

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

Paulo Agenor Alves Bueno

**CONTEXTO GENÉTICO E GEOGRÁFICO
DA INTERAÇÃO *Cecropia-Azteca***

CURITIBA

2013

Paulo Agenor Alves Bueno

**CONTEXTO GENÉTICO E GEOGRÁFICO
DA INTERAÇÃO *Cecropia-Azteca***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Universidade Federal do Paraná, para a obtenção do título de Doutor em Ecologia.
Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Valéria Cunha Muschner

Co-orientador: Prof Dr. Marcio Roberto Pie

CURITIBA

2013



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO




PARECER

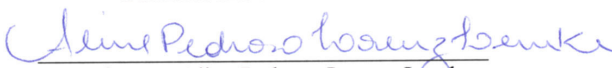
Os abaixo-assinados, membros da banca examinadora da defesa da tese, a que se submeteu **Paulo Agenor Alves Bueno** para fins de adquirir o título de Doutor em Ecologia e Conservação, são de parecer favorável à **APROVAÇÃO** do trabalho de conclusão do candidato.

Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação.

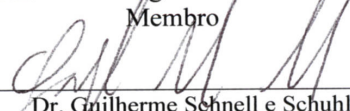
Curitiba, 31 de julho de 2013.

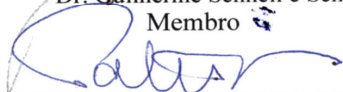
BANCA EXAMINADORA:



Prof.^ª. Dra. Valéria Cunha Muschner
Orientadora e Presidente


Prof.^ª. Dra. Aline Pedrosa Lorenz Lemke
Membro


Prof. Dr. Rodrigo Kersten de Andrade
Membro


Dr. Guilherme Schnell e Schuhli
Membro


Prof.^ª. Dra. Patrícia Soffiatti
Membro

Visto: 
Prof.^ª. Dra. Maria Regina Torres Boeger
Coordenadora do PPG-ECO

Agradeço,

À Valéria Cunha Muschner, minha orientadora, pelas ideias, pela paciência com alguém inexperiente na área da genética molecular, e por me abrir as portas de imediato sem nem me conhecer e me aceitar como orientado por esses quatro anos!

Ao Marcio Roberto Pie, meu co-orientador que me deu muitas dicas de leitura, treinamento em laboratório e me proporcionou uma experiência muito rica de um estágio nos Estados Unidos com um dos maiores especialistas do sistema que estudo.

Aos colegas de trabalho do curso de Engenharia Ambiental Débora, Elizabete e Raquel que assumiram minhas aulas durante o curto período de afastamento que tive e por todo apoio no longo período sem afastamento. Não foi fácil, mas com colegas amigas como essas as dificuldades foram amenizadas.

Ao Marcelo Caxambu e Edemilson que fizeram parte de algumas expedições de coleta por esse Brasilão à fora.

Ao José Hilário pela dedicação e auxílio na confecção dos mapas e das moldelagens.

À Sueli e ao Eduardo, pelo abrigo, companhia, muito carinho que me deram sempre que estive em Curitiba.

Aos meus amigos e colegas de trabalho da UTFPR que são nosso alicerce na distância da família, e acabamos sendo uma segunda família!

Aos amigos de longa data Orlei, Rodrigo e especialmente o Guilherme que não mediu esforços para me auxiliar nas análises e interpretações, e Raquel pelas sugestões de escrita.

Aos meus colegas dos laboratórios por onde passei, Suellen Giovanonni por ter me ensinado muito de prática laboratorial e principalmente pela parceria incondicional inclusive nos períodos de férias!, Jaqueline pelas “consultorias” sobre o que fazer e como fazer dentro do laboratório, Carolina, Monica, Elaine, Paula, Ricardo, Carina e Patrícia Ströher que assim como a Suellen, se não fosse por elas não ia rolar! Muito obrigado mesmo!

À Raquel, minha esposa mais que amada, que nunca duvidou de que eu conseguiria, estando sempre me amparando nos momentos difíceis, que se

mostra a cada dia mais uma super mãe pra nossa pequena Luísa, que não mede esforços para a harmonia do nosso lar.

À Raquel ainda, por me ajudar a revisar o texto, aguentar meu mau humor, com ela e minha filha que pacientemente sempre estiveram ao meu lado nessas idas e vindas a Curitiba.

Aos meus familiares, mãe, sogra, irmãos e cunhados que me mantiveram forte em meu objetivo pela sustentação e raízes que uma família pode proporcionar. Agradeço em especial ao meu pai *in memoriam* que sempre foi um exemplo de dedicação e honestidade.

Aos alunos Henrique Martinez e Jean Lukas que me ajudaram nas coletas.

À UTFPR Câmpus Campo Mourão, por me conceder afastamento das atividades de trabalho para investir na conclusão desse doutorado.

Dedico,

Ao Natalício Alves Bueno, meu pai *in memoriam* e à Lúcia Monte Serrat Alves Bueno, minha mãe que muito me ensinaram; Raquel de Oliveira Bueno, minha esposa e Luísa de Oliveira Bueno, fruto do nosso amor, que continuam a me ensinar a viver!

RESUMO

A avaliação do contexto genético de organismos, bem como sua correspondência geográfica, formam um potencial para estudos biogeográficos históricos e filogeográficos. A interação *Cecropia-Azteca* é bastante conhecida por ser amplamente distribuída nos trópicos e pode servir de modelo para estudos populacionais e de coevolução. Este estudo tratou da interação entre *Cecropia* e *Azteca*, sua distribuição geográfica potencial e real e implicações genéticas e ecológicas dessa interação. Para este fim o trabalho foi dividido em dois capítulos, o primeiro objetivou avaliar a distribuição geográfica de espécies do gênero *Cecropia* e formigas do gênero *Azteca* associadas. Buscou-se descrever a estrutura populacional de *C. pachystachya*, *C. glaziovii* e *C. saxatilis* nos locais de ocorrência, foram verificados quais os pares mutualísticos formados entre *Cecropia-Azteca* e foi produzido um mapa de distribuição potencial baseando-se na teoria de nicho ecológico. No segundo capítulo objetivou-se descrever a estrutura genética de *C. pachystachya* e *C. glaziovii* com marcadores ISSR-PCR, avaliar a variabilidade genética de *Azteca* com o gene do DNA mitocondrial COI e interpretar sobre possíveis efeitos de processos coevolutivos no sistema *Cecropia-Azteca*. O estudo abrangeu áreas da porção Sul da Mata Atlântica e região central do Cerrado. No primeiro capítulo indivíduos de *Cecropia* e *Azteca* foram amostrados em 19 pontos sendo onze na Mata Atlântica e oito no Cerrado. Em cada ponto de coleta foram amostrados 20 indivíduos de *Cecropia* e 20 exemplares de *Azteca* correspondente a cada árvore, buscando a rainha para fins de identificação. As árvores foram medidas em altura, circunferência a altura do peito (CAP) e número de ramificações, para interpretação de estrutura populacional. Utilizou-se ainda dados de ocorrência das espécies de *Cecropia* estudadas para uma modelagem de distribuição potencial baseada na teoria de nicho, utilizando o aplicativo openModeller e o algoritmo MaxEnt para gerar um mapa para cada espécie. A distribuição observada mostrou que *C. pachystachya* é a mais amplamente distribuída, sendo observada em formações de Cerrado e de Mata Atlântica, *C. glaziovii* foi observada apenas em Mata Atlântica e *C. saxatilis* exclusivamente em Cerrado. A maioria de indivíduos das três espécies estudadas, estavam na faixa etária juvenil e adulta, férteis e plenamente estabelecidos, apesar de estarem em classes iniciais de tamanho. Os pares mutualísticos encontrados foram de *C. pachystachya* com *A. alfari*, *C. saxatilis* com *A. alfari* e *C. glaziovii* com *A. muelleri*. A espécie *A. alfari* se mostrou mais generalista na interação, ocorrendo em duas das espécies de *Cecropia*. A espécie *A. muelleri* foi mais específica, pois as formigas são mais agressivas e protetoras dos ninhos, sendo que esses ninhos provocam deformações no fuste principal das plantas de *C. glaziovii*. Os mapas de distribuição potencial gerados mostraram mais coerência com a distribuição observada para *C. pachystachya* e *C. saxatilis* do que para *C. glaziovii*, considerando as limitações do modelo, pois é sujeito aos dados de ocorrência que podem ter erros e também limitações do próprio algoritmo. No capítulo dois, para extração de DNA, amplificação através de PCR-ISSR e interpretação genético-populacional, utilizou-se oito populações de *C. pachystachya* e quatro populações de *C. glaziovii* coletando uma folha de cada uma das 20 plantas. Quatro *primers* amplificaram adequadamente para 94 indivíduos de *C.*

pachystachya de Mata Atlântica e Cerrado e 36 de *C. glaziovii* de Mata Atlântica. Foram selecionados 50 exemplares de *Azteca* coletados e após a identificação foram submetidos ao sequenciamento do gene (COI), para inferência sobre variabilidade genética. As duas espécies de *Cecropia* mostraram baixa diversidade genética e a distribuição da variação se mostrou maior dentro das populações do que entre as populações, mostrando baixa estruturação genética correspondente às localidades de ocorrência. Existem efeitos de um conjunto de fatores homogeneizadores dessas populações referentes à sua biologia aliados a descontinuidade de coleta, bem como o número baixo de *primers*, que podem ter influenciado nesse resultado. *Azteca* mostrou uma separação em duas linhagens diferentes, porém essas linhagens não correspondem as duas espécies do estudo, misturando ambas e ainda, sem correspondência com a estrutura geográfica. Além disso, os agrupamentos não foram coerentes com a distribuição geográfica das amostras, talvez por existir espécies crípticas não detectadas morfológicamente ou por limitação na resolução do marcador, que isolado pode não ser adequado para algumas interpretações. As análises interpretadas em conjunto podem sugerir que estejam ocorrendo eventos coevolutivos que influenciem reciprocamente os mutualistas e resultem em consequências ecológicas e genéticas evidenciadas na falta de estrutura genética de *Cecropia* e na falta de padrões coerentes de variabilidade em *Azteca* de acordo com a estruturação geográfica.

Palavras chave: distribuição geográfica, mutualismo, marcadores moleculares

ABSTRACT

The assessment of the genetic context of organisms, as well as its geographical correspondence, are a potential for historical biogeographic and phylogeographic research. The interaction between *Cecropia-Azteca* is well known because it widely distributed in the tropics and can serve as a model for population studies and coevolution. This study discussed the interaction between *Cecropia* and *Azteca*, its geographic distribution real and potential, genetic and ecological implications of this interaction. To this purpose, the work was divided into two chapters, where the first chapter aimed to evaluate the geographic distribution of the genus *Cecropia* and ants of the genus *Azteca* associated. Was sought to describe the population structure of these plants in places of occurrence and were verified which mutualistic pairs formed between *Cecropia* and *Azteca*, and produced a map of potential distribution created through modeling, based on the theory of ecological niche. In second chapter aimed to describe the genetic structure of *Cecropia* with ISSR-PCR to evaluate the genetic variability of *Azteca* with the mtDNA COI gene and interpret about possible effects of co-evolutionary processes in the system *Cecropia-Azteca*. The study included areas of the southern portion of the Atlantic Forest and the Cerrado core area. In the first chapter, *Cecropia* and *Azteca* individuals were sampled in 19 points and eleven at the Atlantic Forest and the Cerrado eight. At each point was sampled 20 individuals of *Cecropia* and 20 *Azteca* specimens corresponding to each tree, searching the queen for identification purposes. The trees were measured for height, circumference at breast height and number of ramifications for interpretation of population structure. Was also used occurrence data of *Cecropia* species studied for a potential distribution modeling based on the theory of niche, and using the application openModeller and MaxEnt algorithm to generate a map for each species. The observed distribution has shown that *C.pachystachya* is the most widely distributed, and found in formations of Cerrado and Atlantic Forest, *C. glaziovii* was observed only in the Atlantic Forest and *C. saxatilis* exclusively in Cerrado. Most species collected was small, being predominantly in the initial size classes, however showed mostly individuals aged juvenile and adult reproductive and well established. The mutualistic pairs were *C. pachystachya* with *A. alfari*, which is less specialized, as occurred in *C. saxatilis* and know that it occurs in other species of *Cecropia*. In *C. glaziovii* observed interaction with *A. muelleri*, more specialized, because ants are more aggressive and protective of the nests, and these nests cause deformations in the main stem of the plants. The potential distribution generated maps showed more consistent with the observed distribution for *C. pachystachya* and *C. saxatilis* than for *C. glaziovii*, considering the limitations of the model, it is subject to the occurrence data that may have errors, and limitations of the algorithm. In chapter two we used eight populations of *C. pachystachya* and four populations of *C. glaziovii* collecting a leaf of each of the 20 plants for DNA extraction, amplification by PCR-ISSR and population genetic interpretation. Four primers amplified appropriately for 94 individuals of *C. pachystachya* Atlantic Forest and Cerrado and 36 *C. glaziovii* Atlantic Forest. We selected 50 samples collected and *Azteca* after identification were submitted to sequencing of the gene (COI), for inference of genetic variability. The genus *Cecropia* showed low genetic diversity and

distribution of variation showed a higher within populations than among populations, showing low genetic structure corresponding to the locations of occurrence. There are effects of a group of factors homogenizing these populations. About its biology combined discontinuous sampling, as well as the low number of *primers*, which may have influenced this result. *Azteca* showed a separation into two different lineages, but these lineages do not correspond the two species in the study, mixing both also without correspondence with the geographical structure. In addition, groups were not consistent with the geographic distribution of the samples, perhaps because there are cryptic species not detected morphologically or restriction the resolution of the marker, that alone may not be appropriate for some interpretations. The analyzes interpreted in combination may suggest that coevolutionary events are occurring, influencing each other such mutualists result in ecological and genetic consequences evidenced in the low genetic structure of *Cecropia* and lack of consistent standards of variability in *Azteca* according to geographic structuring.

Keywords: geographical distribution, mutualism, molecular markers

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	13
REFERÊNCIAS	19
CAPÍTULO I	26
A interação <i>Cecropia</i>-<i>Azteca</i> em áreas de Cerrado e Mata Atlântica: distribuição geográfica e variações interespecíficas	26
RESUMO	27
ABSTRACT	28
1 INTRODUÇÃO	29
2 MATERIAL E MÉTODOS	31
2.1 ÁREA DE ESTUDO.....	31
2.2 COLETA DE DADOS	31
3 RESULTADOS	35
4 DISCUSSÃO	37
REFERÊNCIAS	41
Lista de tabelas	45
Legenda das figuras	47
ANEXOS	52
CAPÍTULO II	55
Genética molecular e populacional de <i>Cecropia</i> e <i>Azteca</i> em áreas de Cerrado e Mata Atlântica.	55
RESUMO	56
ABSTRACT	57
1 INTRODUÇÃO	58
2 MATERIAL E MÉTODOS	60
2.1 <i>CECROPIA</i>	60
2.1.1 Coleta	60
2.1.2 Extração do DNA.....	60
2.1.3 PCR-ISSR	61
2.2 <i>AZTECA</i>	61
2.2.1 Coleta	61

2.2.2 Extração	62
2.2.3 PCR-Sequenciamento.....	62
2.3 ANÁLISE DE DADOS.....	63
2.3.1 Marcadores ISSR (<i>Cecropia</i>)	63
2.3.2 Sequências (<i>Azteca</i>)	64
3 RESULTADOS.....	65
3.1 <i>CECROPIA</i>	65
3.2 <i>AZTECA</i>	66
4 DISCUSSÃO	67
4.1 <i>CECROPIA</i>	67
4.2 <i>AZTECA</i>	70
REFERÊNCIAS.....	73
Lista de tabelas	82
Legenda das figuras	89
CONSIDERAÇÕES FINAIS	102

1 INTRODUÇÃO GERAL

Existem muitas formas de interação entre organismos nas etapas dos seus ciclos de vida (Braga *et al.* 2004). Durante o processo evolutivo, foram geradas associações específicas e especializadas, incluindo amensalismo, comensalismo, parasitismo e mutualismo (Braga *et al.* 2004). Essa última se caracteriza pelos benefícios mútuos a todos os participantes envolvidos na interação (Zarbin *et al.* 2009; Izzo & Peneti-Benelli 2011).

Nas interações mutualísticas ambas as espécies envolvidas obtêm benefícios maiores do que os custos de estarem associadas (Bronstein 2006). Um dos casos mais bem estudados é o mutualismo entre formigas e plantas (Heil & Mckey 2003; Del-Claro 2004; Byk & Del-Claro 2010; Cardel & Koptur 2010; Izzo & Peneti-Benelli 2011). As árvores chamadas mirmecófitas oferecem estruturas ocas para formigas especializadas nidificarem (Fonseca & Ganade 1996; Vasconcelos & Davidson 2000; Solano *et al.* 2005; Edwards & Yu 2008).

Plantas do gênero *Cecropia* (Urticaceae) Loefl. são árvores pioneiras que ocorrem na região neotropical (Kricher 1997), em áreas perturbadas, como clareiras, e ao longo de estradas e trilhas, embora também possam ser encontradas no interior de florestas (Longino 1989a). Popularmente chamadas de embaúbas, embaúvas ou imbaúbas, as espécies do gênero alcançam até 30 metros de altura e ocorrem em regiões alagadas ou de terra firme. Essas plantas possuem troncos finos e ocas, folhas palmadas e um baixo grau de ramificação (Kricher 1997).

Apesar da grande uniformidade na maioria das estruturas reprodutivas e vegetativas, o grupo apresenta cerca de 80 espécies arbóreas presentes nos neotrópicos (Berg 1978). Elas atingem a maturidade em torno de um ano e são dióicas, apresentando as flores femininas e masculinas em indivíduos separados (Parolin 2002). Espécies de áreas alagadas florescem apenas nos dois meses iniciais do período de inundação (Parolin 2002), mas as de terra firme, em geral, apresentam floração durante quase todo o ano e em grandes quantidades (centenas de inflorescências por indivíduo), como muitas das espécies pioneiras (Berg 1978).

As inflorescências de *Cecropia* são grupos de espigas, contendo cerca de 40-60 espigas nas plantas masculinas e duas a quatro nas plantas femininas, que se desenvolvem nas axilas foliares, com 5-20 cm de comprimento, geralmente envolvidas por uma bráctea e compreendendo milhares de minúsculas flores. Por se tratarem de plantas pioneiras formam, frequentemente, grandes agrupamentos compostos por uma única espécie como acontece, por exemplo, com *C. pachystachya* Trécul (Berg *et al.* 1990). Esses agrupamentos, que ocorrem principalmente em regiões desmatadas, alcançam centenas de metros de extensão e compreendem grande número de indivíduos (Berg 1978). Plantas deste gênero são muito atrativas e dispersas por aves, morcegos e até insetos além de serem polinizadas pelo vento (Berg 1978; Berg *et al.* 1990; Berg & Rosseli 2005).

Muitas espécies de *Cecropia* abrigam formigas do gênero *Azteca* (Dolichoderinae) Forel., as quais protegem a planta ao combater insetos herbívoros e trepadeiras. Em troca, as plantas fornecem abrigo, locais para nidificação e alimento para as formigas (Janzen 1973). As formigas ocupam a região interna do caule oco e se alimentam de corpúsculos müllerianos, estruturas ricas em glicogênio, produzidas em regiões pilosas presentes nas axilas das folhas, denominadas triquílias (Gonsales *et al.* 2002).

As formigas constituem um terço da biomassa dos insetos das florestas tropicais úmidas da América do Sul e pertencem a uma única família, Formicidae da Ordem Hymenoptera (Wilson 1987). Existem cerca de 20.000 espécies de formigas, as quais são distribuídas em linhagens evolutivas com grande sucesso ecológico. Isto se deve ao fato de ser o primeiro grupo de predador social a ter explorado o solo e a vegetação da superfície da Terra. A grande diversidade do grupo é oriunda das variedades de nidificação, preferências alimentares e comportamento social com divisão de trabalho (Wilson 1987; Hölldobler & Wilson 1990).

A interação das formigas com as plantas pode dar-se de diferentes maneiras. Elas podem atuar como dispersoras de sementes, polinizadoras, herbívoras, além de utilizá-las como hospedeiras para a nidificação, como é o caso das formigas *Azteca*, as quais constroem seus ninhos preferencialmente nos ocos de árvores do gênero *Cecropia* (Longino 1989b). Um dos fatores que reforçam a possível obrigatoriedade desta relação mutualística é a

possibilidade de as plantas também aproveitarem o nitrogênio proveniente das carcaças de formigas e subprodutos (Janzen 1969; Agrawal & Dubin-Thaler 1999; Sagers *et al.* 2000).

Espécies de formigas que se associam a plantas mirmecófitas geralmente desenvolvem uma forte relação de fidelidade com a planta hospedeira (Bronstein *et al.* 2006), mas raramente há associações espécie-específicas (Fonseca & Ganade 1996; Guimarães *et al.* 2007). Porém, podem-se encontrar interações de formigas e plantas que sejam espécie-específicas, mesmo que raras, dentro do gênero *Azteca* e *Cecropia* (Longino 1991a). Por exemplo, existem relatos de espécies diferentes de *Cecropia* sendo ocupadas pela mesma espécie de *Azteca* e de até cinco espécies de *Azteca* ocorrendo em uma mesma planta hospedeira (Longino 1991a).

De uma maneira geral, plantas do gênero *Cecropia* ocorrem em locais de vegetação naturalmente aberta e/ou degradada por atividades antrópicas (Vieira *et al.* 2010). Essa característica favorece a ocupação de formigas com comportamento menos agressivo, nidificação periférica e efêmera, quanto a sua permanência na planta hospedeira, devido à dinâmica do habitat, que se caracteriza principalmente pela instabilidade de microclima (Longino 1991b).

Em contrapartida, em habitats mais protegidos, com menor ação antrópica e naturalmente mais fechados ocorrem outras espécies de *Cecropia* provavelmente mais adaptadas ao sombreamento e a níveis mais altos de umidade (Silva-Matos 2005; Berg & Rosseli 2005). Essas apresentam em geral, estrutura adaptada a esses habitats, fazendo com que haja, inclusive, modificações morfológicas nas plantas, como troncos mais largos no local de nidificação, bem como um comportamento diferenciado das formigas hospedeiras (Longino 1991b).

Nos indivíduos de áreas protegidas, ocorrem formigas mais agressivas, que defendem melhor a planta, apresentando uma relação mais estreita entre as espécies (Longino 1989). Isso pode ser uma diferenciação na intensidade da interação *Azteca-Cecropia* dependendo das espécies que estiverem sendo relacionadas (Agrawal 1998). Assim têm-se um padrão de ocorrência de *Cecropia*, possivelmente determinado por fatores históricos, reprodutivos e ecológicos que podem guiar a colonização de *Azteca* (McKey 1984). Essa idéia baseia-se na hipótese do habitat influenciar a distribuição das plantas e na não

aleatorização da colonização de plantas por formigas (Dáttilo *et al.* 2009; Grangier *et al.* 2009).

Para auxiliar no entendimento da distribuição de espécies, utilizam-se, dentre outras técnicas, a modelagem de nicho (Sillero 2011). A partir da modelagem de nicho ecológico, pode-se identificar características ambientais favoráveis à sobrevivência de uma espécie, bem como visualizar o resultado no espaço geográfico sob diferentes cenários ambientais (Sillero 2011). O contexto da aplicação de modelos aproxima-se mais do conceito de nicho fundamental de Hutchinson (1957) pela utilização exclusiva de fatores abióticos. Os resultados de modelos podem indicar uma distribuição potencial de uma espécie, mas dificilmente apontarão para a distribuição real da mesma (Soberón & Peterson 2005).

Diversos estudos foram realizados visando à aplicação de modelos de nicho ecológico na definição de estratégias para a conservação, visto que podem auxiliar na escolha de áreas prioritárias (Ferrier *et al.* 2002; Nelson & Boots 2008), indicar áreas para reintrodução de espécies (Pearce & Lindenmayer 1998), direcionar a busca por novas populações (Bourg *et al.* 2005; Guisan *et al.* 2006), prevenir a invasão de espécies exóticas em habitats de espécies ameaçadas (Higgins *et al.* 1999; Peterson 2003), avaliar o impacto de mudanças climáticas (Araújo & New 2007; Hannah *et al.* 2007), avaliar o risco de exposição a doenças (Peterson *et al.* 2006; Peterson *et al.* 2007), direcionar ações de recomposição de áreas degradadas (Siqueira 2005) entre outras aplicações. As plantas do gênero *Cecropia* têm uma distribuição e diversificação, aliadas à importância ecológica de suas espécies, tornando-a particularmente relevante como objeto de estudo para geração de modelos de distribuição potencial com fins de conservação.

Questões de genética populacional das espécies do gênero *Cecropia* e do gênero *Azteca* (Barnes *et al.* 1998) apontaram à necessidade dos estudos envolvendo biodiversidade e genética ecológica, que considera a variação das espécies e suas propriedades adaptativas com relação ao ambiente nas quais estão inseridas. A preocupação com a conservação dos recursos genéticos requer conhecimento de como estes se encontram distribuídos na natureza (Williams 1991). Cada população representa uma fonte de variabilidade genética com adaptações a condições específicas, ou seja, material com

potencialidades para melhoramento, uso e conservação genética, com possível aproveitamento econômico (Willians 1991).

