyer A, Pełal J (1971) Productivity investigation of two types of meadows in the vistula valley. IX Predatory arthropods. *Ekol Pol* 19: 223-233.

- Leppänen J, Vepsäläinen K, Savolainen R (2011) Phylogeography of the ant *Myrmica rubra* and its inquiline social parasite. *Ecol Evol* 1: 46–62.
- Lessa EP (1992) Rapid surveying of DNA sequence variation in natural populations. *Mol Biol Evol* 9:323-330.
- Li C, Riethoven J-JM, Ma L (2010) Exon-primed intron-crossing (EPIC) markers for non-model teleost fishes. *BMC Evol Biol*, 10:90.
- Palumbi SR (1996) Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. *Molecular Systematics, Second Edition* (Edited by Hillis DM, Moritz C, Mable BK) Sunderland, Massachusetts Sinauer, 205-247.
- Pringle EG, Ramirez SR, Bonebrake TC, Gordon DM, Dirzo R (2012) Diversification and phylogeographic structure in widespread Azteca plant-ants from the northern Neotropics. *Mol Ecol* 21(14): 3576-3592.
- Puritz JB, Addison JA, Toonen RJ (2012) Next-Generation Phylogeography: A targeted approach for multilocus sequencing of non-model organisms. *PLoS ONE* 7(3): e34241.
- Ross K G, Krieger MJB, Keller L, Shoemaker DD (2007) Genetic variation and structure in native populations of the fire ant *Solenopsis invicta*: evolutionary and demographic implications. *Biol J Linnean Soc* 92: 541-560.
- Schlötterer C (2004) The evolution of molecular markers — just a matter of fashion? *Nature Rev Genet* 5: 63-69.
- Seal JN, Kellner K, Trindl A, Heinze J (2011) Phylogeography of the parthenogenic ant *Platythyrea punctata*: highly successful colonization of the West Indies by a poor disperser. *J Biogeogr* 38:868–882.
- Silva-Oliveira GC, Silva ABC, Oliveira Y, Nunes ZP, Torres RA, Sampaio I, Vallinoto M (2012) New nuclear primers for molecular studies of Epinephelidae fishes. *Conserv Genet Resour* DOI 10.1007/s12686-012-9759-6

- Slade RW, Moritz C, Heideman A, Hale PT (1993) Rapid assessment of single-copy nuclear DNA variation in diverse species. *Mol Ecol* 2(6):359–373.
- Smith CD, Zimin A, Holt C, et al (2011) Draft genome of the globally widespread and invasive Argentine ant (*Linepithema humile*) PNAS 108(14): 5673–5678.
- Smith CR, Smith CD, Robertson HM, et al (2011) Draft genome of the red harvester ant *Pogonomyrmex barbatus*. PNAS 108(14):5667–5672.
- Solomon SE, Bacci M Jr, Martins J Jr, Vinha GG, Mueller UG (2008) Paleodistributions and comparative molecular phylogeography of leafcutter ants (*Atta* spp.) provide new insight into the origins of Amazonian diversity. PLoS ONE 3(7): e2738.
- Staden R, Beal KF, Bonfield JK (2000) The Staden package, 1998 *Methods Mol Biol* 132: 115–130.
- Suen G, Teiling C, Li L, Holt C, Abouheif E, et al (2011) The genome sequence of the leaf-cutter ant *Atta cephalotes* reveals insights into its obligate symbiotic lifestyle. PLoS Genet. 7:e1002007.
- Wiens JJ, Kuczynski CA, Stephens PR (2010) Discordant mitochondrial and nuclear gene phylogenies in emydid turtles: implications for speciation and conservation. *Biol J Linnean Soc* 99:445–461.
- Würm Y, Wang J, Riba-Grognuz O, Corona M, Nygaard S, Hunt BG, Ingram KK, et al (2011) The genome of the fire ant *Solenopsis invicta*. PNAS 108:5679–5684.