A genética molecular está consolidada como uma ferramenta importante para estudos evolutivos dos mais variados táxons e tem fornecido dados muito úteis para embasar o estabelecimento de programas de preservação e monitoramento de espécies em geral (Rezende *et al.* 2010). Para investigação de genética populacional pode-se explorar regiões ricas em microssatélites sem utilizar o sequenciamento de DNA e, para isso, foi desenvolvido um método denominado “Inter Simple Sequence Repeat” (ISSR) (Zietkiewicz *et al.* 1994). O princípio da técnica é baseado na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e envolve a amplificação de segmentos de DNA entre duas regiões repetidas invertidas de microssatélite (Godwin *et al.* 1997). ISSR-PCR é uma técnica relativamente simples, rápida e eficiente e, devido ao uso de *primers* longos, os produtos amplificáveis apresentam alta reprodutibilidade (Bornet & Branchard 2001; Reddy *et al.* 2002). Por causa da abundância de regiões microssatélites no genoma, a técnica de ISSR tem sido muito utilizada para estudar relações entre populações muito próximas (Huang & Sun 2000; Deshpande *et al.* 2001), como em estudos de genética de populações (Gupta *et al.* 1994) e na avaliação da variabilidade genética em melhoramento de plantas (Mcgregor *et al.* 2000)

Dentre os estudos de genética molecular, destacam-se aqueles com abordagens em análises filogeográficas e populacionais de várias espécies de formigas (Goropashnaya *et al.* 2004; Ahrens *et al.* 2005; Miller & Allsopp 2005; Azuma *et al.* 2006; Solomon *et al.* 2008; Ahern *et al.* 2009; Rezende *et al.* 2010). Um dos marcadores genéticos utilizados nesses estudos populacionais é o DNA mitocondrial (mtDNA), por apresentar, entre outras características, padrão de herança uniparental, ausência de recombinação e rápida taxa de evolução, características estas, consideradas importantes em estudos de estrutura populacional (Shoemaker *et al.* 2006; Abbott *et al.* 2007; Drescher *et al.* 2007; Quek *et al.* 2007; Avise 2009; Norgate *et al.* 2009; Bromilow & Sperling 2011; Triponez *et al.* 2011). Além disso, por ser de herança materna, o mtDNA é considerado muito útil em estudos de populações de insetos sociais onde as fêmeas são responsáveis pela dispersão e formação de novas colônias (Sarnat & Moreau 2011). Dentre os genes mitocondriais mais

utilizados nesses estudos encontram-se os que codificam para Citocromo Oxidase I (COI), Citocromo Oxidase II (COII) e Citocromo b (Cytb), que têm permitido estudos populacionais, reconstrução da filogenia e a filogeografia de diversos táxons de formigas (Ahrens *et al.* 2005; Azuma *et al.* 2006; Sarnat & Moreau 2011). O gene codificador da proteína da COII e o da COI (que se refere à sequência mais conservada em termos da evolução de aminoácidos) têm sido extensamente estudados devido a propostas de utilizá-los como um “DNA barcoding” (código de barras de DNA) na diferenciação e identificação de espécies de animais (Simon *et al.* 1994; Herbert *et al.* 2003; Ratnasingham & Hebert *et al.* 2007).

Considerando isso, este estudo teve como objetivos: 1. oferecer informações sobre a ocorrência e a estrutura populacional de *Cecropia pachystachya*, *C. glaziovii* e *C. saxatilis*; 2. registrar os pares mutualísticos formados com formigas do gênero *Azteca*; 3. caracterizar os ambientes de ocorrência desses pares de mutualistas; 4. simular uma distribuição potencial por meio de modelagem de nicho para as espécies ocorrentes no sul da Mata Atlântica e no núcleo do Cerrado; 5. verificar a genética populacional por meio de marcadores ISSR para *Cecropia*; 6. verificar a estrutura filogenética de *Azteca alfari* e *A. muelleri* com marcador do gene mitocondrial (COI).

O presente estudo será dividido em dois capítulos que abrangem os objetivos acima, sendo o capítulo um intitulado “A interação *Cecropia-Azteca* em áreas de Cerrado e Mata Atlântica: distribuição geográfica e variações interespecíficas” e capítulo dois, intitulado “Genética molecular e populacional de *Cecropia* e *Azteca* em áreas de Cerrado e Mata Atlântica”.

REFERÊNCIAS

Abbott, K.L., Greaves, S.N.J., Ritchie, P.A. & Lester, P.J., 2007. Behaviorally and genetically distinct populations of an invasive ant provide insight into invasion history and impacts on a tropical ant community. *Biological Invasions*. 9: 1573-1464.

Agrawal, A.A. & Dubin-Thaler, B.J., 1999. Induced responses to herbivory in the Neotropical ant-plant association between *Azteca* ants and *Cecropia* trees: response of ants to potential inducing cues. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 45: 47-54.

Agrawal, A.A., 1998. Leaf damage and associated cues induce aggressive ant recruitment in a Neotropical ant-plant. *Ecology*. 79: 2100–2112.

Ahern, R.G., Hawthorne, D.J., Raupp, M.J., 2009. Phylogeography of a specialist insect, *Aedes cooleyi*: historical and contemporary process shape the distribution of population genetic variation. *Molecular Ecology*. 18: 343-356.

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.

Araújo, M.B. & New, M., 2007. Ensemble forecasting of species distributions. *Trends in Ecology & Evolution*. 22(1): 42-47.

Avise, J.C., 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*. 36: 3-15.

Azuma, N., Kunihiro, Y., Sasaki, J., Nozawa, Y., Mihara, E., Mihara, M., Yasunaga, Abe, S., 2006. Genetic variation of hair crab (*Erimacrus isenbeckii*) inferred from mitochondrial DNA sequence analysis. *Fish Genetics and Breeding Science*. 35: 35-42.

Azuma, N., Ogata, K., Kikuchi, T., Higashi, S. 2006., Phylogeography of Asian weaver ants, *Oecophylla smaragdina*. *Ecological Research*. 21: 126-136.

Barnes, B.V., Zak, D.R., Denton, S.R., & Spurr, S.H., 1998. *Forest Ecology*. 4a. Edição. John Wiley and Sons. New York. 687p.

Berg, C.C. & Rosselli, P.F., 2005. *Cecropia*. New York Botanical Garden Press. New York. 236p.

Berg, C.C., 1978. Cecropiaceae, a new family of Urticales. *Taxon*. 27:39-44.
Berg, C.C., Akkermans, R.W.A.P. & van Heusden, E.C.H., 1990. Cecropiaceae: *Coussapoa* and *Pourouma*, with an introduction to the family. New York Botanical Garden, New York. *Flora neotropica*. 208 p.

Bornet B. & Branchard M., 2001. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter*. 19: 209-215.

Bourg, N.A., McShea, W.J., & Gill, D.E., 2005. Putting a CART before the search: Successful habitat prediction for a rare forest herb. *Ecology*. 86: 2793-2804.

Braga, B., Hespanhol, I., Conejo, J.G.L., Mierzwa, J.C, Barros, M.T.L., Spencer, M. Porto, M., Nucci, N., Juliano, N., Eiger, S., 2004. *Introdução à Engenharia Ambiental*. Editora Pearson, Prentice Hall. São Paulo. 336p.

Bromilow, S.M., Sperling, F.A.H., 2011. Phylogeographic signal variation in mitochondrial DNA among geographically isolated grassland butterflies. *Journal of Biogeography*. 38(2): 299-310.

Bronstein, J.L., Alarcon, R., Geber, M., 2006. The evolution of plant-insect mutualisms. *New Phytologist*. 172: 412–28.

Byk, J. & Del-Claro, K. 2010. Nectar- and pollen-gathering *Cephalotes* ants provide no protection against herbivore: a new manipulative experiment to test ant protective capabilities. *Acta Ethologica*. 13: 33-38.

Cardel, Y.J., Koptur, S., 2010. Effects of florivory on the pollination of flowers: an experimental field study with a perennial plant. *International Journal of Plant Sciences*, 171: 283-292.

Dáttilo, W.F.C., Izzo, T.J., Inouye, B.D., Vasconcelos, H.L. & Bruna, E.M., 2009. Recognition of host plant volatiles by *Pheidole minutula* Mayr (Myrmicinae), an amazonian ant-plant specialist. *Biotropica*. 41: 642-646.

Del-Claro, K., 2004. Multitrophic relationships, conditional mutualisms, and the study of interaction biodiversity in tropical savannas. *Neotropical Entomology*. 33(6): 665-672.

Deshpande, K.U., Apte, G.S., Bahulikar, R.A., Lagu, M.D., Kulkarni, B.O., Suresh, H.S., Singh, N.P., Rao, M.K., Gupta, V.S., Pant, A., Renjekar, P.K., 2001. Genetic diversity across natural populations of montane plant species from the Western Ghats, India revealed by inter-simple sequence repeats. *Molecular Ecology* 10: 2397-2408.

Drescher, J., Blüthgen, N. & Feldhaar, H., 2007. Population structure and intraspecific aggression in the invasive ant species *Anoplolepis gracilipes* in Malaysian Borneo. *Molecular Ecology*. 16: 1453-1465. *Ecography*. 31: 556-566.

Edwards, D.P., Yu, D.W., 2008. Tolerating castration by hiding flowers in plain sight. *Behavior Ecology Sociobiology*. 63: 95-102.

Ferrier, S., Watson, G., Pearce, J. & Drielsma, M., 2002. Extended statistical approaches to modelling spatial pattern in biodiversity: the north-east New

South Walles experience. I. Species-level modelling. *Biodiversity and Conservation*. 11: 2275-2307.

Fonseca, C.R., Ganade, G., 1996. Asymmetries, compartments and null interactions in an amazonian ant-plant community. *The Journal of Animal Ecology*. 65: 339-347.

Godwin, I.D., Aitken, E.A.B. & Smith, L.W., 1997. Application of inter-simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis*. 18: 1524–1528.

Gonsales, E.M.L., Melo, F.P.L., Romero, G.Q., Mokross, K. & Menezes, S., 2002. Controle da estrutura de colônias de formigas *Azteca alfari* (Hymenoptera, Formicidae) pela mirmecófita *Cecropia purpurascens* (Cecropiaceae), pp. 12-14. *In: Ecologia da Floresta Amazônica*. (Venticinque, E.M. & Zuanon, J., org.). PDBFF. Manaus.

Goropashnaya, A.V., Fedorov, V.B., Seifert, B. & Pamilo, P., 2004. Limited phylogeographical structure across Eurasia in two red wood ant species *Formica pratensis* and *F. lugubris* (Hymenoptera, Formicidae). *Molecular Ecology*. 13:1849-1858.

Grangier, J., Dejean, A., Malé, P.J.G., Solano, P.J. & Orivel, J. 2009. Mechanisms driving the specificity of a myrmecophyte-ant association. *Biological Journal of the Linnean Society*. 97 : 90-97.

Guimarães Jr., P.R., Rico-Gray, V., Oliveira, P.S., Izzo, T.J., Reis, S.F. & Thompson, J.N. 2007. Interaction intimacy affects structure and coevolutionary dynamics in mutualistic networks. *Current Biology*. 17: 1797-1803.

Guisan, A., Lehmann, A., Ferrier, S., Austin, M., Overton, J.MC.C., Aspinall, R. & Hastie, T., 2006. Making better biogeographical predictions of species distributions. *Journal of Applied Ecology*. 43: 386-392.

Gupta, M., Chyi, Y-S., Romero-Severson, J. & Owen, J.L., 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single *primers* of simple-sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetic*. 89: 998–1006.

Hannah, L., Midgley, G., Andelman, S., Araújo, M., Hughes, G., Martinez-Meyer, E., Pearson, R. & Williams, P., 2007. Protected area needs in a changing climate. *Frontiers in Ecology and the Environment*. 5: 131-138.

Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. & deWaard, J.R., 2003 Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society London*. B270: 313–322.

Heil, M. & Mckey, D., 2003. Protective ant-plant interactions as model systems in ecological and evolutionary research. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 34:425–453.

Higgins, S.I., Richardson, D.M., Cowling, R.M. & Trinder-Smith, T.H., 1999. Predicting the landscape-scale distribution of alien plants and their threat to plant diversity. *Conservation Biology*. 13: 303-313.

Hölldobler, B. & Wilson, E.O., 1990. *The ants*. The Belknap press of Harvard University Press, Cambridge, Mass. 732p.

Huang, J., & Sun, S.M., 2000. Genetic diversity and relationships of sweet potato and its wild relatives in *Ipomoea* series *Batatas* (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA. *Theoretical and Applied Genetics*. 100: 1050–1060.

Hutchinson, G.E., 1957. Concluding remarks. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 22(2): 415–427.

Izzo, T.J., Peneti-Benelli, A., 2011. Relação entre diferentes espécies de formigas e a mirmecófita *Cordia nodosa* Lamarck (Boraginaceae) em áreas de mata ripária na Amazônia mato-grossense. *Acta Amazônica*. 41(3):355-360.

Janzen, D.H. 1973. Dissolution of mutualism between *Cecropia* and its *Azteca* ants. *Biotropica*. 5:15-28.

Janzen, D.H., 1969. Allelopathy by myrmecophytes: the ant *Azteca* as an allelopathic agent of *Cecropia*. *Ecology*. 50:147-153.

Kricher, J.C., 1997. *A neotropical companion: an introduction to the animals, plants, and ecosystems of the new world tropics*. Princeton University Press. Princeton. 451p.

Longino, J.T. 1989a. Geographic variation and community structure in an ant-plant mutualism: *Azteca* and *Cecropia* in Costa Rica. *Biotropica*. 21:126-132.

Longino, J.T. 1989b. Taxonomy of the *Cecropia*-inhabiting ants in the *Azteca alfari* species group: evidence for two broadly sympatric species. *Contributions in Science (Natural History Museum of Los Angeles County)*. 412:1-16.

Longino, J.T. 1991a. *Azteca* ants in *Cecropia* trees: taxonomy, colony structure, and behavior. Pages 271-288. *In*: Huxley, C. & Cutler, D. (Editors). *Ant-plant interactions*. Oxford University Press. Oxford.

Longino, J.T. 1991b. Taxonomy of the *Cecropia*-inhabiting *Azteca* ants. *Journal of natural history*. 25:1571-1602.

McGregor, C.E., Lambert, C.A., Greyling, M.M., Louw, J.H. & Warnich, L., 2000. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L) germplasm. *Euphytica*. 113: 135–144.

McKey, D., 1984. Interaction of the ant-plant *Leonardoxa africana* (Caesalpiniaceae) with its obligate inhabitants in a rainforest in Cameroon. *Biotropica*. 16: 81-99.

Miller, L.J., Allsopp, P.G., 2005. Phylogeography of the scab beetle *Antitrogus parvulus* Britton (Coleoptera: Scarabaeidae) in south-eastern Queensland, Australia. *Australian Journal of Entomology*. 44: 29-36.

Nelson, T.A. & Boots, B., 2008. Detecting spatial hot spots in landscape ecology. *Ecography*. 31: 556-566.

Norgate, M., Chamings, J., Pavlova, A., Bull, J.K., Murray, N.D., Sunnucks, P. 2009. Mitochondrial DNA indicates late pleistocene divergence of populations of *Heteronympha merope*, an emerging model in environmental change biology. *Plos One*, San Francisco. 4(11): e7950.

Parolin, P., 2002. Life history and environment of *Cecropia latiloba* in Amazonian floodplains. *Revista de Biologia Tropical*. 50(2):531-545.

Pearce, J. & Lindenmayer, D., 1998. Bioclimatic analysis to enhance reintroduction biology of the endangered helmeted honeyeater (*Linchenostomus melanops cassidix*) in southeastern Australia. *Restoration Ecology*. 6: 238-243.

Peterson, A.T., 2003. Predicting the geography of species invasions via Ecological Niche Modeling. *Quarterly Review of Biology*. 78(4): 419-433.

Peterson, A.T., Benz, B.W. & Papeş, M., 2007. Highly pathogenic H5N1 avian influenza: Entry pathways into North America via bird migration. *PLoS ONE*. 2: e261.

Peterson, A.T., Lash, R.R. Carroll, D.S. & Johnson, K.M., 2006. Geographic potential for outbreaks of Marburg hemorrhagic fever. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*. 75: 9-15.

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: 2045-2063.

Ratnasingham, S., Hebert, P.D.N., 2007. Bold: The barcode of life data system (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes*. 7: 355-364.

Reddy, P.M., Sarla, N., Siddiq, E.A., 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*. 128(1): 9-17.

Resende, H.C., Yotoko, K.S.C., Delabie, J.H.C., Costa, M.A., Campiolo, S., Tavares, M.G., Campos, L.A.O., Fernandes-Salomão, T.M., 2010. Pliocene and Pleistocene events shaping the genetic diversity within the central corridor of the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Journal of the Linnean Society*. 101:949-960.

Sägers C.L., Ginger, S.M., & Evans, R.D., 2000. Carbon and nitrogen isotopes trace nutrient exchange in an ant-plant mutualism. *Oecologia*. 123: 582-586.

Sarnat, E.M. & Moreau, C.S. 2011. Biogeography and morphological evolution in a Pacific island ant radiation. *Molecular Ecology*. 20: 114-130.

Shoemaker, D.D., Ahrens, M.E., Ross, K.G., 2006. Molecular phylogeny of fire ants of the *Solenopsis saevissima* species-group based on mtDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 38: 200-215.

Sillero, N., 2011. What does ecological modelling model? A proposed classification of ecological niche models based on their underlying methods. *Ecological Modelling*. 222(8): 1343-1346.

Silva-matos, D.M., Fonseca, G.D.F.M.; Silva-lima, L., 2005. Differences on post-fire regeneration of the pioneer trees *Cecropia glazioui* and *Trema micrantha* in a lowland Brazilian Atlantic Forest. *Revista de Biología Tropical*. 53(1-2): 1-4.

Simon, C., Frati, F., Bechenbach, A., Crespi, B., Liu, H. & Flook, P., 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequence and compilation of conserved polymerase chain reaction *primers*. *Annals of the Entomological Society of America*. 87: 651-701.

Siqueira, M.F., 2005. Uso de Modelagem de nicho fundamental na avaliação do padrão de distribuição geográfica de espécies vegetais. Tese de Doutorado. Ciências da Engenharia Ambiental, Escola de Engenharia de São Carlos, USP.

Soberón, J. & Peterson, A.T., 2005. Interpretation of models of fundamental ecological niches and species distributional areas. *Biodiversity Informatics*. 2: 1–10.

Solano, P.J., Belin-Depoux, M., Dejean, A., 2005. Formation and structure of food bodies in *Cordia nodosa* (Boraginaceae). *Comptes Rendus Biologies*. 328: 642-647.

Solomon, S.E., Bacci-Jr, M., Martins-Jr, J., 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: 1-15.

Triponez, Y., Buerki, S., Borer, M., Naisbit, R.E., Rahier, M., Alvarez, N. 2011. Discordances between phylogenetic and morphological patterns in alpine leaf beetles attest to an intricate biogeographic history of lineages in postglacial Europe. *Molecular Ecology*. 20(11): 2442-2463.

Vasconcelos, H.L., Davidson, D.W., 2000. Relationship between plant size and ant associates in two amazonian ant-plants. *Biotropica*. 32: 100-101.

Vieira, A.S., Odival, F., Antonialli-Junior, W.F. & Fernandes, W.D. 2010. Nest structure and occurrence of three species of *Azteca* (Hymenoptera, Formicidae) in *Cecropia pachystachya* (Urticaceae) in non-floodable and floodable pantanal areas. *Revista Brasileira de Entomologia*.54(3): 441-445.

Williams, J.T., 1991. Scientific issues affecting gene conservation and exploitation of some tropical perennials. *In*: Gustafson, P., Appels, R., Raven, P. (Eds.). *Gene conservation and exploitation*. New York: Plenum Press. pp. 15-28.

Wilson, E.O., 1987. Causes of ecological success: the case of the ants. *The Journal of Animal Ecology*. 56: 1-9.

Zarbin, P.H.G., 2009. Feromônios de insetos: tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil. *Química Nova*. 32(3): 2151-2158.

Zietkiewicz, E., Rafalski, A. & Labuda, D., 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*. 20: 176–183.

CAPÍTULO I

**A interação *Cecropia-Azteca* em áreas de Cerrado e Mata Atlântica:
distribuição geográfica e variações interespecíficas**

RESUMO

A interação *Cecropia-Azteca* tem ampla distribuição na região neotropical. Sua ocorrência pode estar associada a características do habitat refletindo em variações de pares mutualísticos. Este trabalho teve o objetivo de avaliar a distribuição geográfica real e potencial de três espécies do gênero *Cecropia* e as formigas do gênero *Azteca* associadas, descrever a estrutura populacional dessas plantas nos locais de ocorrência e verificar quais os pares mutualísticos formados entre *Cecropia-Azteca*. O estudo foi realizado em onze pontos da porção sul da Mata Atlântica e oito pontos da região central do Cerrado. Em cada área foram amostrados 20 indivíduos de *Cecropia* e 20 exemplares de *Azteca* correspondentes a cada árvore. Foram realizadas medidas morfométricas das árvores para interpretação de estrutura populacional. As espécies encontradas foram *Cecropia pachystachya* associada a *Azteca alfari*, *C. glaziovii* associada a *A. muelleri* e *C. saxatilis* associada a *A. alfari*. Na distribuição geográfica observada, *C. pachystachya*, mostrou-se mais amplamente distribuída e apresentou menor porte entre as espécies coletadas, pois ocorreu na Mata Atlântica e no Cerrado em áreas abertas e com antropização bem aparente, *C. glaziovii*, apresentou maior porte e foi observada apenas em Mata Atlântica em áreas mais protegidas e *C. saxatilis*, de porte intermediário, foi observada exclusivamente em Cerrado em áreas naturalmente abertas. O comportamento das formigas em relação à defesa da planta e dos ninhos e a forma de nidificação são parâmetros de intensidade dessa interação. Gerou-se um mapa de distribuição geográfica potencial para cada espécie de *Cecropia* que mostraram mais coerência com a distribuição observada para *C. pachystachya* e *C. saxatilis* do que para *C. glaziovii*.

Palavras-chave: mutualismo, plantas pioneiras, modelagem de nicho

ABSTRACT

The interaction *Cecropia-Azteca* has wide distribution in the tropics. Its occurrence may be associated with habitat characteristics reflecting variations in pairs mutualistic. This study aimed to evaluate actual and potential geographic distribution of the genus *Cecropia* and ants of the genus *Azteca* associates, describe the population structure of these plants in the places of occurrence and determine which pairs mutualistic formed between *Cecropia* and *Azteca*. The study was conducted in eleven areas of the southern portion of the Atlantic Forest and eight areas of the core region of the Cerrado. In each area we sampled 20 individuals of *Cecropia* and 20 *Azteca* specimens for each tree. Morphometric measures were taken from the trees to the interpretation of population structure. The species found were: *Cecropia pachystachya* associated with *Azteca alfari*, *C. glaziovii* associated with *A. muelleri* and *C. saxatilis* associated with *A. alfari*. The geographical distribution observed, *C. pachystachya*, was more widely distributed and presented smaller among species sampled, as occurred in the Atlantic Forest and the Cerrado in open areas and with readily apparent human disturbance, *C. glaziovii* presented larger and was only observed in the Atlantic Forest in more protected areas and *C. saxatilis*, of intermediate size, was observed exclusively in Cerrado areas naturally open. The behavior of ants in relation to plant defense and nests, and nesting way, act as parameters for the intensity of this interaction. Created a map of potential geographic distribution for each species of *Cecropia* showed more consistent with the observed distribution for *C. pachystachya* and *C. saxatilis* than for *C. glaziovii*.

Keywords: mutualism, pioneer plants, niche modeling

1 INTRODUÇÃO

O entendimento dos processos ecológicos das populações vegetais são parâmetros importantes que norteiam ações de conservação e manejo (Longui *et al.* 2009). Muitos estudos em ecologia vegetal têm usado a análise espacial para detectar padrões em comunidades vegetais e entender a distribuição dos indivíduos e a sua relação com os fatores que influenciam a estruturação populacional (Fortin *et al.* 2002).

Padrões de distribuição de espécies podem ser investigados em (pelo menos) duas escalas de análise: a) escala local, com três padrões básicos de distribuição espacial (aleatório, agrupado e uniforme) (Ludwig & Reynolds 1988, Krebs 1999); b) escala regional, considerando a ocorrência das espécies *in loco* ou acessando diversas bases de dados e coleções biológicas (Turner *et al.* 2001). Tais informações podem ser consideradas como nicho realizado de uma determinada espécie conforme ideia proposta por Hutchinson (1957).

Numa abordagem baseada na teoria de nicho, usa-se para a predição da distribuição de espécies em um espaço geográfico, representações com mapas de sua distribuição, associando registros de ocorrência com fatores ambientais (Patten & Auble 1981). Trata-se de uma distribuição potencial a qual considera o nicho ecológico como modelo básico que sustenta a possibilidade de produzir predições sobre a ocorrência de espécies (Peterson 2001; Thuiller *et al.* 2005; Elith *et al.* 2006; Stockwell 2006). A fundamentação principal está na definição de nicho como o conjunto de condições e recursos nos quais os indivíduos de uma espécie são capazes de sobreviver, crescer e reproduzir (De Marco Jr & Siqueira 2009).

Espécies do gênero *Cecropia* Loefl. (Urticaceae) são amplamente distribuídas nos neotrópicos. No Brasil ocorrem em todos os biomas em ambientes diversificados. Dentre esses biomas, destaca-se o Cerrado e a Mata Atlântica, que fazem parte dos 34 *Hotspots* mundiais, que são consideradas áreas prioritárias para conservação (CI Brasil 2005). O Cerrado com 2.045.064 km² e suas diversas formações está concentrado na região central do Brasil, porém segundo IBAMA 2007, considera-se que há outras áreas de Cerrado, chamadas periféricas ou ecotonais, que são transições com os biomas

Amazônia, Mata Atlântica e Caatinga. A Mata Atlântica, com 1.363.000 Km² de área ou 15% do território brasileiro, se estende dos Estados do Rio Grande do Sul ao Piauí, apresentando diversas formas de relevo, paisagens e características climáticas diversas. No entanto, uma característica comum é sua alta diversidade biológica (IBAMA 2007).

Muitas espécies do gênero *Cecropia*, conhecidas como mirmecófitas, possuem estruturas adaptadas para abrigar ninhos de formigas, especialmente as do gênero *Azteca* Forel., que conferem à planta defesa contra herbívoros (Davidson *et al.* 1991; Vasconcelos 1993). As espécies do gênero *Cecropia* apresentam caules ocos que proporcionam abrigo para o estabelecimento de formigas, (Ribeiro *et al.* 1999). Essa interação é amplamente estudada (Longino 1989, 1992, Davidson *et al.* 1991, Vasconcelos 1993) em virtude da distribuição geográfica de *Cecropia* nos neotrópicos (Longino 1989). Podem existir outros pares mutualísticos de outros gêneros de formigas com *Cecropia* (Longino com. pess.), porém com menos frequência que *Azteca* (Davidson *et al.* 1991).

Este estudo teve como objetivos: a) verificar a ocorrência e a estrutura populacional de espécies do gênero *Cecropia* da região central do Cerrado até áreas de Mata Atlântica no Sul e no Sudeste; b) caracterizar os locais de ocorrência das plantas de *Cecropia* e das formigas *Azteca* associadas; c) registrar os pares mutualísticos formados entre as espécies de *Cecropia* e *Azteca* e d) simular a distribuição geográfica potencial através da modelagem de nicho ecológico para as espécies de *Cecropia* ocorrentes nas áreas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi realizado entre os anos de 2009 e 2012 abrangendo as regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Norte, e sete Estados brasileiros: Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Goiás e Tocantins. Os trechos percorridos estão contidos nos dois *Hotspots* de biodiversidade do Brasil: Cerrado e Mata Atlântica (CI Brasil 2005).

Dentro do bioma Mata Atlântica no Sul do Brasil, percorreu-se trechos de Floresta Ombrófila Densa, Floresta Ombrófila Mista, Floresta Estacional Semi-Decidual, em altitudes que variaram de zero (litoral) a 1.200 metros (planalto de Guarapuva-PR). Nos Estados do Sudeste percorreram-se áreas de Bioma Mata Atlântica e Cerrado. As formações predominantes foram a de Floresta Estacional e Cerrado *stricto sensu* nos Estados de São Paulo e Minas Gerais. Na região Centro-Oeste e Norte o Bioma preponderante nesse estudo foi o Cerrado, pois a amostragem se restringiu a região central do Cerrado nos Estados de Mato Grosso do Sul, Goiás e Tocantins (Figura 1).

2.2 COLETA DE DADOS

Para verificar a ocorrência das espécies de *Cecropia* e das formigas *Azteca* associadas foram percorridas as principais estradas, algumas secundárias e algumas trilhas, da região subamazônica brasileira. Um total de 4.000 km foram percorridos nas áreas pertencentes ao Bioma Mata Atlântica e 4.500 km em formações de Cerrado. Para fins de registro de ocorrência foi observado durante todo o trajeto a presença, quando avistado pelo menos um indivíduo, ou a ausência de indivíduos de *Cecropia* nas margens das estradas.

Para caracterizar os locais de ocorrência de *Cecropia* e das formigas *Azteca* associadas, foram registradas informações sobre o posicionamento

geográfico e variáveis ambientais como temperatura, umidade, altitude e formação vegetal específica. Utilizou-se a caracterização do IBGE 2004 para referenciar os Biomas e detalhou-se sobre a formação vegetal quando necessário.

Para descrever a estrutura populacional de *Cecropia* foram selecionados dois pontos de coleta em cada Estado, e sete pontos no Paraná, com 20 indivíduos de *Cecropia* em cada ponto. Foram medidos altura, circunferência a altura do peito (CAP) e número de ramificações de todos os indivíduos coletados. Para estabelecer um valor numérico representativo do tamanho dos indivíduos arbóreos foi empregada a seguinte fórmula: Tamanho=(CAP/altura) x nº ramificações. Foi testada de maneira preliminar a correlação entre altura e CAP das plantas e obteve-se um resultado positivo. Assim, obteve-se uma razão entre as variáveis que posteriormente foi multiplicada pelo número de ramificações de cada árvore.

Para a análise da estrutura vertical (altura) e horizontal (circunferência) dos indivíduos foram utilizados histogramas de frequência, com intervalos de classes determinados a partir da fórmula de Spiegel (Felfili & Resende 2003): $IC = A / nc$, onde A é a amplitude das classes e nc é o número de classes, sendo que $nc = 1 + 3,3 \log(n)$, onde n representa o número de indivíduos. Os indivíduos amostrados foram também classificados em três categorias de altura adaptadas da proposta geral de Müller-Dombois & Ellenberg (1974): classe I: indivíduos jovens (altura total < 1,60 m); classe II: indivíduos juvenis (altura total entre 1,61 – 3,00 m); classe III: indivíduos adultos (altura total > 3,00 m).

O registro dos pares mutualísticos em cada local foi obtido pela coleta de 20 indivíduos de *Cecropia* e cerca de 20 indivíduos de *Azteca* associados, por planta em um único ramo, incluindo a rainha por facilitar a identificação em nível específico. Para coletar as formigas residentes utilizou-se um método de ruptura do tronco para acessar os ninhos. As formigas foram coletadas com auxílio de pinça de ponta fina e posteriormente acondicionadas em tubos plásticos contendo álcool 70%. A identificação das formigas foi feita em laboratório com auxílio de lupa e os exemplares foram depositados no Longino Utah Ant Lab na Universidade de Utah – Salt Lake City – EUA. As plantas foram identificadas e depositadas no herbário HFC da UTFPR - Campo Mourão.

Os dados de ocorrência das três espécies de *Cecropia* foram compilados através de pesquisa em coleções científicas disponíveis na rede Specieslink (<http://splink.cria.org.br>) e revisão da literatura. Foram utilizadas as variáveis bioclimáticas, disponíveis em <http://www.dpi.inpe.br/Ambdata/>, e uma variável topográfica disponível em <http://www.ibge.gov.br/>. Estas variáveis são derivadas através da interpolação de dados obtidos em estações meteorológicas no período de 1950 a 2000, localizadas em várias partes do globo terrestre (Hijmans *et al.* 2005).

Para se obter a modelagem da distribuição potencial das espécies de *Cecropia*, utilizou-se o software openModeller e o algoritmo de Máxima Entropia (MaxEnt) versão 3.3.1. O MaxEnt baseia-se no princípio da máxima entropia, pois considera que a melhor aproximação para uma distribuição de probabilidades desconhecida é aquela que satisfaça qualquer restrição à distribuição. Trata-se de um método pra realizar previsões ou inferências a partir de informações incompletas (Philips *et al.* 2006).

Os dados ambientais AMBDATA são disponibilizados como grades, no formato ASCII-raster, projetados no sistema de coordenadas geodésicas de projeção “LatLong”, Datum WGS-84, com resolução espacial de 30 arc-segundos, ou aproximadamente 1 km. Os dados foram convertidos para grade no formato geotiff utilizando o aplicativo “My Geodata Converter” na opção converter raster. Os dados de distribuição das espécies *C. glaziovi*, *C. pachystachya* e *C. saxatilis*, foram disponibilizados sob a forma ASCII no formato padrão do open Modeller. Antes de utilizar os dados no openModeller os mesmos foram verificados e ajustados para que os nomes de uma mesma espécie mantivesse o mesmo padrão em todos os campos (normalizados).

Os dados biológicos foram carregados no programa openModeller Desktop (na opção Layerset manager), selecionando quais os dados ambientais seriam utilizados e qual a máscara para a área de dados (contorno da área de estudo - Brasil). Os resultados de modelagem foram plotados em mapas ambientais sugerindo uma distribuição potencial das espécies baseado na teoria de nichos. Os dados foram analisados através de mapas, tanto da distribuição observada como da distribuição potencial gerada pelos modelos, e os cálculos referentes às medidas morfométricas relacionadas à análise de estrutura populacional foi feita através do software PAST (Hammer *et al.* 2001).

O mesmo procedimento de modelagem de distribuição potencial não foi realizado para as formigas por dois limitantes: os dados de ocorrência são bastante raros com identificação em nível específico, uma vez que são poucos taxonomistas especialistas no gênero *Azteca*. Na maioria das consultas a coleções e dados disponíveis, as identificações se limitam ao nível de gênero. Isso poderia causar um erro bastante significativo nos parâmetros de modelagem, pois a correta identificação, que origina os dados de ocorrência, é algo essencial para esse tipo de análise (De Marco Jr & Siqueira 2009).

3 RESULTADOS

Na área total de estudo foram amostradas três espécies de plantas do gênero *Cecropia* sendo elas *C. glaziovii* (N=80), *C. pachystachya* (N=270) e *C. saxatilis* (N=40), e duas espécies de formigas do gênero *Azteca* sendo elas *A. alfari* (N aproximado de 3500) e *A. muelleri* (N aproximado de 1000).

A presença ou ausência das plantas avistadas estão representadas nas rotas percorridas, assim como os pontos onde foram coletadas (Figura 2). *Cecropia glaziovii* teve sua ocorrência observada exclusivamente em formações de Mata Atlântica do Sul do Brasil, especificamente em habitats pertencentes a formações de Floresta Ombrófila Densa nos Estados do Paraná e Santa Catarina e mais raramente em formações de Floresta Estacional Semi-Decidual no Estado do Paraná. Nesta espécie foi observada a formação de um único par mutualístico com a espécie *A. muelleri*.

Cecropia pachystachya foi observada tanto na Mata Atlântica como no Cerrado brasileiro, em ambientes mais abertos, sejam estes naturais ou antropizados. Esta espécie foi observada e coletada em formações de Cerrado *stricto sensu* nos Estados de Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo e em áreas de Floresta Estacional Semidecidual nos Estados do Paraná e São Paulo. Seu par mutualístico foi *A. alfari*.

Cecropia saxatilis foi observada apenas em formações de Cerrado, mas em sua porção mais ao Norte, uma vez que foi amostrada apenas no Estado do Tocantins. Assim como *C. pachystachya*, esta espécie foi hospedeira de *A. alfari*. As espécies *C. glaziovii* e *C. pachystachya* apresentaram-se coocorrentes no Paraná em formações de Floresta Estacional Semidecidual, especificamente no município de Campo Mourão, que apresenta um mosaico vegetacional de encaves de Cerrado, Floresta Ombrófila Mista e Floresta Estacional Semidecidual. Mesmo nesta área de coocorrência os pares mutualísticos se mantiveram (Tabela1).

As espécies de *Cecropia* apresentaram os seguintes valores médios de tamanho segundo a fórmula utilizada: *C. glaziovii* 18,39 ($\pm 44,82$), *C. saxatilis* 13,02 ($\pm 17,09$) e *C. pachystachya* 10,84 ($\pm 16,85$). As classes de tamanho predominantes nas três espécies de *Cecropia* coletadas foram as iniciais,

entretanto, houve nas três espécies de *Cecropia* poucos indivíduos jovens, predominando indivíduos plenamente estabelecidos (Figura 3).

Foi gerado um mapa de distribuição potencial para cada espécie de *Cecropia* (Figura 4). Para *C. glaziovii* o resultado do modelo potencial abrange predominantemente áreas da Mata Atlântica e áreas de transição principalmente com Cerrado, porém com maior probabilidade de ocorrência na região litorânea da Mata Atlântica. *C. pachystachya* mostrou maior potencial de expansão, uma vez que apresentou mais área na cor vermelha (probabilidade entre 80-100% de ocorrência) em relação às outras espécies. Sua distribuição potencial abrangeu grande parte da Mata Atlântica, grande parte do Cerrado brasileiro e poucas áreas de transição com a Caatinga. Em complemento, *C. saxatilis* teve um resultado de modelagem da distribuição potencial que abrange o Cerrado, parte da Caatinga e transições com a Amazônia (Figura 4).

4 DISCUSSÃO

As três espécies de *Cecropia* se mostraram amplamente distribuídas nos diversos habitats estudados, tanto no Cerrado quanto na Mata Atlântica. Em uma pequena porção do Estado de Santa Catarina e do Paraná as mesmas não foram avistadas provavelmente por alguma restrição ambiental do local, uma vez que podem existir fatores climáticos limitantes à sua distribuição (Berg & Rosseli 2005). Essas plantas parecem estar adaptadas a diferentes condições ambientais, o que pode resultar em uma distribuição mais ampla ou mais restrita, dependendo de quais espécies estejam sendo consideradas (Davidson 2005).

Cecropia glaziovii esteve presente exclusivamente em habitat de Mata Atlântica e predominantemente em formações de Floresta Ombrófila Densa. Segundo Berg e Rosseli (2005), essa espécie tem hábito que restringe sua distribuição principalmente a regiões de altitude entre 600-1.500 metros e em ambientes mais protegidos e úmidos. Foi observado neste estudo, ocorrência menos usual em formações de Floresta Estacional Semidecidual, com características de ambientes mais úmidos e protegidos.

Cecropia pachystachya mostrou-se a espécie mais amplamente distribuída na área de estudo. No Cerrado, observou-se a ocorrência em todos os tipos de habitat, contudo, na Mata Atlântica, foi registrada em áreas de Floresta Estacional semidecidual, geralmente em áreas antropizadas e em áreas de restinga, corroborando a revisão feita por Berg & Rosseli (2005) que cita esses tipos de ambientes como frequentes para essa espécie. *C. saxatilis* apesar de menos amostrada no estudo, também teve sua distribuição dentro dos limites geográficos observados por Berg & Rosseli 2005, restritos ao Cerrado até limites Amazônicos.

Existe um efeito de características do habitat na distribuição tanto nas espécies de *Cecropia* como nas espécies de *Azteca* associadas (Longino 1989). Assim, as variantes estruturais das plantas e os diferentes comportamentos das formigas residentes estão intimamente ligados às características do habitat e, como consequência, há uma distribuição dependente entre *Cecropia* e *Azteca*. Árvores de *Cecropia* mais adaptadas a

áreas abertas e frequentemente perturbadas, como é o caso de *C. pachystachya*, tendem a ser ocupadas pela espécie *A. alfari*, que apresenta comportamento de colonização nas extremidades dos caules, defendendo pouco seus ninhos (Harada & Benson, 1988; Longino 1989; Davidson *et al.* 1989; Clark & Clark 1993; Folgarait *et al.* 1994; Agrawal & Dubin-Thaler, 1999). Demonstra-se assim sinais de adaptação de *A. alfari* ao hábito pioneiro de *C. pachystachya*.

De forma análoga, as plantas adaptadas a locais mais confinados, como *C. glaziovii*, têm uma relação mais íntima com as formigas da espécie *A. muelleri*. Essa última interação se mostrou bastante integrada, pois as formigas defendem com maior agressividade os ninhos que são permanentes e no interior do fuste principal. Essa interação de plantas e formigas foi bastante explorada descrevendo a adaptação e correlação com efeitos de habitat em estudos complexos como os de Davidson *et al.* (1989), Davidson & Fischer (1991) e Davidson *et al.* (1991).

A distribuição dos indivíduos em classes de tamanho apresentou uma forma aproximada de J–invertido, ou seja, mais indivíduos menores, assim como a maioria dos indivíduos das populações estudadas são juvenis ou adultos. Araújo *et al.* (2006) afirmam que neste tipo de distribuição diamétrica há um decréscimo gradual no número de indivíduos em direção às classes superiores, sendo que em sua maioria são indivíduos juvenis ou adultos, em pleno desenvolvimento. Esse tipo de estrutura apresentada pelas populações de *Cecropia* sugere não haver problemas de recrutamento de novos indivíduos, pois as classes de menor diâmetro podem repor as de maior diâmetro (Válio & Scarpa 2001; Martins 1993). Assim, os indivíduos com maior CAP seriam aqueles reprodutivamente maduros e potencialmente capazes de manter o estoque de sementes na área, e indivíduos jovens garantiriam a manutenção da população, mesmo havendo alta taxa de mortalidade destes indivíduos até o seu estabelecimento (Kageyama & Gandara 2005). Além dessa estabilidade, mesmo que momentânea, considera-se o estágio sucessional das árvores desse gênero que, por serem pioneiras típicas, têm ótima capacidade de germinação e estabelecimento nos diferentes habitats, pois espécies pioneiras investem em crescimento primário para se estabelecer em clareiras (Janzen, 1980; Kageyama & Castro 1989).

Apesar desse padrão observado no gênero, provavelmente estabelecido pelo comportamento pioneiro, existem adaptações relativas ao habitat de cada espécie que podem ser evidenciados na estrutura. As características observadas como plantas de menor tamanho em *C. pachystachya*, intermediário em *C. saxatilis* e maior em *C. glaziovii*, estão coerentes com o observado em relação ao tempo de duração dos indivíduos dessas espécies. *Cecropia saxatilis* é descrita como espécie que ocupa áreas abertas e tem ciclo de vida relativamente curto (Berg & Rosseli 2005). Conforme Andrade & Carauta (1982), *C. pachystachya* dura até 20 anos no ambiente, diferentemente de *C. glaziovii* que pode ficar até 50 anos, dependendo das condições ambientais (Oliveira-Filho *et al.* 2004; Davidson 2005; Berg & Rosseli 2005).

Em complemento aos aspectos de distribuição geográfica, habitat e estrutura populacional, a ferramenta de modelagem da distribuição potencial das espécies pode ajudar no entendimento do atual *status* das plantas desse gênero, bem como das formigas associadas. Os resultados revelam áreas de ocorrência potencial que apresentam condições ambientais similares aos pontos de ocorrência conhecida das espécies. Apesar de corresponder a um modelo simplificado, baseado no conceito de similaridade ambiental, o mapa preditivo pode direcionar novas amostragens para áreas com alta probabilidade de ocorrência de espécies de interesse. O estudo utilizou tecnologias amplamente acessíveis como o aplicativo de uso livre de modelagem de nicho ecológico – openModeller – e mapas de variáveis ambientais disponíveis na internet (Hijmans *et al.*, 2005) para estimar a distribuição potencial de *Cecropia glaziovii*, *C. pachystachya* e *C. saxatilis* no Brasil. Raramente a quantidade de dados sobre a ocorrência é suficiente para determinar a distribuição atual das espécies, mas quando isso ocorre permite diferenciar a extensão da área de distribuição em potencial da distribuição atual (Munguia *et al.* 2008).

Geralmente a quantidade de informações para a maioria das espécies é insuficiente para permitir uma estimativa acurada da distribuição atual, então é recomendado interpretar com cautela os modelos gerados e planejar a amostragem de dados de forma a cobrir a maior parte da distribuição (Munguia *et al.* 2008). Existem ainda limitações dos modelos que são de natureza dos próprios algoritmos usados, e podem gerar confusão na interpretação dos

resultados como incongruências quando se confrontam dados do mapa de distribuição potencial com os dados de ocorrência reais (Giannini *et al.* 2012). Observou-se esse tipo de situação neste estudo onde o modelo gerou uma probabilidade de ocorrência de 80-100% para *C. glaziovii* na região do segundo planalto paranaense, onde a distribuição real é bastante rara. Cita-se o caso de Curitiba-PR por ser um local que mostrou alta probabilidade de ocorrência de *C. glaziovii* e existirem poucos registros atuais. Elenca-se também a própria ocupação humana e destruição de habitats como possibilidade de explicação para esse resultado. Os dados de ocorrência disponíveis nas bases de dados foram em quantidade proporcional ao que se observou em campo nesse estudo onde *C. pachystachya* foi mais abundante, *C. glaziovii* foi intermediária e *C. saxatilis* mais rara. Assim, o mapa final gerado a partir da experimentação feita com os algoritmos de distância do aplicativo openModeller não deve ser interpretado como um mapa probabilístico de ocorrência de *Cecropia* no Brasil e sim de uma distribuição potencial (Guisan & Zimmermann 2000; Elith & Burgman 2002; Peterson & Papes 2006; Wisz *et al.* 2008, Giannini *et al.* 2012).

Há uma concordância nos resultados desse trabalho com respeito aos dados de distribuição geográfica observada e a distribuição geográfica potencial. Apesar de não ter sido feito uma validação estatística do modelo gerado, uma maneira de se verificar sua acurácia, mesmo que indireta, é confrontar os dados observados com os dados potenciais (Giannini *et al.* 2012). Mesmo que se considere uma interação bastante conhecida, foi possível expandir o conhecimento sobre ocorrência, adaptação aos diferentes ambientes, tanto nas plantas como nas formigas residentes além de gerar informações a cerca da estrutura populacional e da distribuição potencial dessa interação mutualística.

REFERÊNCIAS

- Agrawal, A.A. & Dubin-Thaler, B.J., 1999. Induced responses to herbivory in the neotropical ant-plant association between *Azteca* ants and *Cecropia* trees: response of ants to potential inducing cues. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 45: 47-54.
- Andrade, J.C. & Carauta, J.P.P., 1982. The *Cecropia-Azteca* association: a case of mutualism? *Biotropica* 14:15.
- Araújo, F.S., Martins, S.V., Meira-Neto, J.A.A., Lani, J.L. & Pires, I.E., 2006. Estrutura da vegetação arbustivo-arbórea colonizadora de uma área degradada por mineração de caulim, Brás Pires, MG. *Revista Árvore* 30 (1): 107-116
- Berg, C.C. & Rosselli, P.F., 2005. *Cecropia*. *Flora Neotropica*. Monograph 94. The New York Botanical Garden, Bronx, New York. 230 pp.
- CI – Brasil. Conservation International, 2005. Hotspots Revisados. As Regiões Biologicamente mais Ricas e Ameaçadas do Planeta. Belo Horizonte.
- Clark, D.B. & Clark, D.A., 1993. Comparative analysis of microhabitat utilization by saplings of nine tree species in neotropical rain forest. *Biotropica* 25:397-407.
- Davidson, D. E. & Fisher, B.L., 1991. Symbiosis of ants with *Cecropia* as a function of light regime. *In*: Huxley, C.R. & Cutler, D.F. (editors). *Ant-plant interactions*. Oxford University Press, Oxford, U.K. Pp. 289-309
- Davidson, D.W., 2005. *Cecropia* and its biotic defenses. *In*: Berg, C.C. & Rosselli, P.F. *Cecropia*. *Flora Neotropica*. Monograph 94. The New York Botanical Garden, Bronx, New York. Pp. 214–226.
- Davidson, D.W., Snelling, R.R., Longino, J.T. 1989., Competition among ants for myrmecophytes and the significance of plant trichomes. *Biotropica*. 21: 64-73
- Davidson, D.W., Foster, R.B., Snelling, R.R. & Lozada, P.W., 1991. Variable composition of some tropical ant-plant symbioses. *In*: *Plant-animal interactions* (Price, P.W., Lewinsohn T.M., Fernandes G.W. & Benson W.W.). A Wiley-Interscience Publication, New York. Pp. 145-162.
- De Marco Jr, P., Siqueira, M.F., 2009. Como determinar a distribuição de espécies sobre uma abordagem conservacionista. *Megadiversidade* (Belo Horizonte). 5: 65-76.
- Dislich, R. & Mantovani, W., 1998. A flora de epífitas da reserva da Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", São Paulo, Brasil. *Boletim Botânico da Universidade de São Paulo* 17: 61-84.

Elith, J., Burgman, M.A., 2002. Predictions and their validation: Rare plants in the Central Highlands, Victoria, Australia. *In*: Scott, J.M., *et al.* (Eds.), *Predicting Species Occurrences: Issues of Accuracy and Scale*. Island Press, Covelo, C.A. Pp. 303–314.

Elith, J., Graham, C.H., Anderson, R.P., Dudik, M., Ferrier, S., Guisan, A., Hijmans, R.J., Huettmann, F., Leathwick, J.R., Lehmann, A., Li, J., Lohmann, L.G., Loiselle, B.A., Manion, G., Moritz, C., Nakamura, M., Nakazawa, Y., Overton, J.M., Peterson, A.T., Phillips, S.J., Richardson, K., Scachetti-Pereira, R., Schapire, R.E., Soberon, J., Williams, S., Wisz, M.S. & Zimmermann, N.E., 2006. Novel methods improve prediction of species distributions from occurrence data. *Ecography* 29: 129-151.

Felfili, J.M. & Rezende, R.P., 2003. Conceitos e métodos em fitossociologia. *Comunicações técnicas florestais*, 5(1). Universidade de Brasília, Departamento de Engenharia Florestal, Brasília.

Folgarait, P.J., Johnson, H.L. & Davidson, D.W., 1994. Responses of *Cecropia* to experimental removal of müllerian bodies. *Functional Ecology*. 8: 22-28.

Fortin, M. J.; Dale, M. & Hoef, J., 2002. Spatial analysis in ecology. *In*: Elshaarawi, A.H. & Piegorsch, W.W. (eds.). *Encyclopedia of Environmetrics*. Chichester. John Wiley & Sons. Pp. 2051-2058.

Giannini, Tereza C., Siqueira, M.F., Acosta, A.L., Barreto, F.C.C., Saraiva, A.M. & Alves dos Santos, I., 2012. Desafios atuais da modelagem preditiva de distribuição de espécies. *Rodriguésia*, Rio de Janeiro. 63(3):733-749.

Guisan, A. & Zimmermann, N.E., 2000. Predictive habitat distribution models in ecology. *Ecological Modelling*. 135:147-186.

Hammer, O., Harper, D.A.T. & Rian, P.D., 2001. Past: Palaeontological statistics software package for education and data analysis.

Harada, A.Y. & Benson, W.W. 1988. Espécies de *Azteca* (Hymenoptera, Formicidae) especializadas em *Cecropia* spp. (Moraceae): distribuição geográfica e considerações ecológicas. *Revista Brasileira de Entomologia*. 32: 423-435.