CAPÍTULO 3

**Filogeografia comparada de formigas (Hymenoptera:
Formicidae) do sul da Floresta Atlântica**

RESUMO

Filogeografia comparada de formigas (Hymenoptera: Formicidae) do sul da Floresta Atlântica

Conhecida pela sua beleza natural, grande biodiversidade e altos níveis de endemismo, a Floresta Atlântica esta entre os ambientes mais ameaçados do mundo. Parte desta riqueza parece ter sido influenciada por alterações climáticas passadas, como as mudanças associadas ao último máximo glacial. Com a intenção de entender melhor o passado evolutivo deste ambiente, investigamos duas espécies de formigas florestais em estudo filogeográfico com um marcador molecular mitocondrial (citocromo b) e um nuclear (epic965). As amostras são provenientes da distribuição sul da Floresta nos estados de São Paulo, Paraná e Santa Catarina. Não encontramos evidências de estruturação genética nas espécies investigadas. Em particular, encontramos indivíduos mais aparentados com outros muito mais distantes do que os mais próximos geograficamente, em ambas as espécies. A ausência de uma barreira geográfica ao fluxo gênico foi a explicação encontrada para este padrão. Usando “*Bayesian Skyline Plots*” não encontramos evidências de uma expansão populacional ao longo do tempo, em ambas as espécies. Concluimos que esta estabilidade populacional vem ao encontro da hipótese de que áreas do sul da Floresta Atlântica mantiveram suas populações relativamente estáveis, mesmo durante períodos de instabilidade climática e vegetacional na última era glacial.

Palavras-chave: Quaternário, refúgios, marcador nuclear, EPIC.

ABSTRACT

Comparative phylogeography of ants (Hymenoptera: Formicidae) in southern of the Brazilian Atlantic Rainforest

Known for its natural beauty, rich biodiversity and high levels of endemism, the Brazilian Atlantic Rainforest is among the most devastated environment in the world. Part of this richness seems to have been influenced by past climatic change, such as the last glacial maximum. With the intention of better understanding the evolutionary past of region, we use two forest ant species in a phylogeography study, using as molecular marker the cytochrome b (mitochondrial) and epic965 (nuclear). The samples are from southern forest distribution in the states of São Paulo, Paraná and Santa Catarina. We did not find genetic and geographical structure and there are organisms more closely related to others more distant than the closest geographically ones, in both species. The absence of a geographical barrier to gene flow has the explanation we found for this pattern. Using Bayesian Skyline Plots, we do not find evidence of population expansion through the time for both species. We conclude that this population stability is consistent with the hypothesis that southern Atlantic Forest kept their populations stable, even during periods of climatic and vegetation instability in the last ice age.

Keywords: Quaternary, refugia, nuclear marker, EPIC

CAPÍTULO 3

Introduction

Known for its remarkable diversity and endemism, the Atlantic Rainforest has been characterized being among the most devastated and threatened environment on the planet (Galdino-Leal & Câmara in 2005). Although this environment naturally extended throughout most of the coastal region of Brazil, deforestation reduced it to less than 8% of its original extension, the high level of fragmentation and the presence of 120 million people living in its domain make the prospects for its conservation even more challenging (MMA 2012). Moreover, the recent threat of anthropogenic climate change may be particularly deleterious to tropical forests (Şekercioğlu et al. 2012). For instance, it is estimated that 92% of current conservation areas will be inadequate within a century (Loarie et al. 2009). Therefore, understanding the distribution of biological diversity across the Atlantic Rainforest and uncovering areas of greatest genetic variability will help in better targeting of management and conservation efforts.

Recent studies have shown that the climate changes in the Pleistocene affected the species distribution at Brazilian Atlantic Rainforest (Carnaval et al. 2009; Thomé et al. 2010), but the formation of refugia, where they were and subsequent colonization remain unclear. On the one hand we have the hypothesis that a refuge at São Paulo was the source of a population expansion further south, after periods of climatic instability (Carnaval et al. 2009). On the other hand Thomé et al. 2010 proposes stable areas at south of São Paulo and these areas kept their populations even during periods of increased climate instability globally. Although these hypotheses describe fundamental aspects of the evolutionary history of the southern Atlantic rainforest, little evidence has been provided in favor of either of them, particularly in the case of invertebrates.

Formicidae has been used as model system to investigate phylogeographical patterns in terrestrial ecosystems. Ants are eusocial animals, with currently over 12,600 described species that live in the all continents except the poles and show a wide variety of habits and relationships with other living beings (Hölldobler & Wilson 1990). Several studies have investigated ant phylogeography in several biomes (e.g. Quek et al.

2007; Solomon et al. 2008; Leppänen et al. 2011). However, an important drawback of these studies is their strong reliance on mtDNA, which essentially corresponds to a single genealogical locus. The use of only one locus in phylogeography has been heavily criticized, given that factors such as introgression, selective sweeps, and the stochastic nature of the coalescent process might introduce biases into the analyses (Wiens et al. 2010). This limitation has been alleviated by the recent development of exon-primed intron-crossing (EPIC) markers, which allowed for the amplification of nuclear loci of even distantly related ant lineages (Ströher et al. submitted).