Hijmans, R.J., Cameron, S.E., Parra, J.L., Jones, P.G. & Jarvis, A., 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* 25: 1965-1978.

Hutchinson, G. E., 1957. Concluding Remarks. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 22: 415-42

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis & WWF Brasil. 2007. Efetividade de gestão das Unidades de Conservação federais do Brasil. Brasília.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2004. Mapa de biomas do Brasil. Escala 1:5.000.000. Rio de Janeiro. Disponível em: <http://mapas.ibge.gov.br/biomas2/viewer.htm>. Acesso em: 13 fev. 2012.

Janzen, D. H., 1980. *Ecologia Vegetal nos Trópicos*. Ed. E.P.U. São Paulo.
Kageyama, P.Y.; Castro, C.F.A., 1989. Sucessão secundária, estrutura genética e plantações de espécies arbóreas nativas. IPEF. Piracicaba. 41/42:83-93.

Kageyama, P.Y.; Gandara, F.B., 2005. Resultados do programa de restauração com espécies arbóreas nativas do convenio ESALQ/ USP e CESP. *In*: Galvao, A.P.M., Porfírio da Silva, V. (Eds.). *Restauração Florestal: Fundamentos e Estudos de Caso*. Colombo: Embrapa Florestas. Pp.47–58.

Krebs, C.J., 1999. *Ecological Methodology*. Addison Wesley Educational Publishers, Menlo Park.

Longhi, S.J., Nascimento, A.T., Fleig, F.D., Della-Flora, J.B., Freitas, R.A. & Charão, L.W., 1999. Composição Florística e Estrutura da Comunidade Arbórea de um Fragmento Florestal no Município de Santa Maria, Brasil. *Ciência Florestal*, Santa Maria, 9(1):115-133.

Longino, J.T., 1989. Geographic variation and community structure in an ant-plant mutualism: *Azteca* and *Cecropia* in Costa Rica. *Biotropica*. 21(2): 126–132.

Ludwig, J.A., Reynolds, J.F., 1988. *Statistical ecology*. New York:John Wiley. 337p.

Martins, F.R., 1993. *Estrutura de uma floresta mesófila*. Universidade de Campinas, Campinas. 246p.

Mueller-Dombois, D. & Ellenberg, H., 1974. *Aims and methods of vegetation ecology*. John Wiley & Sons, New York.

Munguía, M., Peterson, T.A. & Sánchez-Cordero, V., 2008. Dispersal limitation and geographic distributions of species. *Journal of Biogeography*. 35: 1879–1887.

Oliveira-Filho, A.T., Carvalho, D.A., Vilela, E.A., Curi, N. & Fontes, M.A.L., 2004. Diversity and structure of the tree community of a fragment of tropical secondary forest of the Brazilian Atlantic Forest domain 15 and 40 years after logging. *Revista Brasileira de Botânica* 27(4): 685-701.

Patten, B.C., & Auble, G.T., 1981. System theory of the ecological niche. *American Naturalist*. 117: 893-922

Peterson, A.T., Papes, M., 2006. Potential geographic distribution of the *Bugun Liocichla Liocichla bugunorum*, a poorly known species from north-eastern India. *Indian Birds*. 2:146-149

- Peterson, A.T., 2001. Predicting species geographic distributions based on ecological niche modeling. *Condor*. 103: 599-605
- Phillips, S.J., Anderson, R.P., Schapire, R. E., 2006. Maximum entropy modelling of species geographic distributions. *Ecological Modelling*. 190: 231-259.
- Primack, R.B., Rodrigues, E., 2001. *Biologia da conservação*. Londrina. 328p.
- Ribeiro, J.E.L.S., Hopkins, M.J.G., Vicentini, A., Sothers, C.A., Costa, M.A.S., Brito, J.M., Souza, M.A.D., Martins, L.H.P., Lohmann, L.G., Assunção, P.A.C.L., Pereira, E.C., Silva, C.F., Mesquita, M.R. & Procópio, L.C., 1999. *Flora da Reserva Ducke*. Inpa. Manaus.
- Stockwell, D.R.B., 2006. Improving ecological niche models by data mining large environmental datasets for surrogate models. *Ecological Modelling*. 192: 188-196.
- Thuiller, W., Lavorel, S. & Araujo, M.B., 2005. Niche properties and geographical extent as predictors of species sensitivity to climate change. *Global Ecology and Biogeography* 14: 347-357.
- Turner, M.G., Gardner, R. H. & O'Neill, R.V., 2001. *Landscape ecology in theory and practice*. Springer-Verlag. New York.
- Válio, I.F.M. & Scarpa, F.M., 2001. Germination of seeds of tropical pioneer species under controlled and natural conditions. *Revista Brasileira de Botânica* 24(1):79-84
- Vasconcelos, H.L., 1993. Ant colonization of *Maieta guianensis* seedlings, an Amazon ant-plant. *Oecologia*. 95: 439-443.
- Wisz, M.S., Hijmans, R.J., Li, J., Peterson, A.T., Graham, C.H., Guisan, A. & NCEAS- Predicting Species Distributions Working Group, 2008. Effects of sample size on the performance of species distribution models. *Diversity and Distributions*. 14: 763-773.

Lista de tabelas

Tabela 1- Localização, coordenadas geográficas, altitude e ocorrência de indivíduos coletados das populações de *Cecropia* e de *Azteca* no Cerrado* e na Mata Atlântica**.

Onde x indica ocorrência e – indica ausência de coleta.

Local (Município e Estado) §	Coordenadas geográficas	Altitude	Ocorrência de indivíduos				
			<i>Cecropia</i>			<i>Azteca</i>	
			<i>C. pachystachya</i>	<i>C. glaziovii</i>	<i>C. saxatilis</i>	<i>A. alfari</i>	<i>A.muelleri</i>
Mateiros – TO*	S-10°32' 51" W-46°25'16"	493	-	-	x	x	-
Ponte Alta do Tocantins – TO*	S-10°44' 38" W-47°32'10"	303	-	-	x	x	-
Aporé – GO*	S-19°06' 35" W-51°41' 18"	445	x	-	-	x	-
Itajá – GO*	S-19°05' 28" W-51°37' 12"	440	x	-	-	x	-
Iturama – MG*	S-19°43' 34" W-50°14' 28"	413	x	-	-	x	-
Carneirinho – MG*	S-19°41' 31" W-50°44' 52"	446	x	-	-	x	-
Paranaíba – MS*	S-19°39' 25" W-51°07' 23"	412	x	-	-	x	-
Campo Grande – MS*	S-20°26'34" W-54°38'47"	532	x	-	-	x	-
Aparecida D'Oeste – SP**	S-20°30'23" W-50°54'57"	337	x	-	-	x	-
Junqueirópolis – SP**	S-21°29'14" W-51°27'43"	410	x	-	-	x	-
Tuneiras D'Oeste – PR**	S-24°02'55" W-52°44'32"	549	x	-	-	x	-
Campo Mourão – PR**	S-24°02'44" W-52°22'59"	630	x	X	-	x	x

continua

Tabela 1- Localização, coordenadas geográficas, altitude e ocorrência de indivíduos coletados das populações de *Cecropia* e de *Azteca* no Cerrado* e na Mata Atlântica**. Onde x indica ocorrência e – indica ausência de coleta.

continuação

Local (Município e Estado) §	Coordenadas geográficas	Altitude	Ocorrência de indivíduos				
			<i>Cecropia</i>			<i>Azteca</i>	
			<i>C. pachystachya</i>	<i>C. glaziovii</i>	<i>C. saxatilis</i>	<i>A. alfari</i>	<i>A. muelleri</i>
Goioerê – PR**	S-24°11'06" W-53°01'40"	505	x	-	-	x	-
Mamborê – PR**	S-24°19'10" W-52°31'48"	762	x	-	-	x	-
Luiziana – PR**	S-24°17'10" W-52°16'33"	754	-	X	-	-	x
Morretes – PR**	S-25°28'58" W-48°49'29" a S-25°35'39" W-48°53'48"	19 a 727	-	X	-	-	x
Pontal do Paraná – PR**	S-25°39'38" W-48°27'02"	5	x	-	-	x	-
Garuva – SC**	S-26°01'42" W-48°50'46"	25	-	X	-	-	x
Barra Velha – SC**	S-26°35'57" W-48°40'43"	0	-	X	-	-	x

§ Estados Brasileiros: Tocantins (TO), Goiás (GO), Minas Gerais (MG), Mato Grosso do Sul (MS), São Paulo (SP), Paraná (PR) e Santa Catarina (SC)

Legenda das figuras

Figura 1- Mapa de Estados brasileiros, abrangendo os Biomas Cerrado e Mata Atlântica, contendo os pontos de coleta dos indivíduos de *Cecropia* e *Azteca* associadas.

Figura 2- Distribuição e ocorrência de *Cecropia* e *Azteca* em rotas percorridas nos *Hotspots* brasileiros, Cerrado e Mata Atlântica.

Figura 3- Estrutura populacional das espécies de *Cecropia* analisadas. Classes de tamanhos e classes etárias observadas em *C. glaziovii* (N= 80) *C. pachystachya* (N= 270) e *C. saxatilis* (N= 40). *Classes de tamanhos consideram as variáveis CAP, altura e número de ramificações, e classes etárias seguem o critério de Müller-Dombois & Ellenberg (1974).

Figura 4- Distribuição geográfica potencial de *Cecropia glaziovii*, *C. pachystachya* e *C. saxatilis* no Brasil com as probabilidades de ocorrência baseando-se na teoria de nicho ecológico. Variáveis utilizadas: bio1-Temperatura média anual; bio2-Varição Diurna Média de Temperatura (Média mensal (Tmax-Tmin)); bio3-Isotermalidade ((bio2/bio7) (* 100)); bio4-Sazonalidade da Temperatura(desvio padrão * 100); bio5-Temperatura máxima do mês mais quente; bio6-Temperatura mínima do mês mais frio; bio7-Amplitude térmica anual(bio5-bio6); bio8-Temperatura média do trimestre mais úmido; bio9-Temperatura média do trimestre mais seco; bio10-Temperatura média do trimestre mais quente; bio11-Temperatura média do trimestre mais frio; bio12-Precipitação Anual; bio13-Precipitação do mês mais chuvoso; bio14-Precipitação do mês mais seco; bio15-Sazonalidade da Precipitação(coeficiente de variação); bio16-Precipitação do trimestre mais chuvoso; bio17-Precipitação do trimestre mais seco; bio18-Precipitação do trimestre mais quente; bio19-Precipitação do trimestre mais frio

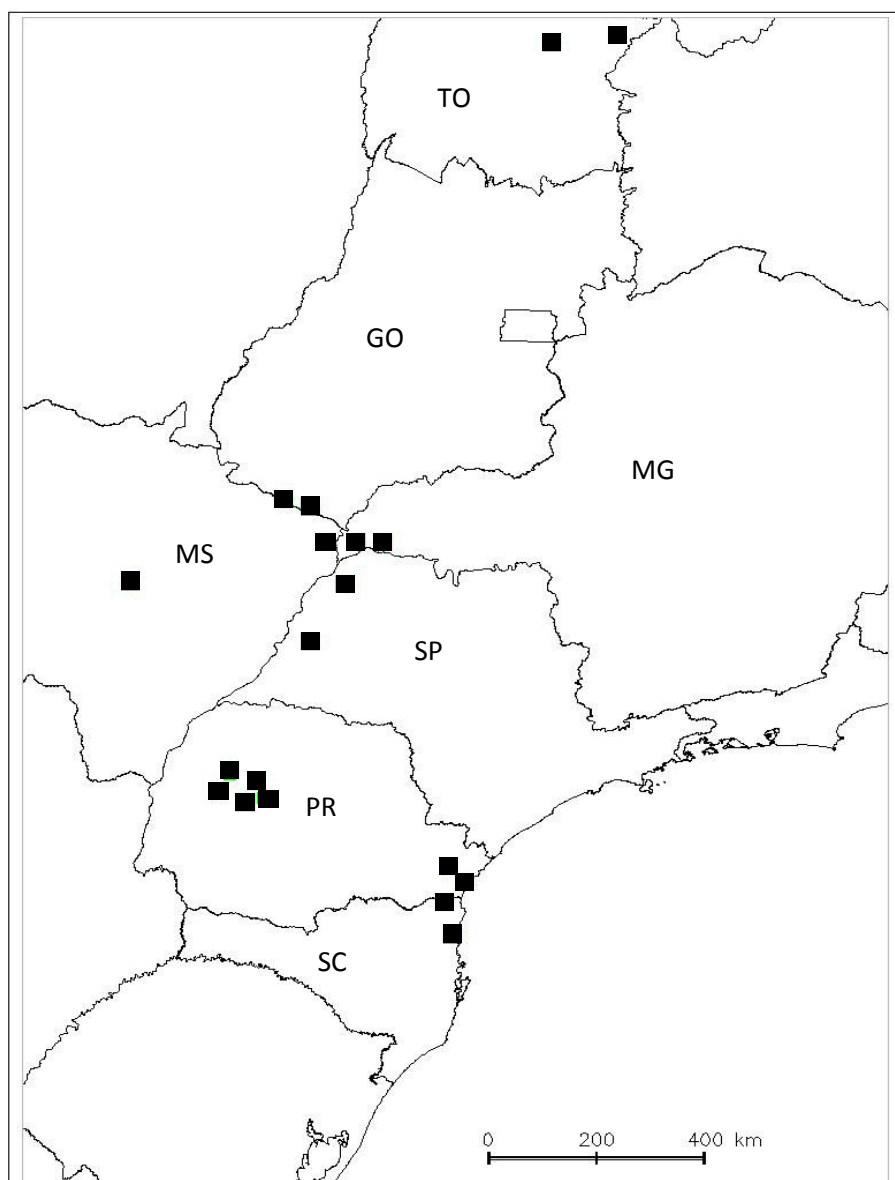


Figura 1

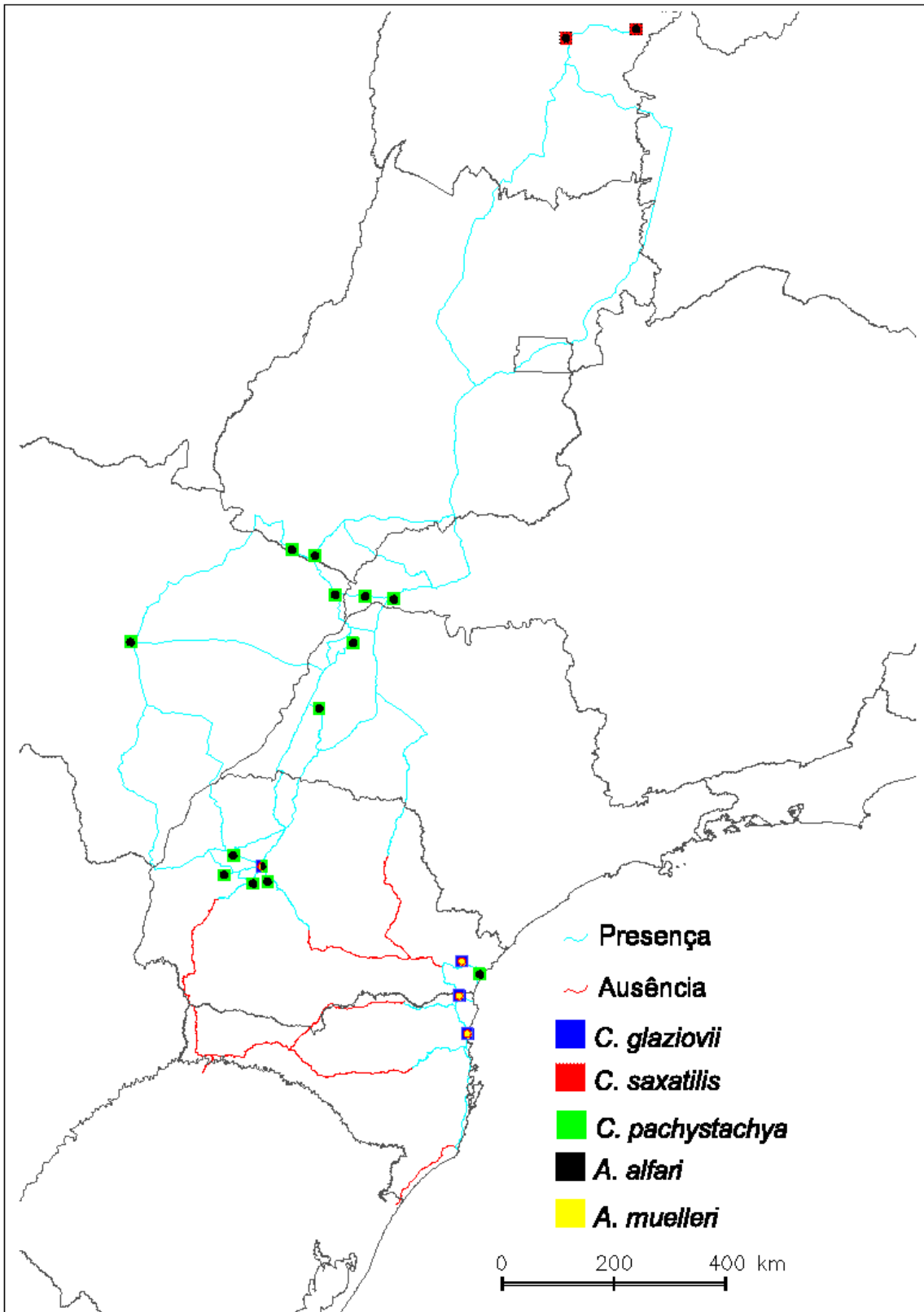


Figura 2

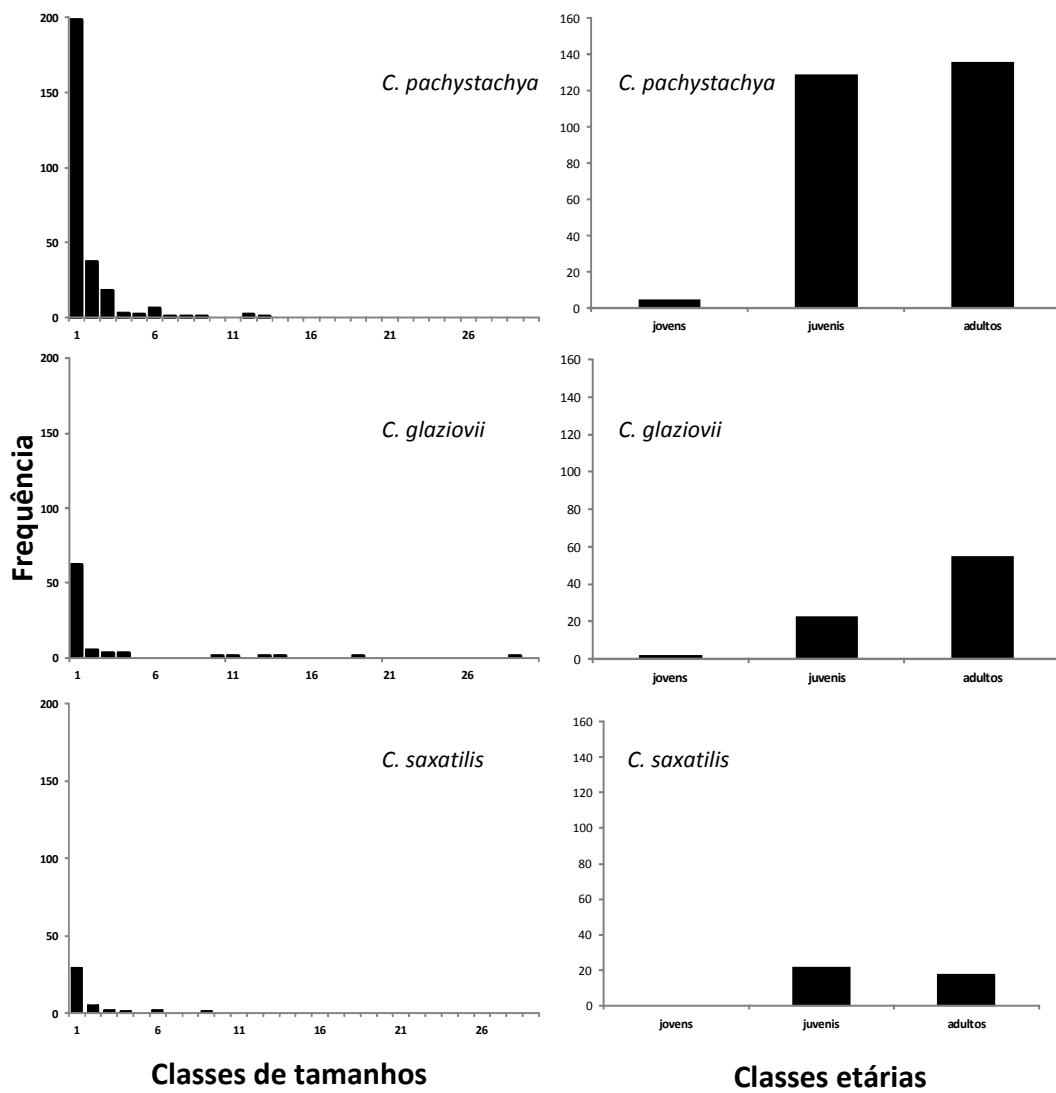


Figura 3

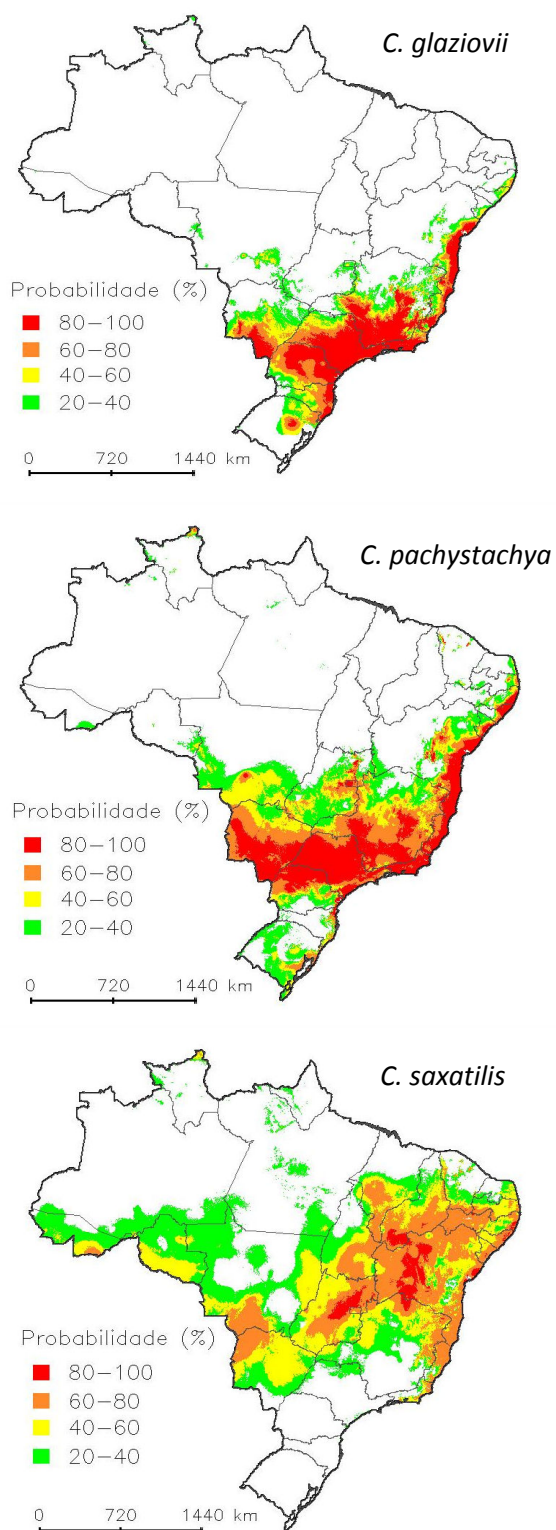


Figura 4

ANEXOS

Anexo I- Listagem de Coleções Biológicas consultadas para cada espécie.

C. glaziovii: Herbário Alexandre Leal Costa (ALCB), Herbário da Universidade Federal de Minas Gerais (BHCB), Herbário do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC), Herbário Leopoldo Krieger (CESJ), Coleção de plantas medicinais e aromáticas (CPMA), Herbário Pe. Dr. Raulino Reitz (CRI), Herbário da Reserva Natural Vale (CVRD), Herbário da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESA), Field Museum of Natural History - Brazilian records (F), Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina (FLOR), Herbário da Universidade Estadual de Londrina (FUEL), Herbário Dr. Roberto Miguel Klein (FURB), Herbário da Universidade Tecnológica Federal do Paraná Campus Campo Mourão (HCF), Herbário de São José do Rio Preto (HSJRP), Herbário do Trópico Semiárido (HTSA), Herbario da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS), Herbário UEM (HUEM), Herbarium Uberlandense (HUFU), Herbário Mogiense (HUMC), Herbário do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), Herbário do Instituto de Ciências Naturais (ICN), Herbário do Museu Botânico Municipal (MBM), Herbário Mello Leitão (MBML-Herbario), Missouri Botanical Garden - Brazilian records (MOBOT_BR), Herbário do Museu da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (MPUC), The New York Botanical Garden - Brazilian records (NY), MNHN - Herbário Virtual A. de Saint-Hilaire (P), Herbário Dimitri Sucre Benjamin (RB), Sistema de Informação do Programa Biota/Fapesp (SinBiota), xiloteca do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (SPFw), Herbário da Universidade Estadual de Campinas (UEC), Herbário do Departamento de Botânica (UPCB), Herbário Central da Universidade Federal do Espírito Santo VIES (VIES) disponível na rede speciesLink (<http://www.splink.org.br>) em 28 de Fevereiro de 2013 às 10:48.