Our goal in this study is to investigate the distribution of genetic variation among populations of two ant species from the southern part of Atlantic Rainforest and to assess the level of agreement with the theories of diversification already proposed for this region (e.g. Carnaval et al. 2009; Thomé et al. 2010).

Material and methods

We investigated two ant species of different subfamilies: *Gnamptogenys striatula* (Ectatomminae; South and Central America distribution; N=13 individuals) and *Hylomyrma reitteri* (Myrmicinae; Brazil and Paraguay distribution; N=12 individuals). Specimens for the two species were obtained from the southern Atlantic Rainforest in the states of Santa Catarina (localities: Palhoça, São Bonifácio, Blumenau, and São Bento do Sul), Paraná (localities: Morretes, and Parque Estadual das Lauráceas) and São Paulo (localities: Parque Estadual Intervales and Cunha) (figure 1). Sample collection was conducted between the years 2000 and 2003 and specimens were placed in 70% alcohol until being processed in the laboratory. Total genomic DNA was extracted from entire ants using the PureLink™ Genomic DNA kit (Invitrogen™, USA), according to manufacturer's instructions. We sequenced two fragments: partial mitochondrial cytochrome b gene with primers CB1 and tRS from Jermini & Crozier 1994 and one nuclear fragment of intron ant.965 with primers 965F and 965R from Ströher et al. (submitted). Thermocycling conditions for cytochrome b were: 5 min at 95°C, 35 cycles of 94°C for 30s, 48°C for 1 min and 72°C for 2 min, followed by final extension at 72°C for 6 min. In the case of the ant.965 intron, thermocycling conditions were: 5 min at 95°C, 35 cycles of 92°C for 1 min, 58°C for 1 min and 70 °C for 2 min, followed by

final extension at 72°C for 6 min. Reactions were done in 25µL solution with 2 units of AmpliTaq DNA polymerase, 1X PCR buffer, 1.5mM of MgCl₂, 0.5 mM of dNTPs and 0.5 µM of each primer. PCR products were electrophoresed on 1.5% agarose gels with E-Gel ®1 Kb Plus DNA Ladder (to evaluate the size of the fragments), being added to Kasvi Safer Dye fluorescent reagent and visualized under UV light. Samples of the positive PCR products were purified using PEG 8000. All samples were sequenced in both directions for the two fragments. The sequencing reaction protocol was performed in 10 µL: 0.5 µL ABI Prism® BigDye™ v3.1 (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA), 1.0 µL 5X buffer and 1µL each (3.2pmol) primer. The ultra-pure water and template to give 40–50 ng of DNA in each reaction was composed in the remainder of the mixture. The cycle sequencing reaction protocol contained an initial denature step of 96°C for 1 min, followed by 35 cycles of 10 s at 96°C denaturation, 15 s at annealing 50°C and 4 min at 60°C. The final DNA precipitation was performed with isopropanol and run on an ABI 3500 sequencer. Chromatograms were edited in the StadenPackage (Staden et al. 2000) and unambiguously aligned by hand using BioEdit program version 7.1.3 (Hall 1999), all the sequences will become available in GenBank. Sequencing was successful with all samples in the cytochrome b reactions in both species and failed in four samples for *Gnamptogenys striatula* and six samples in *Hylomyrma reitteri* for the intron fragment.

Sequences were aligned with Muscle (Edgar 2004) and the concatenated alignments were used to generate substitution models with PartitionFinder (Lanfear et al. 2012). Our intention was to find the model of evolution that is best for each part of the sequences. In this case they are HKY/HKY+I for *Gnamptogenys striatula* and F81+G, HKY/ HKY+I for *Hylomyrma reitteri*. Bayesian trees were constructed with MrBayes version 3.2.1 (Huelsenbeck & Ronquist 2001) the program was run for 50 million generations, trees were sampled every 1000 generations and the first 5 thousand trees were discarded as burn-in. The phylogenetic trees were summarized using TreeAnnotator version 1.7.2 (Drummond & Rambaut 2007). The majority consensus trees were viewed in FigTree version 1.3.1 (Rambaut 2009).The extended Bayesian skyline plot (EBSP) analysis was conducted in BEAST v1.7.2 (Drummond et al., 2012)to investigate evolutionary demographic patterns. The EBSP was informed by an estimated mutation rate used for insect's mtDNA available in Papadopoulou et al.