C. pachystachya: Herbário Alexandre Leal Costa (ALCB), Herbário da Universidade Federal de Sergipe (ASE), xiloteca Calvino Mainieri (BCTw), Herbário da Universidade Federal de Minas Gerais (BHCB), xiloteca "ProfA. DrA. Maria Aparecida Mourão Brasil" (BOTw), Herbário do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC), Herbário Leopoldo Krieger (CESJ), Herbário da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CGMS), Herbário CPAP (CPAP), Coleção de plantas medicinais e aromáticas (CPMA), Herbário Pe. Dr. Raulino Reitz (CRI), Herbário da Reserva Natural Vale (CVRD), Coleção de Ácaros DZSJRP (DZSJRP-Acari), Herbário Prisco Bezerra (EAC), Herbário do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (EAFM), Herbário da Escola Superior de

Agricultura Luiz de Queiroz (ESA), Field Museum of Natural History - Brazilian records (F), Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina (FLOR), Herbário da Universidade Estadual de Londrina (FUEL), Herbário Dr. Roberto Miguel Klein (FURB), Herbário da Universidade Tecnológica Federal do Paraná Campus Campo Mourão (HCF), Herbário de Ilha Solteira (HISA), Herbario Jataiense Prof. Germano Guarim Neto (HJ), Herbário do Jardim Botânico Plantarum (HPL), Herbário de São José do Rio Preto (HSJRP), Herbário Sérgio Tavares (HST), Herbario da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS), Herbário UEM (HUEM), Herbário Universidade Estadual de Santa Cruz (HUESC), Herbarium Uberlandense (HUFU), Herbário Mogiense (HUMC), Herbário Vale do São Francisco (HVASF), Herbário do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), Herbário do Instituto de Ciências Naturais (ICN), Herbário INPA (INPA-Herbario), Herbário - IPA Dárdano de Andrade Lima (IPA), Herbário Lauro Pires xavier (JPB), Herbário do Instituto do Meio Ambiente do Estado de Alagoas (MAC), Herbário do Museu Botânico Municipal (MBM), Herbário Mello Leitão (MBML-Herbario), Missouri Botanical Garden - Brazilian records (MOBOT_BR), Smithsonian Department of Botany - Brazilian records (NMNH-Botany_BR), The New York Botanical Garden - Brazilian records (NY), MNHN - Herbário Virtual A. de Saint-Hilaire (P), Herbário Dimitri Sucre Benjamin (RB), xiloteca do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (RBw), Sistema de Informação do Programa Biota/Fapesp (SinBiota), Herbário do Estado "Maria Eneyda P. Kaufmann Fidalgo" - Coleção de Fanerógamas (SP), xiloteca do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (SPFw), Herbário Dom Bento José Pickel (SPSF), Herbário Graziela Barroso (TEPB), Herbário da Universidade de Brasília (UB), Herbário da Universidade Estadual de Campinas (UEC), Herbário da Universidade Federal de Goiás (UFG), Herbário UFRN (UFRN), Herbário do Departamento de Botânica (UPCB), Herbário Central da Universidade Federal do Espírito Santo VIES (VIES) disponível na rede speciesLink (<http://www.splink.org.br>) em 28 de Fevereiro de 2013 às 10:46.

C. saxatilis: Herbário Alexandre Leal Costa (ALCB), Herbário da Universidade Federal de Minas Gerais (BHCB), Herbário do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC), Herbário da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESA), Field Museum of Natural History - Brazilian records (F), Herbário da Universidade Tecnológica Federal do Paraná Campus Campo Mourão (HCF), Herbário do Trópico Semiárido (HTSA), Herbario da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS), Herbário INPA (INPA-Herbario), Herbário do Instituto do Meio Ambiente do Estado de Alagoas (MAC), Herbário do Museu Botânico Municipal (MBM), Missouri Botanical Garden - Brazilian records (MOBOT_BR), The New

York Botanical Garden - Brazilian records (NY), Herbário Dimitri Sucre Benjamin (RB), Herbário da Universidade de Brasília (UB), Herbário da Universidade Estadual de Campinas (UEC), Herbário da Universidade Federal de Goiás (UFG) disponível na rede speciesLink (<http://www.splink.org.br>) em 28 de Fevereiro de 2013 às 10:51.

CAPÍTULO II

Genética molecular e populacional de *Cecropia* e *Azteca* em áreas de Cerrado e Mata Atlântica.

RESUMO

O sistema *Cecropia-Azteca* tem sido amplamente estudado em aspectos ecológicos e coevolutivos. A genética molecular é uma ferramenta importante para estudos evolutivos dos mais variados táxons. O objetivo deste estudo foi descrever a estrutura genética de *Cecropia* com marcadores ISSR, avaliar a variabilidade genética de *Azteca* com o gene do DNA mitocondrial (COI) e interpretar possíveis efeitos de processos coevolutivos no sistema *Cecropia-Azteca*. O trabalho contemplou plantas do gênero *Cecropia* e formigas do gênero *Azteca* ocorrentes em áreas da porção sul da Mata Atlântica e de Cerrado. As associações observadas foram *C. pachystachya* com *A. alfari* e *C. glaziovii* com *A. muelleri*. Foi coletada uma folha de cada planta para extração de DNA, testes de reprodutibilidade de *primers* através de PCR e interpretação genético-populacional. Após os testes, quatro *primers* amplificaram adequadamente para 94 indivíduos de *C. pachystachya* de Mata Atlântica e Cerrado e 36 de *C. glaziovii* de Mata Atlântica. Foram selecionados 50 exemplares de *Azteca* e após a identificação foram submetidos ao sequenciamento do gene (COI), para inferência sobre variabilidade genética. Plantas de gênero *Cecropia* mostraram baixa diversidade genética e a distribuição da variação se mostrou maior dentro das populações do que entre as populações, mostraram ainda baixa estruturação genética correspondente às localidades de ocorrência. As formigas do gênero *Azteca* mostraram separação em duas linhagens diferentes e as duas espécies deste estudo se apresentaram misturadas nas duas linhagens. Ainda, os agrupamentos não foram coerentes com a distribuição geográfica das amostras, talvez por existir espécies crípticas não detectadas morfologicamente ou por outra limitação metodológica. As análises interpretadas em conjunto somado a efeitos históricos sugerem ocorrência de eventos coevolutivos que influenciam reciprocamente os mutualistas e resultam em consequências ecológicas e genéticas, observada no sistema *Cecropia-Azteca*.

Palavras-chave: marcadores moleculares, Mata Atlântica e Cerrado, coevolução

ABSTRACT

The system *Cecropia-Azteca* has been widely studied in ecological and coevolutionary features. Molecular genetics is an important tool for evolutionary studies of various taxa. The purpose of this study was to describe the genetic structure of *Cecropia* with ISSR, evaluate the genetic variability of *Azteca* with the gene of mitochondrial DNA (COI) and interpret potential effects of co-evolutionary processes in the system *Cecropia-Azteca*. The work included plants of the genus *Cecropia* and genus *Azteca* ants occurring in areas of the southern portion of the Atlantic Forest and Cerrado. The observed associations were *C. pachystachya* with *A. alfari* and *C. glaziovii* with *A. muelleri*. One leaf was collected from each plant for DNA extraction, testing reproducibility of *primers* by PCR and population genetic interpretation. After the tests, four *primers* amplified appropriately for 94 specimens of *C. pachystachya* in Atlantic Forest and Cerrado and 36 of *C. glaziovii* only in Atlantic Forest. We selected 50 samples *Azteca* and after identification were subjected to sequencing of the gene (COI), for inference of genetic variability. Plants of the genus *Cecropia* showed low genetic diversity and distribution of variation showed a higher within populations than among populations, also showed low genetic structure corresponding to the locations of occurrence. The ants of the genus *Azteca* showed separation into two different lineages and the two species of this study are presented in the two mixed lineages. Yet, the groupings were not consistent with the geographic distribution of the samples, perhaps because there was cryptic species not detected morphologically or other methodological limitations. Analyses interpreted in combination coupled with historical effects suggest the occurrence of co-evolutionary events that guide mutualists influence each other and result in ecological and genetic adaptation found in *Cecropia-Azteca* system.

Keywords: molecular markers, Atlantic Forest and Cerrado, coevolution

1 INTRODUÇÃO

Considerando a diversidade de espécies e a velocidade atual de devastação, o Cerrado e a Mata Atlântica são considerados *hotspots* mundiais de diversidade biológica no Brasil, sendo assim prioritários para a conservação (Myers *et al.* 2000). Plantas do gênero *Cecropia* Loefl. são pioneiras e amplamente distribuídas nesses ambientes, ocorrem em clareiras e mais raramente no interior de florestas, com papel relevante para os ecossistemas onde ocorrem (Berg & Rosseli 2005). Essas plantas têm uma relação mutualística com formigas do gênero *Azteca* Forel que fornecem proteção a essa planta e recebem abrigo e alimento na forma de glicogênio produzido por estruturas denominadas de triquílias (Alvarez-Buylla & Martinez-Ramos 1992). A associação entre plantas e formigas tem se destacado em diversos estudos indicando que podem influenciar um ao outro em suas vidas de diversas maneiras e níveis de complexidade (Janzen 1966; Oliveira & Pie 1998; Abdala-Roberts & Parra-Tabla 2005). Os resultados das interações em sistemas planta-formiga, em especial o efeito sobre o sucesso reprodutivo das plantas, podem variar bastante no tempo e no espaço (Rico-Gray & Oliveira 2007), assim como as formigas residentes podem ter seu fluxo gênico restrito pela colonização de plantas hospedeiras, dependendo diretamente da distribuição geográfica e da dispersão dessas plantas (Longino 1989).

Tendo em vista a ampla distribuição de *Cecropia* (Berg & Rosseli 2005) e sua importância chave nos ecossistemas (Lok *et al.* 2010), informações genético-populacionais dessas plantas e dessas formigas podem ajudar como um bom modelo de estudo sobre coevolução e entendimento de processos ecológicos em ambientes ameaçados. Outros sistemas formiga-planta, por exemplo *Macaranga-Crematogaster*, já foram investigados, demonstrando o papel de relevante entre os mutualistas nos padrões de estruturação genética (Davies *et al.* 2001; Blattner *et al.* 2001).

Estudos genético-populacionais têm como principal objetivo avaliar e quantificar a variabilidade genética existente nos indivíduos, ao longo de sua distribuição geográfica (Torggler *et al.* 1995; Sork & Smouse 2006). A estrutura genética das populações refere-se à heterogeneidade na distribuição de genótipos e da variabilidade genética dentro e entre as populações, a fim de se descrever como essa informação pode ser útil para conservação e manejo das espécies (Robinson 1998; Diniz-Filho & Telles 2002). Os marcadores moleculares possibilitam inferências sobre processos microevolutivos, atuando

nas populações de maneira mais informativa (Telles *et al.* 2001). São muitos os métodos para avaliar a estrutura genética de populações e verificar o grau de variabilidade existente em uma dada espécie (Bottino 2006). Com o avanço das técnicas de biologia molecular, é possível observar polimorfismo diretamente pelo sequenciamento de genes, ampliando novas perspectivas para pesquisa em conservação (Zucchi 2002).

Nesse contexto destacam-se os marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), um tipo de marcador multiloco altamente informativo (Powell *et al.* 1996), uma vez que o *primer* se baseia em um motivo de região microssatélite (di, tri, tetra ou penta-nucleotídeos), oferecendo uma ampla cobertura de regiões neutras do genoma (Zietkiewicz *et al.* 1994; Reddy *et al.* 2002). Há diversos trabalhos que utilizam os marcadores ISSR para a análise de diversidade genética de populações vegetais (Powell *et al.* 1996; Camacho & Linston 2001; Reddy *et al.* 2002; Shao *et al.* 2009; Hu *et al.* 2010; Li *et al.* 2010)

Há ainda que se destacar o uso de genomas mitocondriais para estudos genéticos populacionais, filogenéticos e filogeográficos em animais (Schaal *et al.* 1998; Hewitt 2000, 2004; Cavers *et al.* 2003; Dutech *et al.* 2003; Dick *et al.* 2003; Dick *et al.* 2007). Marcadores mitocondriais são considerados de grande importância para estudos de variabilidade intraespecífica devido a taxas rápidas de mutações e à sua herança materna em animais (Anderson *et al.* 1998; Avise *et al.* 1987; Avise 1991; Blouin 1998; Blouin 2002). O gene mitocondrial da subunidade I da enzima citocromo oxidase (COI) vem sendo usado com bastante frequência em estudos das relações filogenéticas por apresentar regiões variáveis suficientes para análises de grupos taxonomicamente relacionados (Sahls & Nyblom 2000; Simon *et al.* 1994). Trabalhos de cunho populacional e de sistemática molecular em formigas também utilizaram o gene da COI (Ayala *et al.* 1996; Wetterer *et al.* 1998; Chiotis *et al.* 2000; Logino *et al.* 2007).

Os objetivos deste trabalho foram: a) Avaliar geneticamente populações do gênero *Cecropia* através de marcadores ISSR-PCR; b) Caracterizar geneticamente indivíduos do gênero *Azteca* através do marcador mitocondrial Citocromo oxidase subunidade I (COI).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 CECROPIA

2.1.1 Coleta

As coletas foram feitas no período de agosto de 2009 a agosto de 2011. Foram coletadas folhas de 20 indivíduos de *Cecropia pachystachya* Trécul e *C. glaziovii* Snethl., em cada ponto de coleta em onze populações distribuídas ao longo das formações de Cerrado e de Mata Atlântica (Figura 1, Tabela 1). O ponto de Campo Mourão - PR apresentou duas espécies. Foram testados todos os indivíduos coletados porém, só foram utilizados os que apresentaram reprodutibilidade referente aos *primers* ISSR (Tabela 1). O material coletado foi acondicionado em sílica gel e levado ao laboratório para posterior extração de DNA. As populações foram georreferenciadas e os materiais testemunho depositados no Herbário da UTFPR Campus Campo Mourão (HFC).

2.1.2 Extração do DNA

Depois de desidratadas em sílica gel, as folhas coletadas foram pulverizadas com nitrogênio líquido em almofariz e o DNA foi extraído pela técnica de Roy *et al.* (1992), com modificações. Cerca de 20 mg de material pulverizado foram transferidos para um tubo de microcentrífuga, onde foram adicionados cerca de 600 μ l de tampão de extração [CTAB 2% (p/v); NaCl 1,4 M; Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; EDTA 20 mM; b-mercaptoetanol 0,2% (v/v), PVP-40 2%], 60 μ l de β -mercaptoetanol e 6 μ l de Proteinase K (10 mg/ml). Os tubos foram incubados em banho-maria a 65°C por 30 min, sendo posteriormente adicionado o mesmo volume de fenol e clorofórmio (1:1; v/v). O tubo foi centrifugado a 10.000 rotações por minuto por 15 min à temperatura ambiente e o sobrenadante transferido para um tubo novo, sendo adicionados 1 volume de isopropanol e 1/10 do volume de acetato de sódio. Após 24 horas em freezer (-18°C), o tubo foi centrifugado por 20 min a 10.000 rpm e o

sobrenadante descartado. O pellet foi lavado com 200 μ l de etanol 70%, seco a temperatura ambiente por 20 min e eluído em 200 μ l de água ultra-pura estéril e 2 μ l de RNase (10 mg/ml). A concentração e pureza do DNA foi avaliada e quantificada através de espectrofotômetro (NanoDrop 3300).

2.1.3 PCR-ISSR

Foram testados 10 *primers* (Wolfe *et al.* 1998), dos quais quatro apresentaram boa reprodutibilidade e grau de polimorfismo adequado. As concentrações dos reagentes utilizados nas reações de PCR (volume final de 25 μ l) encontram-se discriminadas na Tabela 2. As reações foram realizadas em termociclador seguindo as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 1 min e 30 s, seguido de 30 ciclos com temperaturas de anelamento que variaram de 42°C a 56,3°C por 45 s, extensão a 72°C por 1 min e 30 s e a extensão final a 72°C por 10 min.

Os produtos da PCR foram verificados através de eletroforese em gel de agarose 2%, a 80 Volts por 3,5 horas, corado com brometo de etídeo e visualizados e fotografados em transiluminador de luz ultravioleta. O tamanho dos fragmentos obtidos (em pares de base) foi comparado com um marcador de peso molecular (*ladder*) de 100 pb. Os fragmentos de ISSR amplificados, com a mesma mobilidade de acordo com o peso molecular, foram codificados para presença (1) ou ausência (0) de bandas homólogas.

2.2 AZTECA

2.2.1 Coleta

Foram coletados cerca de 20 indivíduos de *Azteca* em cada indivíduo de *Cecropia pachystachya*, *C. saxatilis* Snethl. e *C. glaziovii*, em dez populações distribuídas ao longo da distribuição das espécies no Brasil contemplando formações de Cerrado e de Mata Atlântica (Figura 2). Foram utilizados de três a cinco indivíduos de cada localidade para

serem sequenciados (Tabela 1). As populações foram georreferenciadas e os materiais testemunho depositados na coleção do Laboratório de Entomologia da Universidade de Ohio, EUA.

2.2.2 Extração

O DNA genômico total foi extraído a partir de formigas inteiras usando o kit de extração de DNA genômico (Invitrogen™, EUA) PureLink™, de acordo com as instruções do fabricante.

2.2.3 PCR-Sequenciamento

Foi amplificado e sequenciado o gene da subunidade I da enzima citocromo oxidase (COI) do DNA mitocondrial com os seguintes *primers*: (COI LCO1490: 5'GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG^{3'} e COI HCO2198: 5'TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA^{3'} (Folmer et al. 1994). As condições usadas no termociclador foram de 5 min a 95°C, 35 ciclos de 92°C durante 1 min, 58°C - 60°C durante 1 min e 70°C durante 2 min, seguido de extensão final a 72°C durante 6 min. As reações foram realizadas com volume final de 25 µl com 2 U de DNA polimerase AmpliTaq, 1x tampão de PCR, 1,5 mM de MgCl₂, 0,5 mM de dNTPs e 0,5 µM de cada *primer*. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% com o E-Gel®, além de Ladder 1 Kb (para avaliar o tamanho dos fragmentos), coradas com brometo de etídio e visualizadas sob luz UV. As amostras dos produtos de PCR foram purificados utilizando o PEG 8000 seguindo recomendações da “Applied Biosystems” com adaptações. Todas as amostras foram sequenciadas em ambas as direções. O protocolo de reação de sequenciamento foi realizado em 10 µl: 0,5 µl ABI Prism BigDye®™ v3.1 (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA), 1,0 µl de 5x de tampão, 1 µl de cada *primer* (3,2 pmol) e 40-50 ng de DNA. O protocolo de sequenciamento do ciclo de reação continha um passo de desnaturação inicial de 96°C durante 1 min, seguido de 35 ciclos de 10 s a 96°C, 15s a 50 °C e 4 min a 60°C. A precipitação final de DNA foi realizada com isopropanol e o

sequenciamento foi executado em um sequenciador ABI 3500. As sequências foram editadas no StadenPackage (Staden *et al.* 2000) e alinhadas usando o Clustal (Higgins *et al.* 1992) com correção manual.

2.3 ANÁLISE DE DADOS

2.3.1 Marcadores ISSR (*Cecropia*)

Os géis de agarose foram analisados com o auxílio do programa Gel-Pro Analyzer 4.0.1 com parâmetros *default*. Para determinar quantos marcadores seriam necessários para que houvesse um nível de precisão ao estimar as distâncias genéticas, as amostras foram submetidas a um teste de suficiência amostral (Tivang *et al.* 1994; Manly 1997). O procedimento foi realizado utilizando o aplicativo GENES v 2009.7.0 (Cruz 2006) considerando 1 a 156 locos através da similaridade de Nei e Li (1979). Realizou-se esse teste com essa amplitude tendo como parâmetro o total de bandas amplificadas nos indivíduos de *Cecropia*. O número ideal de bandas polimórficas foi considerado baseando-se no valor de estresse sugerido $< 0,05$ (Kruskal 1964). Esse teste considera o número de bandas amplificadas para cada espécie e calcula uma estimativa de razoabilidade medida pelo estresse gerado, que se for maior que 0,05 indica que o número de bandas não é suficiente para análises populacionais.

Para avaliar a diversidade genética dentro e entre as populações de *Cecropia*, utilizou-se o programa POPGEN 1.31 (Yeh *et al.* 1999). Os cálculos utilizados para esta avaliação foram: número médio de alelos por loco (A), número efetivo médio de alelos por loco (Ae), número de bandas polimórficas, porcentagem de bandas polimórficas, heterozigosidade esperada (Hs) e observada (Ho) e o Índice de Diversidade Gênica de Nei (h) e índice de diversidade de Shannon (I) (Lewontin 1972).

Para avaliar a estruturação e a diferenciação genética entre as populações de *Cecropia*, ao longo de sua distribuição, usou-se a AMOVA (Análise Molecular da Variância) no programa Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier e Lichier 2010).

O programa Structure versão 2.3 (Pritchard *et al.* 2000 e Falush *et al.* 2003), que incorpora uma abordagem Bayesiana, foi utilizado para inferir o número potencial de

populações K (desconhecido) e designar cada indivíduo, com uma probabilidade (q_i), para uma população (cluster), ou mais de uma, caso os seus genótipos indiquem que essas são misturadas (admixed). A estrutura populacional é detectada sob equilíbrios de Hardy-Weinberg e de ligação, que podem ter resultado de mistura recente, migração e/ou hibridização. Foram realizadas corridas independentes para os diferentes valores de K usando modelos admixture e frequências alélicas correlacionadas. Para cada valor de K, utilizou-se um *burn-in* de 100.000 seguido por 1.000.000 MCMC (Markov Chain Monte Carlo) repetições. O valor mais provável de K foi determinado a partir da mudança na probabilidade log dos dados entre os valores de K correspondentes (ΔK), como proposto por Evanno *et al.* (2005).

2.3.2 Sequências (*Azteca*)

As sequências obtidas para o gene da COI do mtDNA foram alinhadas através do programa GENEIOUS v5.4 usando o pacote funcional de alinhamento do MUSCLE nos parâmetros “default” (Drummond *et al.* 2011). A matriz de sequências alinhadas foi submetida à análise Bayesiana usando o “software” MRBAYES v3.3 (Ronquist & Huelsenbeck 2003), com 2×10^7 gerações, amostrando a cada 2.000 gerações. Logo que atingisse uma convergência com 10% de *burnin*, foi gerada a árvore através do TREEANNOTATOR v1.6.1, um pacote do aplicativo BEAST v1.6.1 (Drummond & Rambaut 2007).

Para fins de análise utilizou-se o trabalho referencial de Pringle *et al.* (2012), incluindo as amostras de *Azteca* utilizada pelos autores para uma referência dentro do grupo *Azteca* para o mesmo marcador molecular.

Todas as identificações morfológicas foram realizadas por J. T. Longino da Universidade de Utah-EUA, utilizando prioritariamente as rainhas coletadas juntamente com as operárias que foram efetivamente sequenciadas.

3 RESULTADOS

3.1 CECROPIA

Dos dez *primers* testados apenas quatro apresentaram bons níveis de reprodutibilidade e polimorfismo suficientes para serem utilizados nas análises (Tabela 1 e 2), totalizando 94 indivíduos para *C. pachystachya* e 36 para *C. glaziovii*. Os *primers* utilizados geraram um total de 156 bandas, variando de 29 a 49 por *primer* (Tabela 3).

O teste de suficiência amostral resultou para as duas espécies de *Cecropia* valores de estresse dentro do esperado para os 156 loci ($< 0,05$), revelando um número adequado de bandas para as análises populacionais (Figura 3).

Depois de analisada a matriz de dados binários gerada a partir da interpretação dos géis, observou-se baixa diferenciação interpopulacional tanto para *C. pachystachya* ($G_{st}=0,0814$) quanto para *C. glaziovii* ($G_{st}=0,0805$), reforçados pelos baixos valores de F_{st} entre as populações nas duas espécies (Tabelas 4, 5 e 6). Outro resultado a se destacar é o grande número de migrantes por geração nas duas espécies [*C. pachystachya* ($N_m=5,6432$) e *C. glaziovii* ($N_m=5,7126$)] (Tabela 4). Os resultados revelam baixa estruturação genética nas duas espécies.

De uma maneira geral as populações de *Cecropia* analisadas apresentaram baixa variabilidade genética considerando os quatro *primers* de ISSR amplificados. O número de locos por *primer* variou entre 17 e 29, totalizando 156 locos nas 12 populações analisadas. A proporção de locos polimórficos variou entre 38% e 82% nas populações, com um valor global de 98% em *C. pachystachya* e, para *C. glaziovii*, variou de 55% a 72% nas populações e 94% no valor global. A diversidade genética ou heterozigosidade esperada não variou muito entre as populações, alcançando valores entre 0,13 e 0,20 nas populações de *C. pachystachya*, com um valor global de 0,18. Para *C. glaziovii* os valores de heterozigosidade variaram entre 0,15 e 0,16 com valor global de 0,17 (Tabela 5).

A avaliação da estruturação da variabilidade genética utilizando Análise de Variância Molecular (AMOVA) forneceu um valor global baixo (de modo que maior parte da variância genética está no componente intrapopulacional). Considerando a escala geográfica em estudo, mesmo populações que estão próximas (ca. de 20km) geograficamente e também as mais distantes (ca. de 2.300km), observou-se baixa variação entre as populações.