(2010). HKY + G substitution model was implemented in a MCMC chain performed for 50 million generations. TRACER v1.5.0 (Drummond et al., 2012) was used to evaluate the convergence of the estimated parameters.

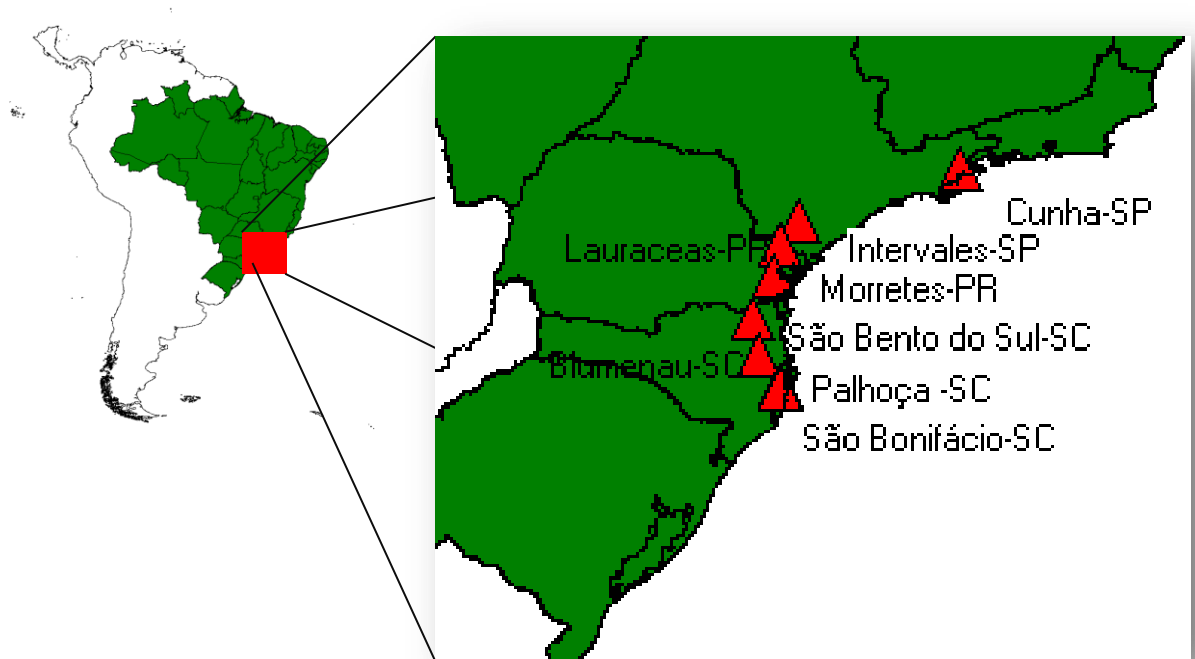


Figure 1. Sampling sites throughout the southern portions of Atlantic Rainforest in Brazil.

Results

In our survey we did not find correspondence between genetic and geographic divergence in either ant species (figures 2 and 3). In both scenarios, at least one sample for two species from São Paulo (municipality of Cunha) was more similar with samples from Santa Catarina than to other samples from the same place.