O programa Structure separou os indivíduos em dois grupos para *C. pachystachya*, evidenciados quando se atinge estabilidade no ΔK em relação a K e elege-se o menor número anterior a essa estabilização (Figura 4). Os grupos sugeridos pelo programa se mostraram sem correspondência com a estrutura geográfica de amostragem (Figura 5).

Para *C. glaziovii* o programa Structure separou os indivíduos em três grupos e, igualmente à *C. pachystachya*, sem correspondência com a estrutura geográfica de amostragem (Figuras 6 e 7).

Ao se observar as árvores obtidas pelo método de UPGMA, nota-se que os indivíduos não se separam por populações em *C. pachystachya* e *C. glaziovii*. Não se observam linhagens bem definidas, bem como uma estruturação que possa ser associada com o posicionamento geográfico. Isso foi observado para as duas espécies de plantas estudadas (Figuras 8 e 9).

3.2 AZTECA

Os indivíduos de *A. alfari* e *A. muelleri* após terem sido submetidos ao sequenciamento do gene COI, e as análises pelo método de estatística Bayesiana, foram comparados com as sequências obtidas no trabalho de Pringle *et al.* 2012. Observou-se duas linhagens de indivíduos sem correspondência geográfica, onde esses clados apresentam indivíduos da mesma localidade. Na figura 10 observa-se os grupos formados de *A. muelleri* e *A. alfari* detalhe deste trabalho, em comparação com os grupos formados do trabalho de Pringle *et al.* 2012 referentes a diversas outras espécies do gênero *Azteca*. Nota-se no detalhe das amostras desse trabalho (Figura 11), que há a presença de indivíduos de ambas as espécies em ambos os clados formados.

4 DISCUSSÃO

4.1 CECROPIA

As duas espécies de *Cecropia* desse estudo mostraram resultados semelhantes nas áreas amostradas, com baixa diferenciação entre as populações e alta dentro das populações. Tanto para *C. pachystachya* ($G_{st}= 0,0814$; $F_{st}=0,049$) quanto para *C. glaziovii* ($G_{st}=0,0805$; $F_{st}=0,047$) a porcentagem de variação maior foi intrapopulacional (95%) e menor (5%) foi interpopulacional. Maior variação dentro dos grupos e menor entre eles, indica a habilidade da espécie em manter a diversidade genética (por fluxo gênico interpopulacional) em condição de natureza antropizada (Whitmore 1989). Sua ocorrência, sobretudo, depende de agentes dispersores de sementes e do fluxo gênico dentro e entre populações, sob as mais diferentes condições. Nestas espécies de *Cecropia* o sistema de polinização depende de ventos, mas conta com animais para dispersar suas sementes por médias e longas distâncias, especialmente aves e morcegos que são atraídos pelos frutos maduros (Berg & Rosseli 2005).

Esses resultados mostram baixa estruturação genética entre as populações das diversas localidades, o que reflete em um conjunto de processos referentes aos ambientes em que as espécies ocorrem, adaptação às características dos habitats, ciclo de vida, estratégias reprodutivas, dispersão e polinização (Hamrick & Godt, 1989). Em espécies que se reproduzem preferencialmente por fecundação cruzada, caso de *Cecropia*, espera-se, em geral, encontrar alta diversidade dentro de populações e baixa divergência entre populações (Loveless & Hamrick 1984; Hamrick & Godt 1997; Gusson *et al.* 2005). Além disso, a existência de banco de sementes e a longa distância de dispersão de pólen e sementes, observadas em *Cecropia*, também apresentam importantes consequências genéticas e ecológicas para as espécies como no trabalho de Kageyama *et al.* (2003) e evidenciado no presente estudo através dos valores de migrantes por geração (N_m). Bancos de sementes podem agir como tampões gênicos devido à capacidade de repor a variação genética perdida pela população de plantas após a extinção local, e a longa distância de dispersão de sementes e pólen que podem reduzir a distância genética entre populações geograficamente distantes (Alvarez-Buylla & Garay 1994).

Árvores pioneiras como as do gênero *Cecropia*, apresentam ciclos de vida relativamente curtos, portanto, é possível que ocorram extinções locais e recolonizações frequentes, que podem ter efeitos importantes sobre a estrutura genética dessas espécies (Slatkin 1985; 1987; Swaine & Whitmore 1988; Whitmore 1989). Em estudos realizados em pastagens abandonadas na Amazônia, Uhl *et al.* (1991) apontaram que em áreas onde o uso do solo foi moderado, ou seja, com um bom estabelecimento de gramíneas, pastejo regular, capina frequente e abandono da área após seis a dez anos, as espécies pioneiras surgiram por brotação, por banco de sementes ou por sementes dispersas de outros locais. Os efeitos do nível de perturbação da área e de outros fatores que afetam a diversidade e a estrutura genética das populações de espécies pioneiras são difíceis de serem isolados e avaliados separadamente, mas em alguns casos eles podem ser mais evidentes (Uhl *et al.* 1991). Esse fenômeno de recolonização ou migrações é também relatado como frequente em espécies do gênero *Cecropia* (Kageyama *et al.* 2003).

A dispersão de sementes de *C. obtusifolia*, dispersas por pássaros e morcegos assim como *C. pachystachya* e *C. glaziovii*, caem em geral a poucos metros da planta mãe, mas também foram encontradas sementes distantes 500 m da mesma (Alvarez-Buylla & Garay 1994). Deste modo, mesmo as distâncias entre as populações de *Cecropia*, variando de 20 km até 1.100 km teria havido uma sequência de eventos de polinização, dispersão, dormência de sementes, rebrotas e tempo de permanência nos locais, que em conjunto e ao longo do tempo, atuaram como um tamponante gênico resultando na baixa estruturação genética observada.

No presente trabalho observou-se um número de migrantes maior que cinco por geração e $G_{st}=0,08$ para as duas espécies. Segundo Han *et al.* (2007), em genética de populações, uma diferenciação significativa da população ocorre quando o fluxo gênico é menor que um migrante por geração dentro de uma população ou ainda quando o G_{st} é maior que 0,25. Ainda, os valores de F_{st} observados nesse estudo foram de 0,047 para *C. pachystachya* e de 0,049 para *C. glaziovii*. De acordo com Wright (1978) citado por Mwase *et al.* (2006), valores de F_{st} inferiores a 0,05 sugerem baixa diferenciação genética entre populações. Essa situação de baixa variabilidade pode refletir eventos históricos dos ambientes onde essas plantas ocorrem. Há trabalhos sobre os eventos de alterações climáticas do quaternário que mostram que, na porção sul da Mata Atlântica, diferentes espécies apresentam baixa variabilidade genética (Carnaval & Moritz 2008; Carnaval *et al.* 2009, Martins, 2011), devido, provavelmente, a um efeito gargalo de garrafa. Em uma análise mais ampla Turchetto-Zolet *et al.* 2013 revisaram publicações sobre padrões

filogeográficos em toda América do Sul e verificaram que as espécies documentadas podem reagir de diferentes formas aos eventos históricos. Outras explicações indicam que se há altos níveis de fluxo gênico entre as populações, elas evoluem juntas, mas se os níveis estão baixos, cada população evolui quase independentemente. Como o fluxo de genes é necessário para impedir a evolução independente de populações de uma espécie, esta vai depender de outras forças evolutivas presentes e de sua estrutura - modelo espacial que se enquadra na espécie (Slatkin 1994). Nas plantas de *Cecropia* podem ter ocorrido tanto efeitos históricos como fluxo gênico, mesmo porque para marcadores dominantes a informação sobre fluxo gênico tem restrições de interpretação (Levsen *et al.* 2008).

Almeida (2006) utilizou marcadores ISSR e também obteve maior variação dentro das populações de *Aechmea fulgens* Brongn. (Bromeliaceae) em três fragmentos de Mata Atlântica no Estado de Pernambuco, encontrando baixa diferenciação genética entre populações, concordando com outros trabalhos que utilizaram esse tipo de marcador (Auler *et al.* 2002; Conte 2004; Cavallari 2004; Melo Junior *et al.* 2004; xiao *et al.* 2004; Zucchi *et al.* 2005; Gusson 2005; Galeuchet *et al.* 2005). Alvarez-Buylla & Garay (1994) encontraram uma correspondência entre a estrutura genética de *Cecropia obtusifolia* e a distribuição espacial dos indivíduos em clareiras, utilizando aloenzimas. Entretanto, a estrutura genética foi detectada em sementes e plântulas, mas diminuiu progressivamente em jovens e adultos. De acordo com esses autores, a perda de estrutura genética nos estágios mais tardios do ciclo de vida da espécie pode ter ocorrido devido à mortalidade ao acaso durante o processo de recrutamento nas clareiras, que pode gerar diferentes pressões de seleção resultando em diferenças demográficas e genéticas.

Embora o teste de suficiência amostral tenha se mostrado adequado, os resultados encontrados nesse estudo devem ser interpretados com cautela, pois para interpretações de fluxo gênico e na escala de paisagem, a detecção de um contínuo genético é essencial (Telles & Bastos 2009; Bastos *et al.* 2011). Para tanto, faz-se necessário que sejam amostrados outros locais de ocorrência das espécies estudadas e analisados um número maior de marcadores moleculares para aumentar a robustez dos resultados.

4.2 AZTECA

A análise das amostras do gênero *Azteca* desse trabalho conduziram a conclusões distintas. Pode-se inferir que as espécies *A. muelleri* e *A. alfari* estão ainda em processo de especiação e/ou o marcador utilizado possa não ter alcançado a resolução adequada para agrupar os indivíduos em correspondência com as localidades.

Os indivíduos de *Azteca* foram identificados cuidadosamente pelo especialista J. T. Longino da Universidade de Utah-EUA porém, existem incongruências taxonômicas deste gênero como a possibilidade da existência de espécies crípticas na América do Sul (Longino com. pess). Isso pode ocorrer em situações em que a taxonomia do grupo seja extremamente difícil, como é o caso do gênero *Azteca* (Longino 2007; Pringle et al. 2012). Deste modo, morfologicamente as espécies são claramente distintas, mas há a possibilidade de espécies crípticas ocorrerem, sendo detectadas somente em nível molecular.

Esse gene é largamente utilizado para inferências referentes ao “DNA Barcode”, entre outras aplicações de âmbito taxonômico e populacional (Hillis et al. 1996; Holland & Hadfield 2002; Avise 2004), especificamente com insetos (Hebert et al. 2004; Whiteman et al. 2004; Cywinska et al. 2006; Pie & Traniello 2006; Pfenninger et al. 2007; Pringle et al. 2012). A evolução desse gene é rápida o bastante para permitir a discriminação de espécies próximas e de grupos filogenéticos dentro de uma única espécie (Cox & Hebert 2001). Mesmo assim, existem situações em que a resolução do gene para a obtenção da variabilidade pode ser incompatível com o nível de diferenciação que se quer estudar. Existem casos em que o uso do COI isoladamente se mostrou problemático e por vezes causando confusão nas interpretações (Rokas et al. 2001; Hurst & Jiggins 2005).

A utilização de genes complementares como genes nucleares, por exemplo, pode aumentar a robustez de conclusões tanto filogenéticas quanto populacionais (Pringle et al. 2012). Pringle et al. (2012) utilizaram o gene COI e mais quatro genes nucleares em um trabalho sobre a diversificação do gênero *Azteca*, com inferências sobre relações filogenéticas, padrões de distribuição geográfica e tempo de diversificação. Os autores consideraram sete espécies monofiléticas *a priori*, porém identificaram cinco linhagens diferentes. Uma das espécies estudadas (*Azteca pitieri*) mostrou coerência na formação de clados interespecíficos (separação de outras espécies), mas se mostrou incoerente dentro da espécie com relação às localidades geográficas. Mesmo com o uso de genes nucleares

existiram incongruências taxonômicas em *A. pitieri* (Pringle *et al.* 2012). Algo semelhante ocorreu com *A. muelleri* e *A. alfari* nas áreas de Cerrado e de Mata Atlântica, já que também não mostraram coerência entre a distribuição geográfica e o padrão genético, tanto intra como interespecífico.

A interpretação dos resultados demonstrou que o gênero *Azteca* tem, além da dificuldade de identificação, a possibilidade de existência de espécies crípticas e provável processo de especiação em andamento. Contudo as incoerências aparentes nos clados formados e a não delimitação das espécies *A. muelleri* e *A. alfari*, e a falta de correspondência com a estrutura geográfica podem ocorrer por falta de resolução do COI (Hurst & Jiggins 2005) para essas espécies.

As plantas de *Cecropia* mostraram baixa estruturação genética, e baixa correspondência com a estrutura geográfica. As formigas *Azteca* mostraram incoerência quanto à separação das espécies e quanto a correspondência com a estrutura geográfica. Organismos mutualistas influenciam em diversos níveis a vida das espécies envolvidas (Rico-Gray & Oliveira 2007), resultando em consequências na estruturação genética tanto de *Cecropia* quanto de *Azteca*, no caso desse estudo. Fatores históricos de processos evolutivos podem ter guiado o processo que resulta em adaptações entre espécies de *Cecropia* e de *Azteca* com intensidades de interação diferentes (Longino 1991, Clark and Clark 1993, Ayala *et al.* 1996).

As formigas *Azteca* apresentam fluxo gênico mais restrito do que a planta hospedeira (Pringle *et al.* 2012), afetando dessa maneira, a dinâmica evolutiva do mutualismo formiga-planta. Tempos de geração mais curtos e menores distâncias de dispersão de formigas *Azteca* (Orivel *et al.* 2011) em relação às árvores de *Cecropia* (Boshier *et al.* 1995; Boshier 2002) podem resultar em mutações adaptativas locais mais rápidas em *Azteca* do que em suas árvores hospedeiras, especialmente na presença de barreiras naturais para o fluxo de genes (Bruna *et al.* 2011; Orivel *et al.* 2011). Embora os estudos comparando diretamente os níveis de fluxo gênico entre as populações de duas ou mais espécies mutualistas ainda sejam raros, alguns trabalhos sobre outros mutualismos (Godsoe *et al.* 2010), formiga-planta (Quek *et al.* 2007; Guicking *et al.* 2011), e planta-fungo (Hoeksema & Thompson 2007), sugerem que as assimetrias entre os parceiros mutualistas na escala espacial, de fluxo de genes ou adaptação local são bastante comuns. Apesar do presente estudo não apresentar nenhum parâmetro populacional sobre fluxo gênico nas formigas *Azteca*, é possível uma explicação baseada em outros trabalhos com mutualismos planta-formiga (Davies *et al.* 2001; Blattner *et al.* 2001; Quek *et al.* 2007; Guicking *et al.* 2011) que

apontam para influência recíproca entre os mutualistas limitando a dispersão de *Azteca* a locais onde ocorram indivíduos de *Cecropia*.

Plantas do gênero *Cecropia* com distribuição em áreas de Cerrado e Mata Atlântica apresentam pares mutualísticos bem definidos e com uma relação mais íntima do par *C. glaziovii* com *A. muelleri*, diferentemente de *A. alfari* que ocorreu ocupando indivíduos de *C. pachystachya* e *C. saxatilis* (Bueno *et al.* dados não publicados). Acreditava-se que formigas *Azteca* pudessem ocorrer exclusivamente em *Cecropia*, entretanto foram encontradas habitando outras plantas mirmecófitas (Davidson *et al.* 1991). A idéia atual é a de que essa relação de mutualismo defensivo tenha surgido por uma coevolução difusa (Davidson *et al.* 1991), na qual a seleção natural deve ter atuado em características comportamentais das formigas. Deste modo observou-se um comportamento diferenciado entre as espécies de *Azteca* (Bueno *et al.* dados não publicados) sugerindo uma adaptação fortemente ligada às características do ambiente de ocorrência da planta hospedeira e ao par mutualístico, como no sistema *Macaranga-Crematogaster* onde o par mutualístico do ponto de vista coevolutivo apresentou forte correlação promovida pela interação (Davies *et al.* 2001; Blattner *et al.* 2001), apesar dessa correlação não ter sido testada para *Cecropia-Azteca*.

No presente trabalho, as populações de *Cecropia* apresentaram baixa estruturação genética, porém essa interpretação deve ser feita com cautela, devido ao baixo número de *primers* e indivíduos analisados. Reforça-se que houve representatividade no número de bandas formadas pelos *primers* utilizados, mostrando-se adequados para as análises populacionais. Foram reveladas duas linhagens distintas de *Azteca* baseadas no gene COI que apresentaram mistura de espécies, sugerindo que o gene COI utilizado isoladamente não foi ideal para inferências sobre variabilidade genética em níveis interespecíficos e intraespecíficos. Ainda, o efeito de fatores evolutivos históricos e o efeito recíproco dos mutualistas, em seu modo de vida, adaptações mais especializadas e tempo de interação, podem ter influência em suas estruturas genéticas. Relações interespecíficas como *Cecropia-Azteca* ocorrem, mas não explicam todos os padrões observados de adaptações das plantas aos insetos e dos insetos a seus hospedeiros (Thompson 1994). Só uma compreensão detalhada a respeito das diversas áreas da biologia, como ecologia, comportamento, sistemática e biogeografia, fisiologia e evolução, nos permitirá entender como se deram as relações entre plantas e insetos ao longo da história evolutiva da Terra.

REFERÊNCIAS

- Abdala-Roberts, L. & Parra-Tabla, V., 2005 Artificial defoliation induces trichome production in the tropical shrub *Cnidoscolus aconitifolius* (Euphorbiaceae). *Biotropica*. 37: 251–257.
- Almeida, C.M.A., 2006. Diversidade genética em populações de *Aechmea fulges* Brong. (Bromeliaceae) na Mata Atlântica de Pernambuco. Dissertação de Mestrado. Recife. 55p.
- Alvarez-Buylla, E.R. & Martínez-Ramos, M., 1992. Demography and allometry of a neotropical pioneer tree: an evaluation of the climax-pioneer paradigm for tropical forests. *Journal of Ecology*. 80: 275-290.
- Alvarez-Buylla, E.R. & Garay, A.A., 1994. Population genetic structure of *Cecropia obtusifolia*, a tropical pioneer tree species. *Evolution*. 48(2): 437-453.
- Anderson, T.J.C., Blouin, M.S. & Beech, R.N., 1998. Population biology of parasitic nematodes: applications of genetic markers. *Advances in Parasitology*. 41:219-283
- Auler, N.M.F., Reis, M.S., Guerra, M.P. & Nodari, R.O., 2002. The genetics conservation of *Araucaria angustifolia*: I. genetic structure and diversity of natural populations by means of non adaptative variation in the state of Santa Catarina, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*. 25 (3): 329-338.
- Avise, J.C., 1991. Ten unorthodox perspectives on evolution prompted by comparative population genetic findings on mitochondrial DNA. *Annual Review of Genetics*. 25:45-69.
- Avise, J.C., 2004. *Molecular markers, natural history, and evolution*. Second edition. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates. Inc. 684 p.
- Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A. & Saunders, N.C., 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 18: 489-522.
- Ayala, F.J., Wetterer, J.K. Longino, J.T. & Hartl, D.L., 1996. Molecular phylogeny of *Azteca* ants (Hymenoptera: Formicidae) and the colonization of *Cecropia* trees. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 5:423-428.
- Berg, C. C. & Rosselli, P. F., 2005. *Cecropia*. *Flora Neotropica*. Monograph 94. The New York Botanical Garden. New York. 230 p.
- Blattner F.R., Weising K., Banfer, G., Maschwitz U. & Fiala, B. 2001 Molecular analysis of phylogenetic relationships among myrmecophytic *Macaranga* species (Euphorbiaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 19: 331–344.
- Blouin, M.S., 2002. Molecular prospecting for cryptic species of nematodes: mitochondrial DNA vs. internal transcribed spacer. *International Journal for Parasitology*. 32: 527-531.

Blouin, M.S., Yowell, C.A., Courtney, C.H. & Dame, J.B., 1998. Substitution bias, rapid saturation, and the use of mtDNA for nematode systematics. *Molecular Biology and Evolution*. 15:1719-1727.

Boshier, D.H., 2002. *Cordia alliodora* Boraginaceae (Borage family). *In: Tropical Tree Seed Manual* (ed. Vozzo, J.A.). pp. 411-414. USDA Forest Service, Agriculture Handbook 721, Washington, District of Columbia.

Boshier, D.H., Chase, M.R., Bawa, K.S., 1995. Population genetics of *Cordia alliodora* (Boraginaceae), a neotropical tree. Gene flow, neighborhood, and population substructure. *American Journal of Botany*. 82: 484–490.

Bottino, M.C., 2006. Análise da diversidade genética de populações do Brasil e da Costa Rica de *Calophyllum brasiliense* Camb (Clusiaceae) utilizando marcadores AFLP. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 88p.

Brandao, M. M., Vieira, F. A., Carvalho, D. Estrutura genética em microescala espacial de *Myrcia splendens* (Myrtaceae). *Rev. Árvore*, Viçosa, v. 35, n. 5, Oct. 2011. Available from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-67622011000600001&lng=en&nrm=iso. access on 11 July 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622011000600001>.

Bruna, E.M., Izzo, T.J., Inouye, B.D., Uriarte, M., Vasconcelos, H.L., 2011. Assymmetric dispersal and colonization success of Amazonian plant-ants queens. *PLOS ONE*. 6: 1–8.

Bueno, P.A., Pie, M.R. & Muschner, V.C., 2013. A interação Cecropia-Azteca em áreas dos Hotspots Cerrado e Mata Atlântica: distribuição geográfica e variações interespecíficas. *In: Contexto genético e geográfico da interação Cecropia-Azteca*. Tese de doutorado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 112p.

Camacho, F.J., Liston A., 2001. Population structure and genetic diversity of *Botrychium pumicola* (Ophioglossaceae) based on inter-simple sequence repeats (ISSR). *American Journal of Botany*. 88: 1065–1070.

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.

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.

Cavallari, M.M., 2004. Estrutura genética de populações de *Encholirium* (Bromeliaceae) e implicações para sua conservação. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba. São Paulo. 92p.

Cavers, S., Navarro, C. & Lowe, A.J., 2003. Chloroplast DNA phylogeography reveals colonization history of a Neotropical tree, *Cedrela odorata* L., in Mesoamerica. *Molecular Ecology*. 12: 1451–1460.

- Chiotis, M., Jermin, L.S., Crozier, R.H., 2000. A molecular framework for the phylogeny of the ant subfamily Dolichoderinae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 17(1): 108-116.
- Clark, D.B., & Clark, D.A., 1993. Comparative analysis of microhabitat utilization by saplings of nine tree species in neotropical rain forest. *Biotropica*. 25:397-407.
- Conte, R., 2004. Estrutura genética de populações de *Euterpe edulis* Mart. submetidas à ação antrópica utilizando marcadores alozímicos e microssatélites. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo, Piracicaba. 124p.
- Cox, A.J. & Hebert, P.D.N., 2001. Colonization, extinction and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean. *Molecular Ecology* 10: 371–386.
- Cruz, C.D., 2006. Programa Genes: Biometria. Editora UFV. Viçosa, Minas Gerais. 382p.
- Cywinska, A., Hunter, F.F.; Hebert, P.D.N., 2006. Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. *Medical and Veterinary Entomology*. 20(4): 413-424.
- Davidson, J.R.T., Hughes, D., Blazer, D.G. & George, L.G., 1991. Post-traumatic stress disorder in the community: An epidemiological study. *Psychological Medicine*. 21: 713-721.
- Davies, S.J., Lum, S.K.Y., Chan, R. & Wang, L.K., 2001 Evolution of myrmecophytism in western Malesian *Macaranga* (Euphorbiaceae). *Evolution*. 55: 1542–1559.
- Dick, C.W., Abdul-Salim, K. & Bermingham, E., 2003. Molecular systematic analysis reveals cryptic Tertiary diversification of a widespread tropical rain forest tree. *The American Naturalist*. 162(6): 691-703.
- Dick, C.W., Bermingham, E., Lemes, M.R. & Gribel, R., 2007. Extreme long-distance dispersal of the lowland tropical rainforest tree *Ceiba pentandra* L. (Malvaceae) in Africa and the Neotropics. *Molecular Ecology*. 16: 3039-3049.
- Diniz-Filho, J.A.F. & Telles, M.P.C., 2002. Spatial autocorrelation and the identification of operational units for conservation in continuous populations. *Conservation Biology*. 16: 924-935.
- Drummond, A.J. & Rambaut, A., 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*. 7: 214.
- Drummond, A.J., Ashton, B., Buxton, S. Cheung, M., Cooper, A., Duran, C., Field, M., Heled, J., Kearse, M., Markowitz, S., Moir, R., Stones-Havas, S., Sturrock, S., Thierer, T. & Wilson, A., 2011. Geneious v5.4. Available from <http://www.geneious.com/>.
- Dutech, C., Maggia, L., Tardy, C., Joly, H.I. & Jarne, P., 2003. Tracking a genetic signal of extinction-recolonization events in a neotropical tree species: *Vouacapoua americana* Aublet in French Guiana. *Evolution*. 57: 2753–2764.

- Estopa, R.A., Souza, A.M., Moura, A.C.O., Botrel, M.C.G., Mendonça, E.G. & Carvalho, D., 2006. Diversidade genética em populações naturais de candeia (*Eremanthus erythropappus* (D.C.) MacLeish). *Scientia Forestalis*. 70: 97-106.
- Evanno, G., Regnaut, S. & Goudet, J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*. 14: 2611–2620.
- Excoffier, L. & Lischer, H.E.L., 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564–567.
- Falush, D., Stephens, M. & Pritchard, J.K., 2003. Inference of population structure: extensions to linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*. 164: 1567–1587.
- Galeuchet, D.J., Perret, C. & Fischer, M. 2005. Microsatellite variation and structure of 28 populations of the common wetland plant, *Lychnis flos-cuculi* L., in a fragmented landscape. *Molecular Ecology*. 14 (4): 991-1000.
- Godsoe, W.K.W., Smith, C.I., Strand, E., Yoder, J.B., Pellmyr, O. & Esque, T.C. 2010. Divergence in an obligate mutualism is not explained by divergent climatic factors. *New Phytologist*. 183: 589–599.
- Gonzales, E., & Hamrick, J.L., 2005. Distribution of genetic diversity among disjunct populations of the rare forest understory herb, *Trillium reliquum*. *Heredity*. 95: 306-314.
- Guicking, D., Fiala, B., Blattner, F.R., Slik, F., Mohamed, M. & Weising, K., 2011. Comparative chloroplast DNA phylogeography of two tropical pioneer trees, *Macaranga gigantea* and *Macaranga pearsonii* (Euphorbiaceae). *Tree Genetics & Genomes*. 7: 573–585
- Gusson, E., Sebbenn, A.M. & Kageyama, P.Y., 2005. Diversidade e estrutura genética espacial em duas populações de *Eschweilera ovata*. *Scientia Forestalis*. 67: 123-135.
- Hamrick, J.L. & Godt, M.J.W., 1989. Allozyme diversity in plant species. *In*: (eds. Brown, A.H.D., Clegg, M.T., Kahler, A.L. & Weir B.S.). *Plant population genetics, breeding and genetic resources*, 43–63. Sinauer, Sunderland, MA.
- Hamrick, J.L. & Godt, M.J.W., 1997. Allozyme diversity in cultivated crops. *Crop Science*. 37(1): 26-30.
- Han, L., Zhang, H.Y., xu, P.Z., Li, Y., Wang, x.D. & Wu, x.J., 2007. Genetic analysis and histological study of red seed in rice. *Acta Genetica Sinica*. 33: (6) 559-564.
- Hebert, P.D.N., Penton, E.H., Burns, J.M., Janzen, D.H., & Hallwachs, W., 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101: 14812–14817
- Hewitt, G.M., 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*. 405: 908-913.
- Hewitt, G.M., 2004. The structure of biodiversity - Insights from molecular phylogeography. *Frontiers in Zoology*. 1-4.

- Higgins, D.G., Bleasby, A.J., Fuchs, R. & Clustal, V., 1992. Improved software for multiple sequence alignment, *Computer Applied Bioscience*.8:189-191.
- Hillis, D.M., Moritz, C. & Mable, B.K., 1996. *Molecular Systematics*. Second edition. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.
- Hoeksema, J.D. & Thompson, J.N., 2007. Evolved geographic structure in a widespread plant-ectomycorrhizal interaction: Pines and false truffles. *Journal of Evolutionary Biology*. 20: 1148-1163.
- Holland, B.S. & Hadfield, M.G., 2002. Islands within an island: phylogeography and conservation genetics of the endangered Hawaiian tree snail *Achatinella mustelina*. *Molecular Ecology*. 11(3): 365-376.
- Hu, Y.P., xie, x.L., Wang, L., Yang, J. & Li, Y., 2010. Establishment and optimization of ISSR-PCR reaction conditions for *Rheum tanguticum*. *Guihaia*. 30(1): 112-116.
- Hurst, G.D.D. & Jiggins, F.M., 2005. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*. 272: 1525–1534.
- Janzen, D.H., 1966. Coevolution of mutualism between ants and acacias in Central America. *Evolution*. 20: 249-275
- Kageyama, P.Y., Sebbenn, A.M., Ribas, L.A., Gandara, F.B., Castellen, M., Percim, M.B. & Vencovsky, R., 2003. Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. *Scientia Forestalis*. 64:93-107.
- Kruskal, J.B.,1964. Multidimensional Scaling by Optimizing Goodness-of-Fit to a Nonmetric Hypothesis. *Psychometrika*. 29:1–28.
- Levsen, N.D., Crawford, D.J., Archibal, J.K., Geurra, A.S. & Mort, M.E., 2008. Nei's to Bayes': Comparing computacional methods and genetic markers to estimate patterns of genetic variation in *Tolpis* (Asteraceae). *American Journal of Botany* 95: 1466-1474.
- Lewontin, R.C., 1972. The apportionment of human diversity. *Evolutionary Biology*. 6: 381-390.
- Li, S., Li, J., Yang, x., Cheng, Z. & Zhang, W., 2010. Genetic diversity and differentiation of cultivated ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) populations in North-east China revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 58(6): 815-824.
- Lok, A.F., Chong, K.Y, Nghiem, T.P, & Tan, H.T., 2010. The Distribution and Ecoogy of *Cecropia* Species (Urticaceae) in Singapore Department of Biological Sciences, National University of Singapore. *Nature in Singapore*. 199-200pp.
- Longino, J.T., 1989. Geographic variation and community structure in an ant-plant mutualism: *Azteca* and *Cecropia* in Costa Rica. *Biotropica*. 21(2): 126-132.

Longino, J.T., 1991. Taxonomy of the *Cecropia*-inhabiting *Azteca* ants. *Journal of Natural History*. 25:1571-1602.

Longino, J.T., 2007. A taxonomic review of the genus *Azteca* (Hymenoptera : Formicidae) in Costa Rica and a global revision of the aurita group. *Zootaxa*. 1491: 1–63.

Loveless, M.D. & Hamrick, J.L., 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual review of ecology and systematics*. 15: 65-95.

Manly, B.F.J., 1997. Randomization, bootstrap and Monte Carlo methods in biology. second edition. New York: Chapman & Hall. 399p.

Martins, F.M., 2011. Historical biogeography of the Brazilian Atlantic forest and the Carnaval–Moritz model of Pleistocene refugia: what do phylogeographical studies tell us? *Biological Journal of the Linnean Society*. 104: 499-509.

Melo Junior, A.F., Carvalho, D., Póvoa, J.S.R. & Bearzoti, E., 2004. Estrutura genética de populações naturais de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb). *Scientia Florestalis*. 66(6): 56-65.

Mwase, W.F., Bjornstad, A., Stedje, B., Bokosi, J.M. & Kwapata, M.B., 2006. Genetic diversity of *Uapaca kirkiana* Muel. Arg. populations as revealed by amplified fragment length polymorphisms (AFLPs). *African Journal of Biotechnology*. 5(13): 1205-1213.

Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A.B. & Kent, J., 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*. 403: 853-858.

Nei, M., Li, W.H., 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 76: 5269-5273.

Oliveira, P.S., Pie, M.R., 1998. Interaction between ants and plants bearing extrafloral nectaries in cerrado vegetation. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*. 27: 161-176.

Orivel, J., Lambs, L., Male, P.J.G., Leroy, C., Grangier, J., Otto, T., Quilichini, A. & Dejean, A., 2011. Dynamics of the association between a long-lived understory myrmecophyte and its specific associated ants. *Oecologia*. 165: 369–376.

Pfenninger, M., Nowak, C., Kley, C., Steinke, D. & Streit B., 2007. Utility of DNA taxonomy and barcoding for the inference of larval community structure in morphologically cryptic *Chironomus* (Diptera) species. *Molecular ecology*. 16: 1957-1968.

Pie, M.R. & Traniello, J.F.A., 2006. Morphological evolution in a hyperdiverse clade: the ant genus *Pheidole*. *Journal of Zoology*. 27: 99.

Powell, W., Morgante, R., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. & Rafalsky, A. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*. 2(3) 225-238.

Pringle, E.G., Ramirez, S.R., Bonebrake, T.C., Gordon, D.M., & Dirzo, R., 2012. Diversification and phylogeographic structure in widespread *Azteca* plant-ants from the northern Neotropics. *Molecular Ecology*. 21: 3576-3592.

Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155: 945–959.

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.

Reddy, P.M., Sarla, N. & Siddiq, E.A., 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*. 128(1): 9-17.

Rico-Gray, V. & Oliveira, P.S., 2007. *The Ecology and Evolution of Ant-Plant Interactions*. The University of Chicago Press. Chicago. 331p.

Robinson, I.P., 1998. Aloenzimas na genética de populações de plantas. *In*: (Alfenas, A.C. ed.). *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos*. Viçosa: UFV. 329-380pp.

Rokas, A., Atkinson, R.J., Brown, G.S., West, S.A. & Stone, G.N., 2001. Understanding patterns of genetic diversity in the oak gallwasp *Biorhiza pallid* : demographic history or a *Wolbachia* selective sweep? *Heredity*. 87: 294–304

Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. 19: 1572–1574.

Roy, A., Frascaria, N., MacKay, J. & Bousquet, J., 1992. Segregating random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in *Betula alleghaniensis*. *Theoretical and Applied Genetics*. 85: 173-180.

Sahls, G. & Nyblom, K., 2000. Phylogenetic analysis of the genus *Cheilosia* (Diptera, Syrphidae) using mitochondrial COI sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 15: 235-241.

Schaal, B.A., Hayworth, D.A., Olsen, K.M., Rauscher, J.T. & Smith, W.A., 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology*. 7: 465-474.

Shao, J.W., Chen, W.L., Peng, Y.Q., Zhu, G.P. & Zhang, x.P., 2009. Genetic diversity within and among populations of the endangered and endemic species *Primula merrilliana* in China. *Biochemical Systematics and Ecology*. 37(6): 699-706.

Simon, C., Frati, F., Bechenbach, A., Crespi, B., Liu, H. & Flook, P., 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequence and compilation of conserved polymerase chain reaction *primers*. *Annals of the Entomological Society of America*. 87: 651-701.

Slatkin, M., 1985. Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology Systematics*. 16:393-430.

Slatkin, M., 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*. 236: 787-792.

Slatkin, M., 1994. An exact test for neutrality based on the Ewens sampling distribution. *Genetical Research*. 64: 71-74.

Sork, V.L. & Smouse, P.E., 2006. Genetic analysis of landscape connectivity in tree populations. *Landscape Ecology*. 21: 821-836.

Staden, R., Beal, K.F. & Bonfield, J.K., 2000. The Staden package, 1998. *Methods in Molecular Biology*. 132: 115-130.

Swaine, M., Whitmore, T.C., 1988. On definition of ecological species groups in tropical rain forests. *Vegetation*. 75: 81-86.

Telles, M.P.C. & Bastos, R.P., 2009. Estruturação genética na escala de paisagem. *Megadiversidade*. 5(1-2): 101-110.

Telles, M.P.C., Diniz-filho, J.A.F., Coelho, A.S.G. & Chaves, L.J., 2001. Autocorrelação espacial das frequências alélicas em subpopulações de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC, Myrtaceae) no Sudeste de Goiás. *Revista Brasileira de Botânica*. 24(2): 145-154.

Thompson, J.N., 1994. *The coevolutionary process*. University of Chicago Press, Chicago. 383p.

Tivang, J.G., Nienhuis, J. & Smith, O.S., 1994. Estimation of sampling variance o molecular marker data using the bootstrap procedure. *Theoretical and Applied Genetics*. 89: 259-264.

Torggler, M.G.F., Contel, E.P.B. & Torggler, S.P., 1995. *Isoenzimas – Variabilidade genética em plantas*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 186p.

Turchetto-Zolet, F., Pinheiro, F., Salgueiro, C. & Palma-Silva, 2013. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America A. C. *Molecular Ecology*. 22(5): 1193–1213.

Uhl, C., Nepstad, D., Silva, J.M.C. & Vieira, I. 1991. Restauração da floresta em pastagens degradadas. *Ciência Hoje*. Rio de Janeiro. 13(76) 22-31.

Wetterer, J.K., Gruner, D.S. & Lopez, J.E., 1998. Foraging and nesting ecology of *Acromyrmex octospinosus* (Hymenoptera: Formicidae) in a Costa Rican tropical dry forest. *Florida Entomologist*. 81(1): 61-67.

Whiteman, N.K., Santiago-Alarcon, D., Johnson, K.P. & Parker, P.G., 2004. Differences in straggling rates between two genera of dove lice (Insect: Phthiraptera) reinforce population genetic and cophylogenetic patterns. *International Journal for Parasitology*. 34: 1113-1119.

Whitmore, T.C., 1989. Canopy gaps and the two major groups of forest trees. *Ecology*. 70(3): 536-538.

Wolfe, A.D., xiang, Q.Y. & Kephart, S.R., 1998. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable inter simple sequence repeat markers. *Molecular Ecology*. 7: 1107-1125.

Wright, S., 1978. *Evolution and genetics of populations: Variability within and among natural populations*. Vol. 4. University of Chicago Press. Chicago. USA.

Xiao, L.Q., Ge, x.J., Gong, x., Hao, G. & Zheng, S.x., 2004. ISSR variation in the Endemic and endangered plant *Cycas guizhouensis* (Cycadaceae). *Annals of Botany*. 94: 133-138.

Yeh, F.C., Yang, R.C. & Boyle, T., 1999. POPGENE 32-version 1.31. Population Genetics Software. <http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene.pdf>

Zietkiewicz, E., Rafalski, A. & Labuda, D., 1994. Genomic fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*. 20: 176-183.

Zucchi, M.I. 2002. Análise da estrutura genética de *Eugênia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR. Tese de doutorado. Escola Superior Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo, Piracicaba. 130p.

Zucchi, M.I., Pinheiro, J.B., Chaves, L.J., Coelho, A.S.G., Couto, M.A., Morais, L.K. & Vencovsky, R., 2005. Genetic structure and gene flow of *Eugenia dysenterica* natural populations. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Brasília.40: 975-980.

Lista de tabelas

Tabela 1- Localização, coordenadas geográficas, altitude e número de indivíduos coletados e analisados das populações de *Cecropia* e de *Azteca* no Cerrado* e na Mata Atlântica**.

Local (Município e Estado)	Coordenadas geográficas	Altitude	Número de indivíduos coletados (número de indivíduos utilizados na análise genética)			
			<i>Cecropia</i>		<i>Azteca</i>	
			<i>C. pachystachya</i>	<i>C. glaziovii</i>	<i>A. alfari</i>	<i>A. muelleri</i>
Mateiros – TO*	S-10°32' 51" W-46°25'16"	493	-	-	20 (5)	-
Ponte Alta do Tocantins – TO*	S-10°44' 38" W-47°32'10"	303	-	-	-	-
Aporé – GO*	S-19°06' 35" W-51°41' 18"	445	-	-	20 (3)	-
Itajá – GO*	S-19°05' 28" W-51°37' 12"	440	20 (13)	-	-	-
Iturama – MG*	S-19°43' 34" W-50°14' 28"	413	20 (14)	-	20 (5)	-
Carneirinho – MG*	S-19°41' 31" W-50°44' 52"	446	20 (14)	-	-	-
Paranaíba – MS*	S-19°39' 25" W-51°07' 23"	412	20 (8)	-	-	-
Campo Grande – MS*	S-20°26'34" W-54°38'47"	532	-	-	20 (4)	-
Junqueirópolis – SP**	S-21°29'14" W-51°27'43"	410	-	-	20 (5)	-
Tuneiras D'Oeste – PR**	S-24°02'55" W-52°44'32"	549	20 (10)	-	-	-
Campo Mourão – PR**	S-24°02'44" W-52°22'59"	630	20 (4)	20 (5)	20 (5)	-

continua

Tabela 1- Localização, coordenadas geográficas, altitude e número de indivíduos coletados e analisados das populações de *Cecropia* e de *Azteca* no Cerrado* e na Mata Atlântica**.

continuação

Local (Município e Estado)	Coordenadas geográficas	Altitude	Numero de indivíduos coletados (número de indivíduos utilizados na análise genética)			
			<i>Cecropia</i>		<i>Azteca</i>	
			<i>C. pachystachya</i>	<i>C. glaziovii</i>	<i>A. alfari</i>	<i>A. muelleri</i>
Morretes – PR**	S-25°28'58" W-48°49'29" a S-25°35'39" W-48°53'48"	19 a 727	-	26 (13)	-	20 (5)
Pontal do Paraná – PR**	S-25°39'38" W-48°27'02"	5	20 (15)	-	20 (5)	-
Garuva – SC**	S-26°01'42" W-48°50'46"	25	-	20 (6)	-	20 (5)
Barra Velha – SC**	S-26°35'57" W-48°40'43"	0	-	20 (12)	-	20 (5)
Total analisado			78	36	32	15

Obs: O par mutualístico da formiga *A. alfari* no ponto de Mateiros foi *C. saxatilis* e no ponto de Campo Mourão foi *C. pachystachya*

Tabela 2- Concentração dos reagentes utilizados nas reações de PCR e temperatura de anelamento para cada *primer*.

<i>Primer/</i> Reagente	<i>Primer</i> (pmoles/ μ l)	<i>Taq</i> Polimerase (U)	dNTP (mM)	MgCl ₂ (mM)	BSA (μ g/ml)	DNA (ng)	Temp.de anelamento ($^{\circ}$ C)
ISSR4 [(GT) ₇ YG]	1,2	1	0,25	2	-	35	49,5
ISSR7 [(CAC) ₄ RC]	0,5	1	0,25	1	25	35	56,3
ISSR13 [(GA) ₈ YT]	0,6	1	0,25	2	25	10	42
ISSR20 [(CT) ₈ T]	0,5	1	0,25	2	-	20	52,8

Tabela 3- Numero de bandas amplificadas em cada *primer* de ISSR nas espécies de *Cecropia* amostradas em áreas de Cerrado e Mata Atlântica.

<i>Primer</i>	Sequência	Número de bandas amplificadas
ISSR4	[(GT) ₇ YG]	29
ISSR7	[(CAC) ₄ RC]	37
ISSR13	[(GA) ₈ YT]	49
ISSR20	[(CT) ₈ T]	40

Tabela 4- Indicadores da diversidade genética para *Cecropia pachystachya* e *C. glaziovii*; sendo: Ht= diversidade genética total , Hs= heterozigozidade média esperada, Gst= diferenciação genética interpopulacional, Nm= número de migrantes por geração.

	Ht	Hs	Gst	Nm
<i>C. pachystachya</i>	0,1845	0,1695	0,0814	5,6432
<i>C. glaziovii</i>	0,1680	0,1545	0,0805	5,7126

Tabela 5- Parâmetros populacionais para *Cecropia pachystachya* e *Cecropia glaziovii*; onde: N= número de indivíduos, na= número observado de alelos, Ne= número esperado de alelos, H=heterozigotidade esperada, I= índice de Shannon, NPB= número de bandas polimórficas , PPB= proporção de bandas polimórficas ,

	População	N	Na	Ne	H	I	NPB	PPB
Cecropia Pachystachya	Campo Mourão	4	1.38	1.20	0.13	0.19	59	38.06
	Pontal do Paraná	15	1.8	1.25	0.1749	0.2915	124	80
	Itajá	13	1.83	1.30	0.20	0.33	128	82.58
	Paranaíba	8	1.68	1.31	0.19	0.30	105	67.74
	Aporé	16	1.81	1.23	0.16	0.27	125	80.65
	Carneirinho	14	1.81	1.26	0.18	0.303	126	81.29
	Iturama	14	1.83	1.23	0.17	0.28	128	82.58
	Tuneiras do Oeste	10	1.73	1.20	0.15	0.26	113	72.9
	Total	94	1.98	1.25	0.18	0.32	152	98.06
Cecropia glaziovii	Campo Mourão	5	1.55	1.22	0.15	0.24	86	55.48
	Morretes	13	1.73	1.22	0.15	0.26	113	72.9
	Barra Velha	12	1.74	1.22	0.16	0.26	115	74.19
	Garuva	6	1.59	1.24	0.16	0.26	92	59.35
		Total	36	1.94	1.22	0.17	0.29	146

Tabela 6- AMOVA entre populações estudadas de *Cecropia pachystachya* para os quatro primers analisados ($p < 0,0001$). Sendo: CePac= *C. pachystachya* e CeGla= *C. glaziovii*

Fonte de Variação	Graus de liberdade		Soma dos quadrados		Variância dos componentes		% de variação		Fst	
	CePac	CeGla	CePac	CeGla	CePac	CeGla	CePac	CeGla	CePac	CeGla
Entre populações	4		131,35	1,04	1,04		4,70	4,00		
Entre indivíduos da mesma população	53		1121,32	812,67	21,16		95,30	96		
Total	57		1252,67		22,20		-		0,047	0,049

* Foram realizadas 1023 permutações pelo programa Arlequin

Legenda das figuras

Figura 1- Mapa do Brasil com as localizações das populações amostradas de *Cecropia pachystachya* e *C. glaziovii*. Sendo: SC = Santa Catarina; PR = Paraná; MG = Minas Gerais; MS = Mato Grosso do Sul; GO = Goiás.

Figura 2- Mapa do Brasil com as localizações das populações amostradas de *Azteca muelleri* e *A. alfari*. Sendo: SC = Santa Catarina; PR = Paraná; SP= São Paulo MG = Minas Gerais; MS = Mato Grosso do Sul; GO = Goiás.

Figura 3- Teste de suficiência amostral para 156 loci observados em *Cecropia glaziovii* e em *C. pachystachya* com os quatro *primers* utilizados.

(Número de loci adequado para análise populacional, valores de estresse < 0,05)

Figura 4- Valores de ΔK segundo correção de Evanno et al. (2005) mostrando maior valor de ΔK para $K=2$.

Figura 5- Análise das populações de *Cecropia pachystachya*, computada pelo programa Structure, com $K=2$. Os grupos geográficos estão representados no eixo das abscissas; os grupos (K) estimados pelo programa correspondem às cores no gráfico [grupo 1: vermelho, grupo 2: verde]

Figura 6- Valores de ΔK segundo correção de Evanno et al. (2005) mostrando maior valor de ΔK para $K=2$.

Figura 7- Análise das populações de *Cecropia glaziovii*, computada pelo programa Structure, com $K=3$. Os grupos geográficos estão representados no eixo das abscissas; os grupos (K) estimados pelo programa correspondem às cores no gráfico [grupo 1: vermelho, grupo 2: verde, grupo 3: amarelo]

Figura 8- Árvore originada pelo método de UPGMA em *Cecropia pachystachya*

Figura 9- Árvore originada pelo método de UPGMA em *Cecropia glaziovii*

Figura 10- Árvore usando método de estatística Bayesiana com coletas desse trabalho bem como de Pringle *et al.* 2012 com diversas espécies do gênero *Azteca*. As cores azul e verde correspondem às espécies *A. muelleri* e *A. alfari* respectivamente. As demais cores representam outras espécies do gênero estudadas por Pringle *et al.* 2012.