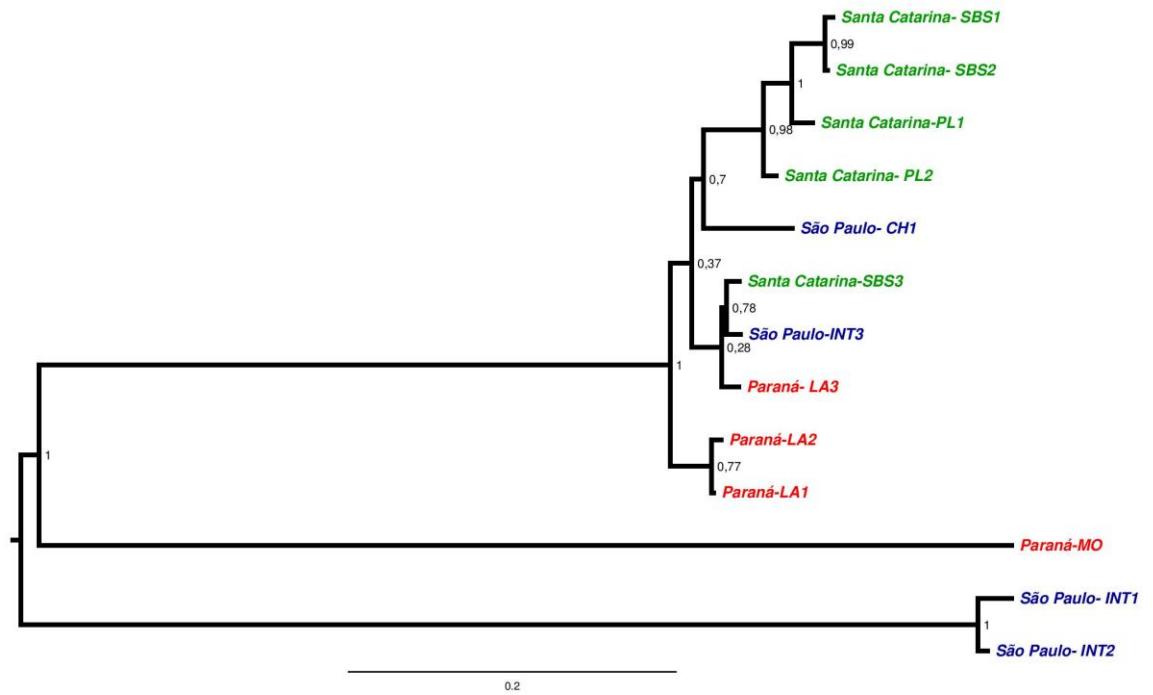


Figure 2 Bayesian tree of *Gnamptogenys striatula* based on 1005 bp of part mitochondrial citocromo b region and ant.965 nuclear intron. The number at nodes represents the bayesian posterior probability. Samples from the same state have the same color.

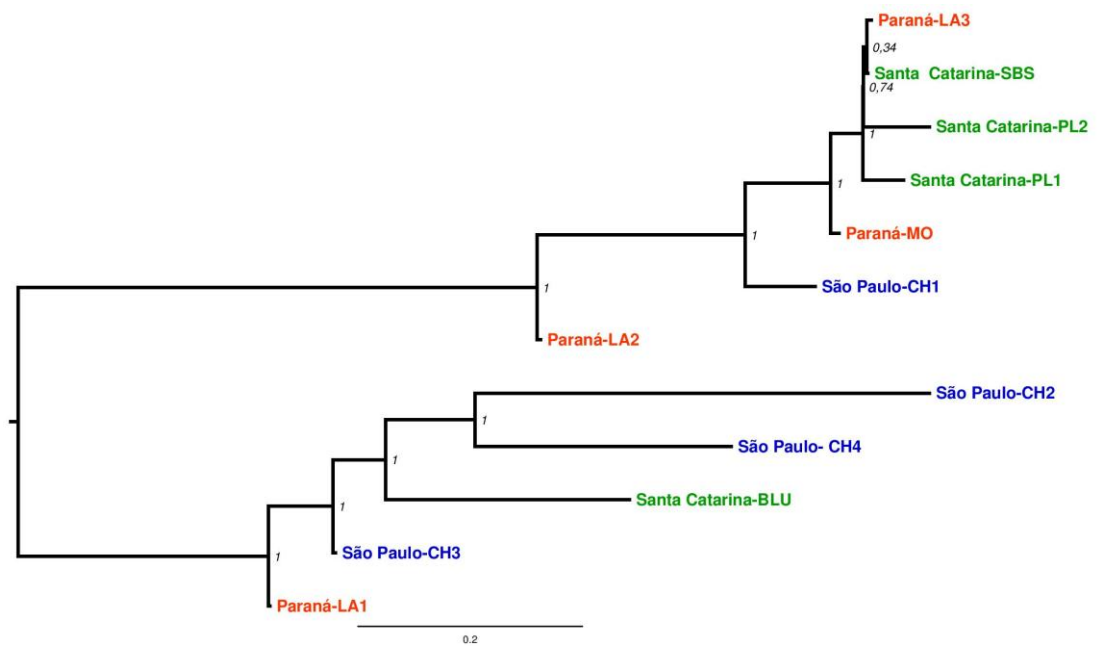


Figure 3. Bayesian tree of *Hylomyrma reitteri* based on 1021 bp of part mitochondrial citocromo b region and ant.965 nuclear intron. The number at nodes represents the bayesian posterior probability. Samples from the same state have the same color.

The extended Bayesian skyline plot analysis indicated relative population size stability for both ant species through time (figures 4 and 5).

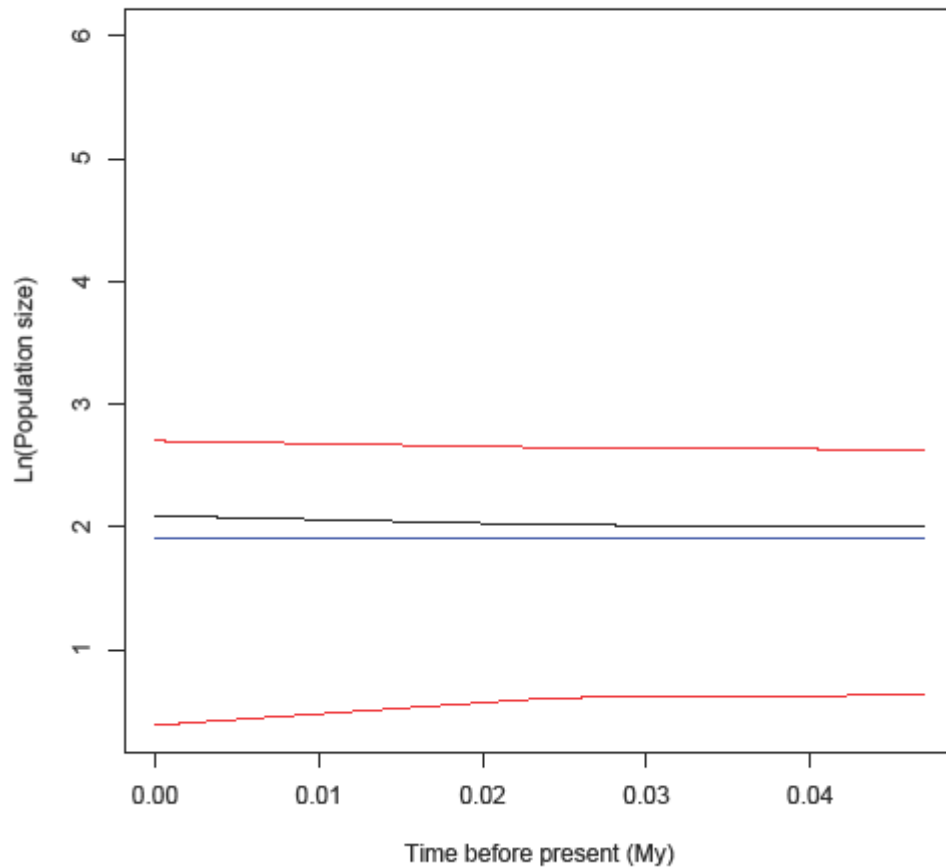


Figure 4.A extended bayesian skyline plot for *Gnamptogenys striatula* representing the population size changes over time in two of the mtDNA clades, inferred by mtDNA and one EPIC nuclear locus. The mutation rate as 2, 3% for mtDNA and 0, 11% for the epic marker. The black line represents the mean population size. The blue line represents the median population size. Two red lines represent the 95% confidence interval.