Figura 11- Detalhe dos indivíduos apenas desse trabalho nos mesmos parâmetros da árvore geral. Status das espécies de *Azteca* estudadas mostrando dois grupos distintos com compartilhamento de locais e de espécies

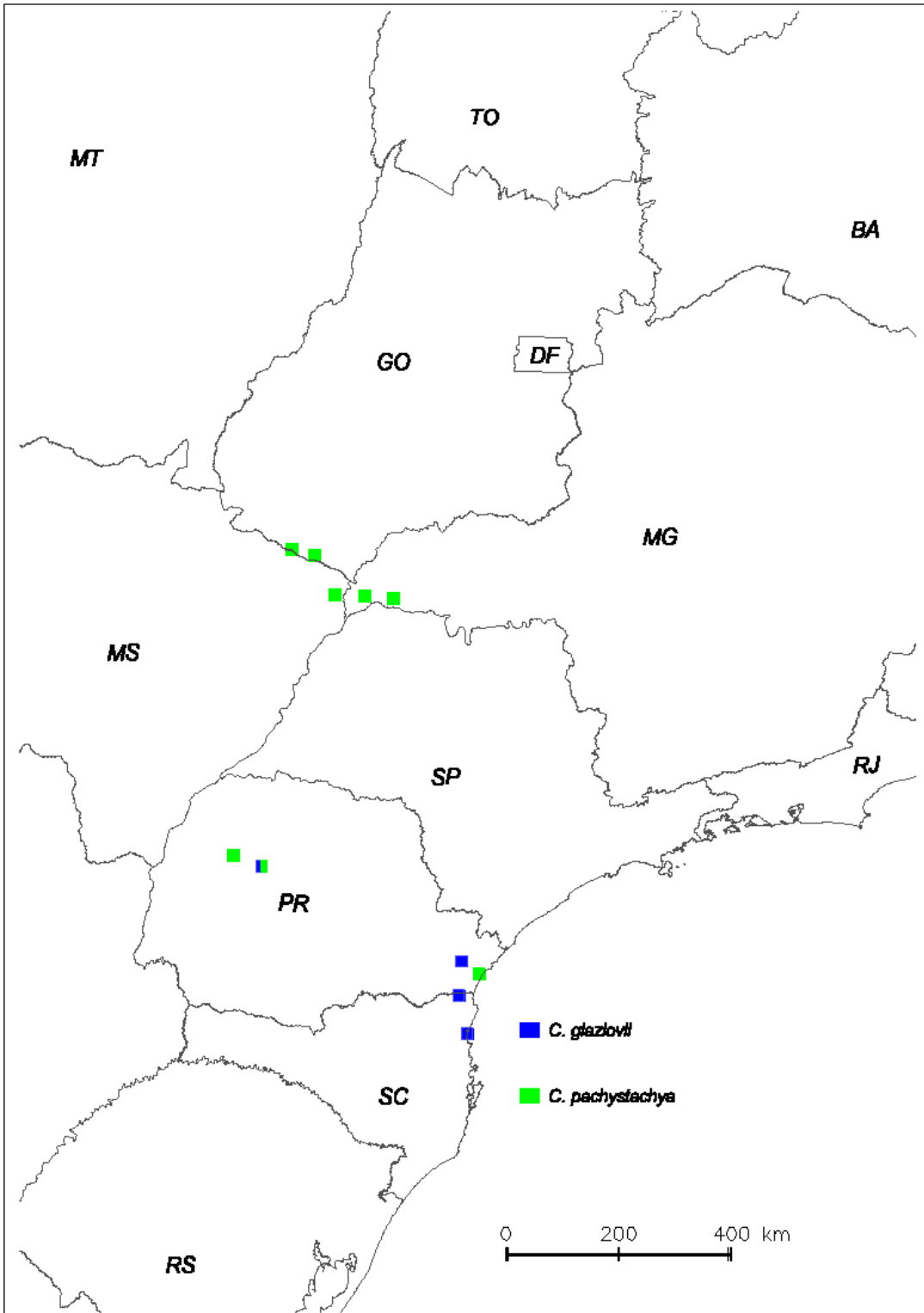


Figura 1

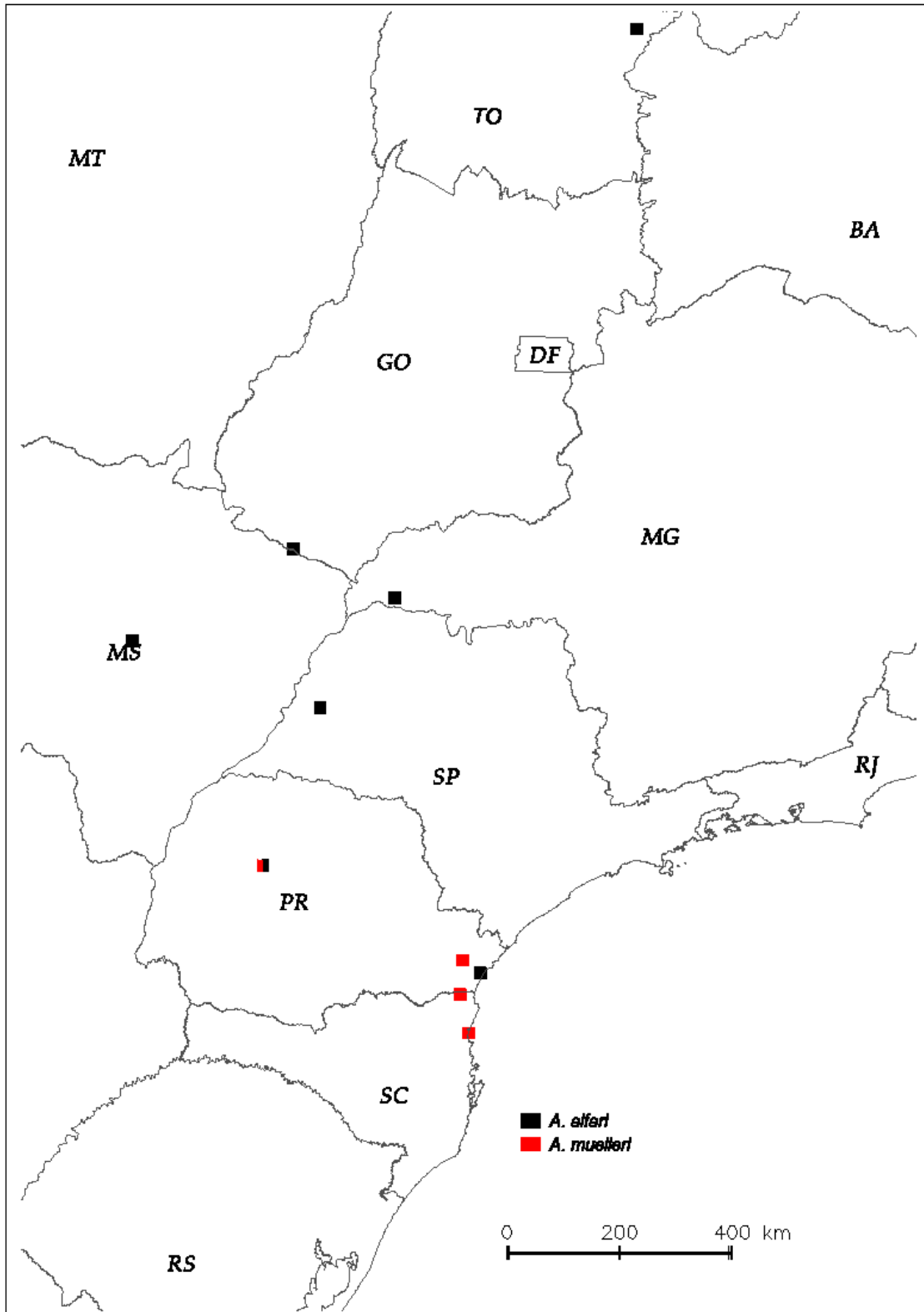


Figura 2

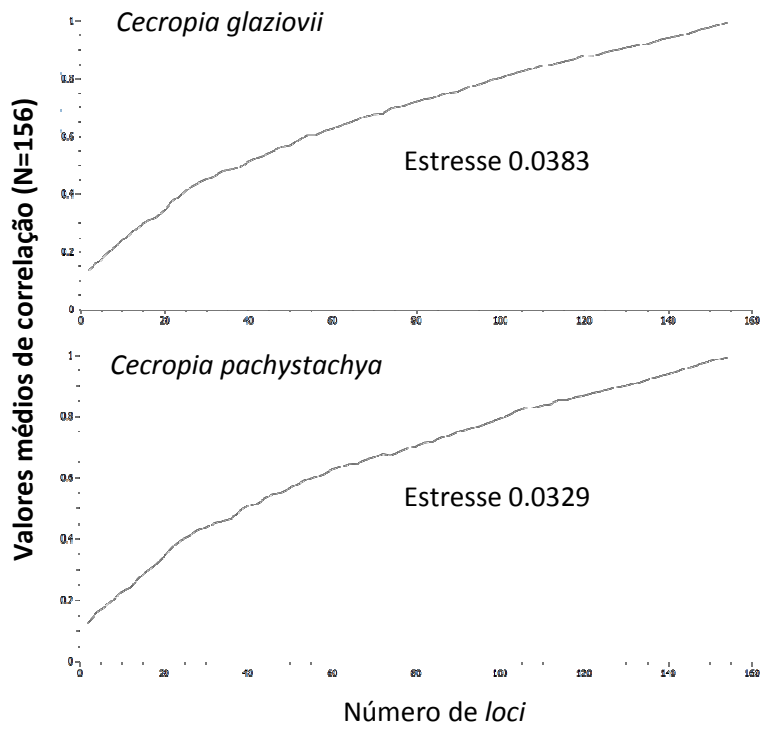


Figura 3

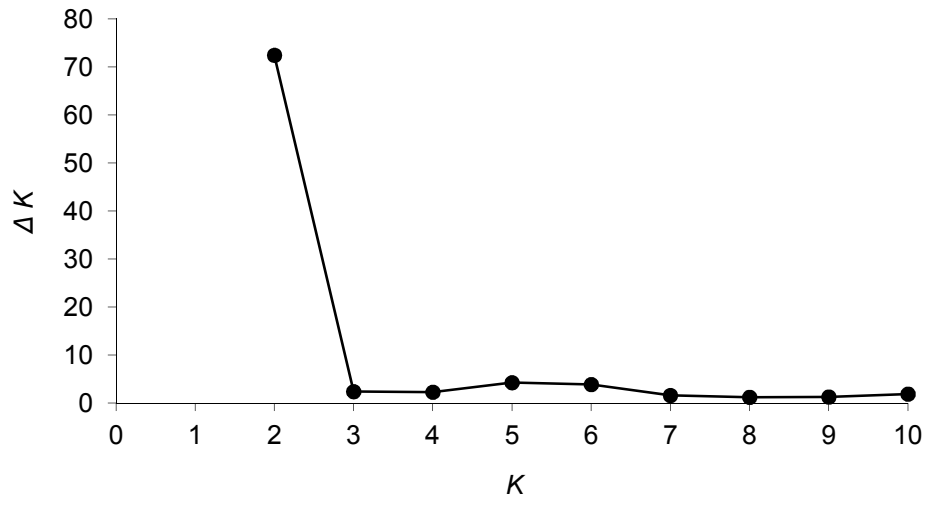


Figura 4

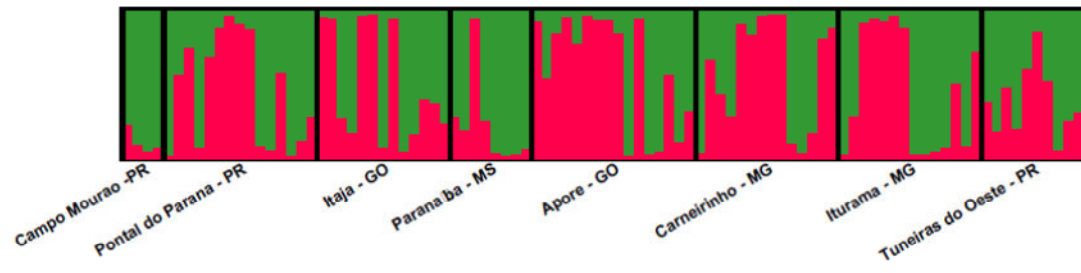


Figura 5

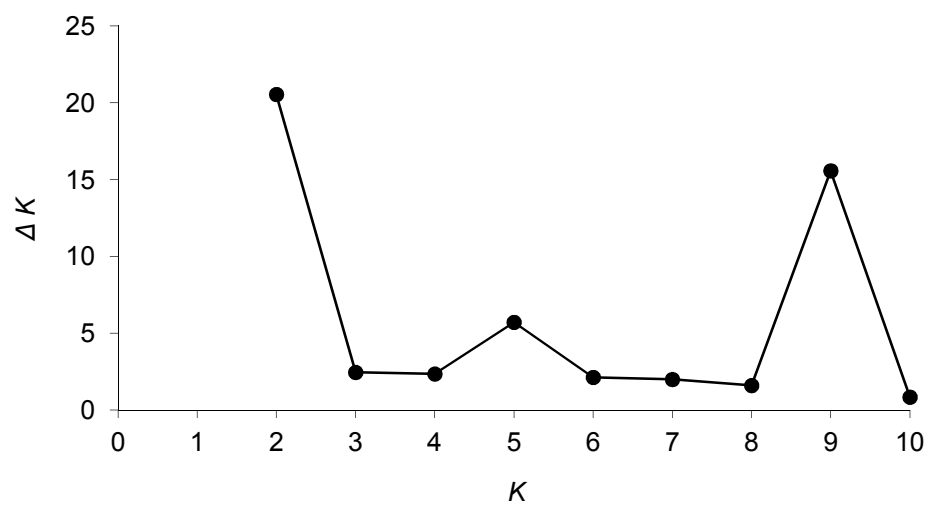


Figura 6

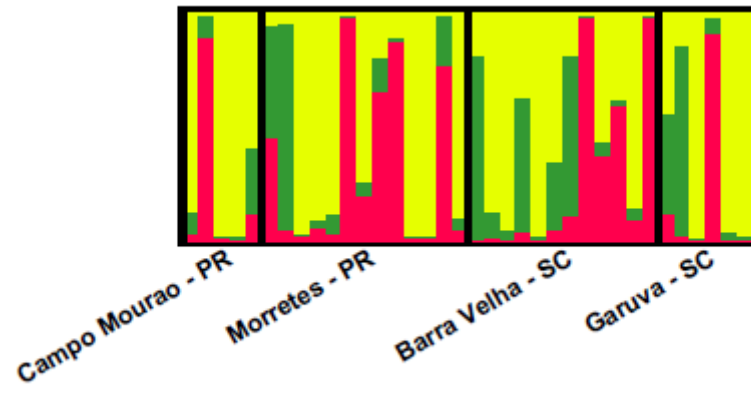


Figura 7

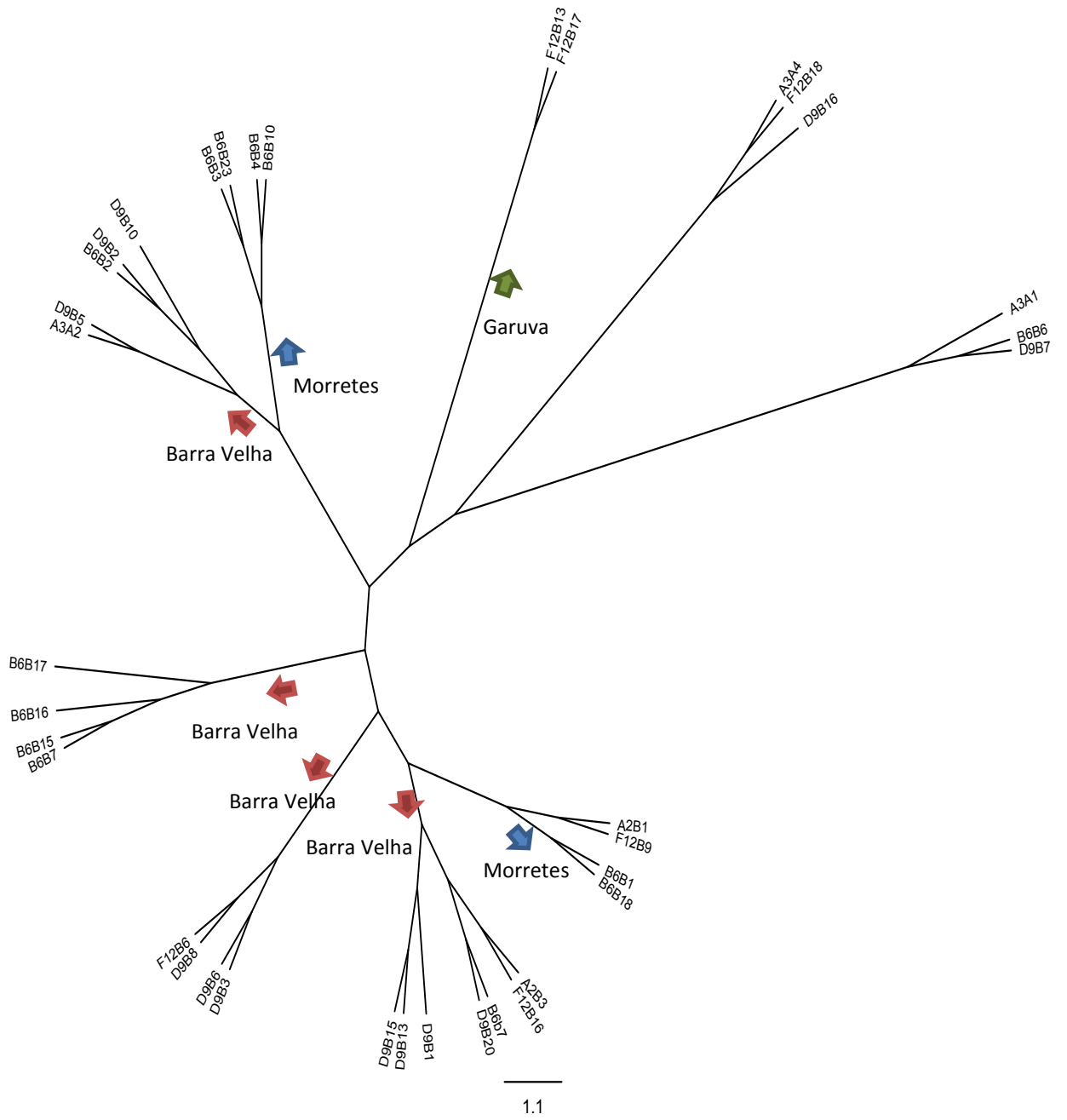


Figura 9

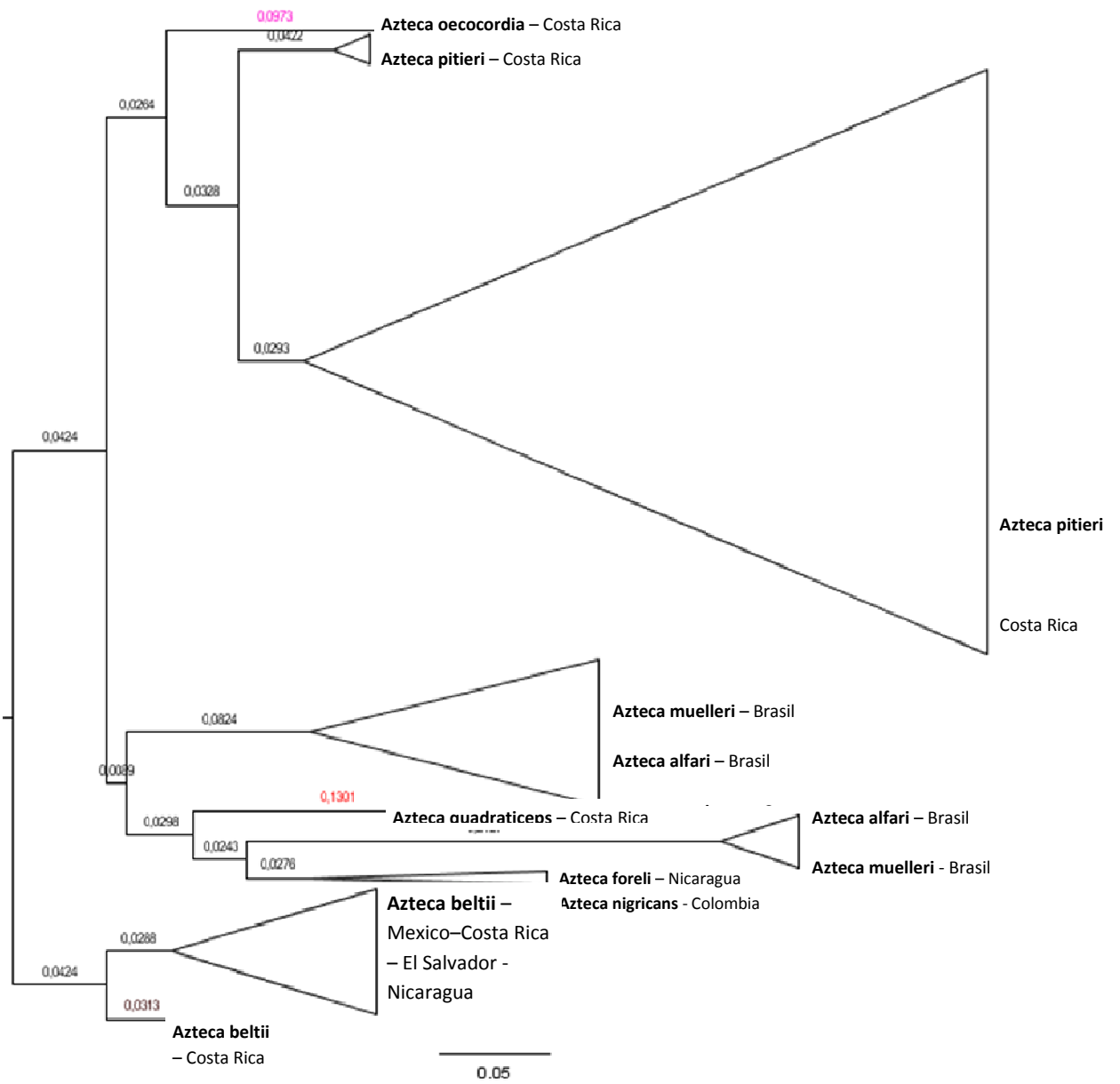


Figura 10

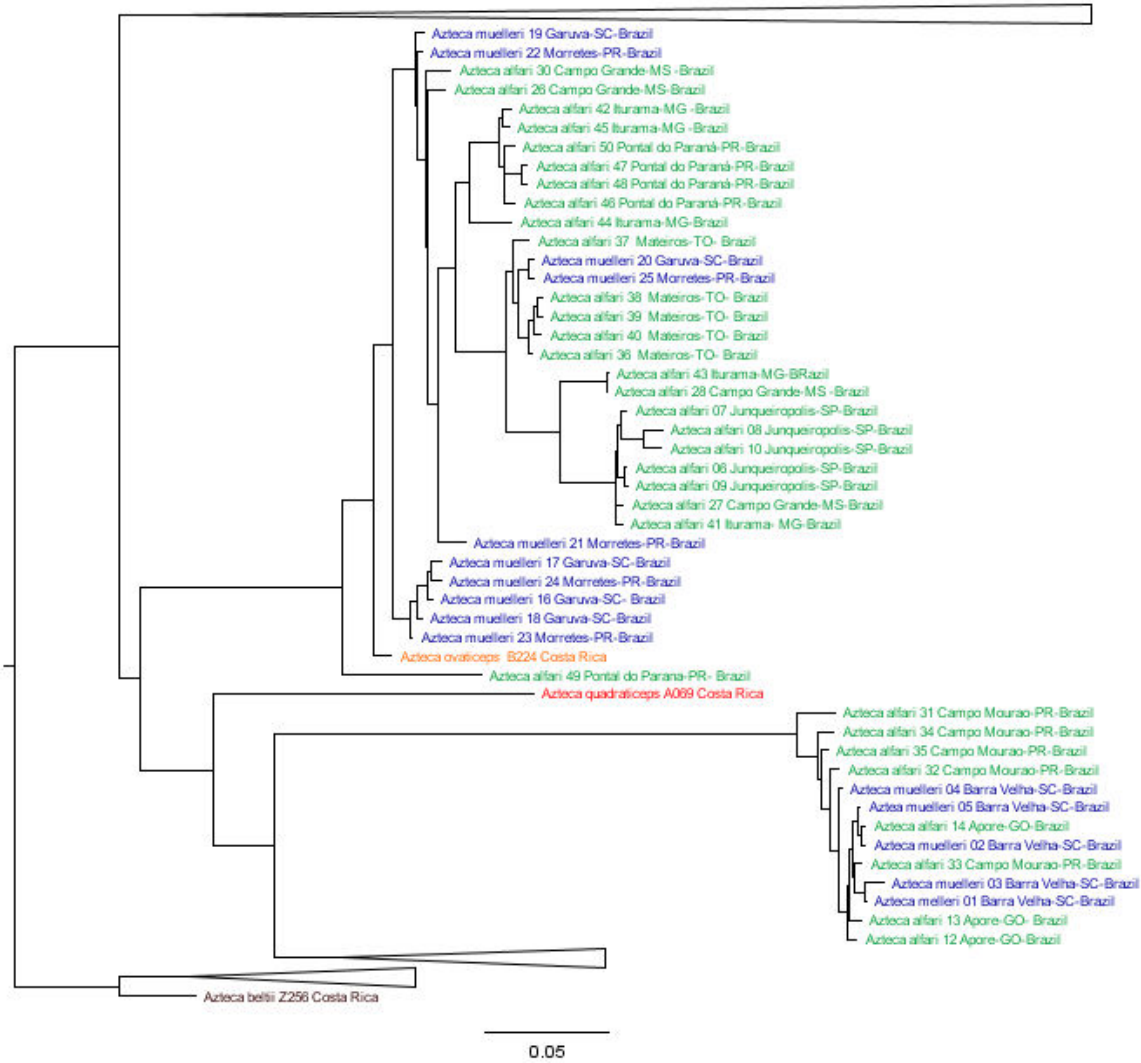


Figura 11

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo apresentou aspectos importantes sobre a distribuição geográfica de espécies do gênero *Cecropia* bem como das formigas *Azteca* associadas, estrutura populacional desses organismos e as variações decorrentes de sua biologia. Considerou efeitos do ambiente na distribuição efetiva dessas plantas e suas formigas residentes. Investigou ainda aspectos referentes a distribuição potencial de espécies, bem como as utilidades de ferramentas de modelagem baseadas na teoria de nicho. Essa descrição de distribuição das espécies de *Cecropia* pode ser extrapolada para indivíduos do gênero *Azteca*, mas apenas aos que estiverem associados a *Cecropia*, pois não se tem informações de distribuição de espécies de *Azteca* de vida livre ou das que tenham associações com outra mirmecófitas. Os habitats ocupados por *Cecropia* têm muitas características comuns ao hábito pioneiro das plantas desse gênero. Existem fatores históricos referentes à expansão e retração das florestas remanescentes que podem resultar em características mais específicas dos habitat que na atualidade podem ser bastante diversificados. Essa diversificação ambiental pode refletir na adaptação das espécies de *Cecropia* ao longo do tempo inclusive das formigas associadas a elas. Essas diferenciações por menores que possam ser, definem pares mutualísticos mais ou menos especializados, como o caso de *Azteca alfari* que ocorre em diversas espécies de *Cecropia* mostrando uma relação de pouca especificidade, e *A. muelleri* que mostrou ter um grau de especialização mais estreito com *Cecropia glaziovii*. Outra abordagem desse trabalho foi a descrição genético-populacional de indivíduos de *Cecropia* e de *Azteca* reforçando a utilização de ferramentas moleculares em estudos de genética de populações. A análise mostrou que os marcadores são eficientes, mas podem ter restrições no seu uso dependendo do grupo estudado, do nível taxonômico que se deseja estudar e a escala de análise, pois é cada vez mais frequente estudos envolvendo genética e interpretação ecológica em nível de paisagem. Essa adequação é primordial, pois muitas vezes as questões podem ser respondidas com associação de mais marcadores e as respostas podem ser mais robustas. De qualquer forma, os resultados deste trabalho mostram que não houve congruência da distribuição geográfica com as estruturas genéticas demonstradas pelas espécies do par mutualístico. Mais uma vez reforça-se o efeito de fatores históricos somados aos metodológicos que podem refletir essas incoerências. *Cecropia-Azteca* é um sistema complexo pois possuem diferentes modos reprodutivos,

adaptações e especificidades da interação, que variam nos diferentes ambientes mas que mantêm determinados padrões típicos de uma planta pioneira mirmecofita e uma formiga adaptada a sua ocupação como hospedeira. Como é um sistema amplamente distribuído e conhecido, pode ser um modelo para estudos e inferências no campo da coevolução. O presente estudo contribui com uma descrição de cunho investigativo abrindo portas para outras pesquisas que complementem as possíveis lacunas existentes, nessa interação bastante frequente nos neotrópicos.