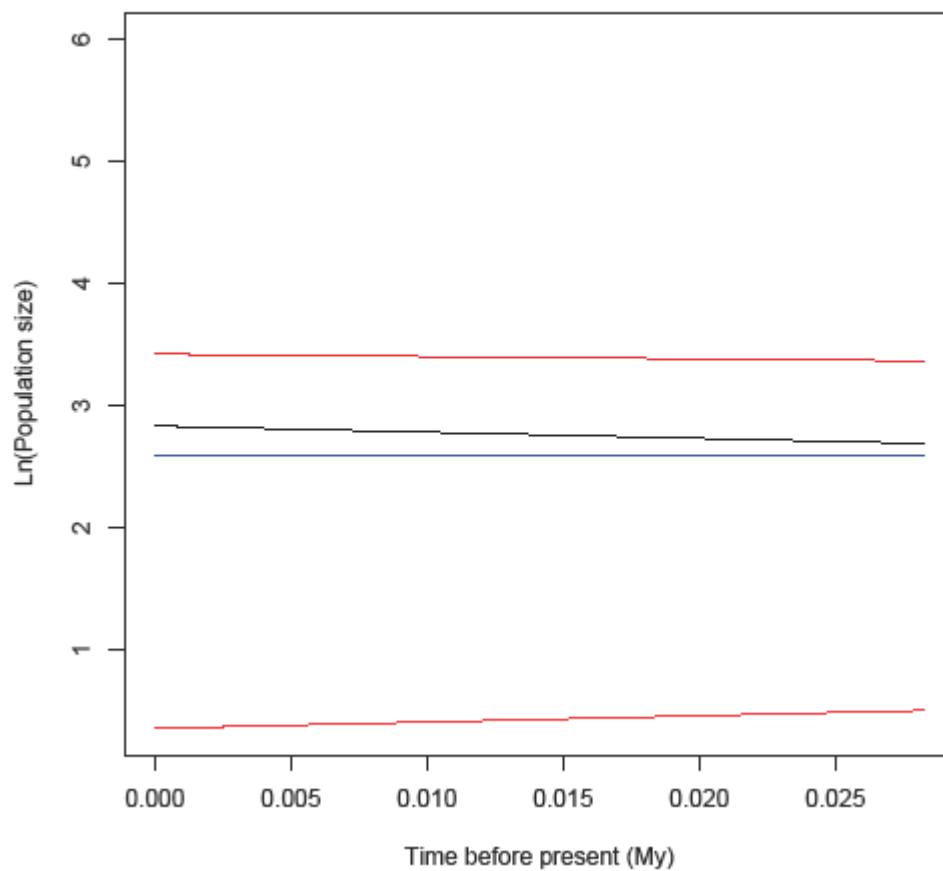


Figure 5. A extended bayesian skyline plot for *Hylomyrma reitteri* representing the population size changes over time in two of the mtDNA clades, inferred by mtDNA and one epic nuclear locus. The mutation rate as 2, 3% for mtDNA and 0, 27% for the epic marker. The black line represents the mean population size. The blue line represents the median population size. The two red lines represent the 95% confidence interval.

Discussion

The refuge thesis proposed initially for speciation in the Amazon for the Pleistocene (Haffer, 1969; Vanzolini & Williams, 1970), fits well in the history of Atlantic Rainforest, given that this environment was also influenced by climatic oscillations and habitat shifts between dry and wet environments (Ledru et al. 1998;

Behling & Negrelle 2001, Turchetto-Zolet et al. 2012). This scenario has been addressed recently by Carnaval et al. (2009), who integrated population genetics, paleoclimatic modeling and approximate bayesian computation methods to assess the existence of refugia in three lowland frog species with broad geographical distributions throughout the Atlantic Rainforest. According to these authors, the Atlantic Rainforest south of São Paulo would have been formed by recent population expansion. These results were disputed by Thomé et al. (2010) by demonstrating the persistence of deeply divergent lineages in other frog species from the southern Atlantic Forest. The relative stability of population size in both ant species support the idea of stable areas in southern Brazil even during periods of global instability in the last ice age. Similar results with maintenance of population size were found for a variety of frog species inhabiting cloud forests of Paraná and Santa Catarina (MRP, unpublished results). We also need to bear in mind that climate alone might not be sufficient to explain the current observed patterns in the species distribution in the Atlantic Rainforest. For instance, in the case of lizards, rivers might lead to important geographical barriers to gene flow (Pellegrino et al. 2005). A study with Passeriformes of the genus *Xiphorhynchus* suggests “a fragmentation somewhere between São Paulo and northern Paraná” (Cabanne et al. 2007) what is not supported by our results with ants where no genetic structure was found. Phylogeographical studies on Atlantic Rainforest organisms, especially on the south, are scarce. Conflicting results show that we still need more information from different taxonomic groups from all Atlantic Rainforest distribution in order to view a large common pattern.

Conclusion

Although the history of the Atlantic Rainforest is certainly a complex mosaic structured by several factors, hypotheses involving palaeorefugia and geographical barriers gives prominence in this scenario but are, probably, only part of the complete story. Unfortunately, samples available for this study did not permit to test these theories for the full distribution of forest, but our results seem to agree with the hypothesis of Thomé et al. (2010) for the southern Brazilian Atlantic Rainforest biogeography, with the maintenance of southern populations during the quaternary

climatic fluctuations. For a better assessment not only in the south region, but also for entire Atlantic Rainforest, futures studies should include at the data produced here more northerly distribution samples and increase the number of species and molecular markers. The high level of fragmentation caused by human's destruction in the forest affects the habitat of many species causing extinctions, impact the lives of millions of people who live at original distribution of forest and also reduces the genetic diversity significantly and favor the loss of the history of this ecosystem. In this context, any effort at conservation and understanding of their evolutionary past is important to maintain this ecosystem alive.

References

- Behling H. 2002. South and southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: a synthesis. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 177: 19–27.
- Behling H, Negrelle RRB. 2001. Tropical rain forest and climate dynamics of the atlantic lowland, southern Brazil, during the Late Quaternary. *Quaternary Research*, 56: 383–389
- Brito PH, Edwards SV. 2009. Multilocus phylogeography and phylogenetics using sequence-based markers. *Genetica*, 135:439–455.
- Carnaval AC, Hickerson MJ, Haddad CFB, Rodrigues MT, Moritz C. 2009. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot. *Science*, 323: 785-789.
- Drummond AJ, Rambaut A. 2007. BEAST, Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7: 214
- Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D., Rambaut, A., 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, doi: 10.1093/molbev/mss075.
- Edgar R.C. 2004. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32: 1792-1797.

- Galdino-Leal C, Câmara IG (eds) 2005. The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats, and Outlook. Belo Horizonte, Conservação Internacional e Fundação SOS Mata Atlântica.
- Haddad CFB, Toledo LF, Prado CPA. 2008. Anfíbios da Mata Atlântica. Editora Neotropica, São Paulo, Brazil
- Haffer J. 1969. Speciation in Amazonian birds. *Science*, 165:131–131.
- Hölldobler B, Wilson EO. 1990. The ants. Cambridge, Mass. The Belknap Press of Harvard University, 732p.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*, 17: 754–755.
- Jermiin LS, Crozier RH. 1994. The cytochrome b region in the mitochondrial DNA of the ant *Tetraponera rufoniger*: sequence divergence in Hymenoptera may be associated with nucleotide content. *Journal of Molecular Evolution*, 38: 282–294.
- Lanfear R, Calcott B, Ho S, Guindon S. 2012. Partitionfinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution*, 29(6):1695–1701
- Leppänen J, Vepsäläinen K, Savolainen R. 2011. Phylogeography of the ant *Myrmica rubra* and its inquiline social parasite. *Ecology and Evolution*, 1: 46–62.
- Ledru MP, Salgado-Labouriau ML, Lorscheitter ML. 1998. Vegetational dynamics in southern and central Brazil during the last 10 000 yr B. P. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 99: 131–142.
- Loarie SR, Duffy PB, Hamilton H, Asner GP, Field CB, Ackerly DD. 2009. The velocity of climate change. *Nature*, 462: 1052–1055.
- MMA. 2012. Ministério do Meio Ambiente. Mata Atlântica. <http://www.mma.gov.br>

- Quek SP, Davies SJ, Ashton PS, Itino T, Pierce NE. 2007. The geography of diversification in mutualistic ants: a gene's-eye view into the Neogene history of Sundaland rain forests. *Molecular Ecology*, 16:2045–2062.
- Papadopoulou A, Anastasiou I, Vogler AP. 2010. Revisiting the insect mitochondrial molecular clock: The mid-Aegean trench calibration. *Molecular Biology and Evolution*, 27: 1659–1672.
- Pellegrino KCM, Rodrigues MT, Waite AN, Morando M, Yassuda YY, Sites J W. 2005. Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwini* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Journal of the Linnean Society*, 85: 13–26.
- Rambaut A. 2009. FigTree v1.3.1. Computer program and documentation distributed by the author at <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/>.
- Şekerciöglu C H, Primack RB, Wormworth J. 2012. The effects of climate change on tropical birds. *Biological Conservation*, 148(1):1-18.
- Solomon SE, Bacci MJr, Martins JJr, Vinha GG, Mueller UG. 2008. Paleodistributions and comparative molecular phylogeography of leafcutter ants (*Atta* spp.) provide new insight into the origins of Amazonian diversity. *PLoS ONE*, 3(7): e2738.
- Staden R, Beal KF, Bonfield JK (2000) The Staden package, 1998. *Methods Mol Biol* 132: 115–130
- Ströher PR, Li C, Pie MR. 2012. Exon-primed intron-crossing (EPIC) makers as a tool for ant phylogeography.
- Thomé MTC, Zamudio KR, Giovanelli JGR, Haddad CFB, Baldissera FAJr Alexandrino JMB. 2010. Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55:1018–1031.
- Turchetto-Zolet AC, Pinheiro F, Salgueiro F, Palma-Silva C. 2012. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Molecular Ecology*. doi: 10.1111/mec.12164

Vanzolini PE, Williams EE. 1970. South american anoles: the geographic differentiation and evolution of the *Anolis chrysolepis* species group (Sauria: Iguanidae). *Arquivos de Zoologia*, 19: 1–298.

Wiens JJ, Kuczynski CA, Stephens PR. 2010. Discordant mitochondrial and nuclear gene phylogenies in emydid turtles: implications for speciation and conservation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 99:445–461.

