

ALFREDO OTÁVIO RODRIGUES DE CARVALHO

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA E IDENTIFICAÇÃO DE
ESPÉCIES DO GÊNERO *ATTA* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) POR
MEIO DE MARCADORES MOLECULARES**

Tese apresentada à Coordenação do Curso
de Pós-Graduação em Ciências Biológicas,
área de concentração em Entomologia, da
Universidade Federal do Paraná, para a
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira

CURITIBA
2000

ALFREDO OTÁVIO RODRIGUES DE CARVALHO

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA E IDENTIFICAÇÃO DE
ESPÉCIES DO GÊNERO *ATTa* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) POR
MEIO DE MARCADORES MOLECULARES**

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, pela banca examinadora:



Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira

Dr. Evôneo Berti Filho

Dra. Lúcia Massuti de Almeida

Dr. Luiz Carlos Forti

Dra. Sonia Maria Noemberg Lazzari

À memória de meus pais,
DEDICO.

Aos meus filhos,
Mariana e Henrique,
e à Neuza,
OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar os meus agradecimentos ao amigo e orientador Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira, pela segura e dedicada orientação durante todas as etapas de realização deste trabalho.

Ao IAPAR – Instituto Agrônômico do Paraná – pela oportunidade concedida e suporte financeiro à execução do projeto de tese.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, UFPR – Universidade Federal do Paraná, pelos ensinamentos e amizade.

Ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – pela concessão da bolsa de estudos durante o primeiro ano de realização do curso.

Ao Dr. Francisco de Assis Menezes Mariconi e Dr. Luiz Carlos Forti, pela identificação das espécies de saúvas analisadas neste trabalho.

À Dra. Sueli Souza Martinez pela revisão da língua portuguesa e sugestões.

Aos colegas, Dr. Adilson Kenji Kobayashi e Dr. Luiz Filipe P. Pereira, pela constante colaboração, sugestões e amizade durante a execução deste trabalho.

Aos colegas que colaboraram enviando os espécimes de saúva de diversas regiões do país e também do exterior.

Aos meus familiares pelo amor, carinho e apoio que sempre me dedicaram.

A todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram com a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 Origem	1
1.2 Distribuição	1
1.3 Importância	2
1.4 Histórico do Gênero	2
1.5 Uso de Marcadores Moleculares em Taxonomia de Insetos	6
1.6 Objetivos	8

CAPÍTULO 2

COMPARAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO DE <i>ATTA</i> SPP. PARA EXTRAÇÃO DE DNA PARA ANÁLISES DE PCR-RAPD	9
2.1 Introdução	9

2.2	Material e Métodos	15
2.3	Resultados e Discussão	18
2.3.1	Quantidade de DNA	18
2.3.2	Qualidade do DNA	22
2.4	Conclusões	28

CAPÍTULO 3

OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES PARA ANÁLISES PCR-RAPD EM <i>ATTA</i> SPP.		32
3.1	Introdução	32
3.2	Material e Métodos	34
3.2.1	Avaliação de Métodos de Extração de DNA	34
3.2.1.1	Método ME ₁	34
3.2.1.2	Método ME ₂	35
3.2.1.3	Método ME ₃	36
3.2.1.4	Método ME ₄	36
3.2.2	Determinação de Fatores com Maiores Efeitos em PCR-RAPD	38
3.2.3	Otimização dos Fatores	42
3.3	Resultados e Discussão	42
3.3.1	Extração de DNA	42
3.3.2	Fatores de Maiores Efeitos	48
3.3.3	Otimização da Concentração de MgCl ₂ e Quantidade de DNA	55
3.4	Conclusões	58

CAPÍTULO 4

ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA E IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>ATTA</i> POR MEIO DE PCR-RAPD	59
4.1 Introdução	59
4.2 Material e Métodos	61
4.2.1 Espécies	61
4.2.2 Extração de DNA	63
4.2.3 PCR-RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso)	63
4.2.4 Análise dos Dados	64
4.3 Resultados e Discussão	65
4.3.1 Diversidade Genética	65
4.3.2 Identificação das Espécies	74
4.4 Conclusões	87

CAPÍTULO 5

PCR-RFLP DA REGIÃO ITS (INTERNAL TRANSCRIBED SPACERS) DO DNA RIBOSSÔMICO DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>ATTA</i>	88
5.1 Introdução	88
5.2 Material e Métodos	95
5.2.1 Espécies	95
5.2.2 Extração de DNA	95
5.2.3 PCR (Reação da Polimerase em Cadeia)	97
5.2.4 Análise de Restrição do PCR	97

5.3 Resultados e Discussão	99
5.4 Conclusões	109

CAPÍTULO 6

CONSIDERAÇÕES FINAIS	111
LITERATURA CITADA	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 Quantidade de DNA (μg) extraído da cabeça de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> nas diferentes épocas e tratamentos avaliados avaliados (média de 4 repetições)	19
Tabela 2.2 Quantidade de DNA (μg) extraído da cabeça de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> nas diferentes épocas e tratamentos avaliados avaliados (média de 4 repetições).	20
Tabela 2.3 Efeito dos diferentes métodos de preservação sobre a qualidade de DNA (porcentagem de DNA $\geq 9,4$ kb), extraído da cabeça de soldado de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> obtido nas diferentes épocas.	23
Tabela 2.4 Análise de variância (ANOVA) - $P < 0,05$ - para a qualidade do DNA ($\geq 9,4$ kb) extraído da cabeça de soldado de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> , em função dos tratamentos e épocas de armazenamento	25
Tabela 3.1 Fatores e níveis avaliados através do Delineamento Fatorial Fracionado (DFF)	39
Tabela 3.2 Programas de amplificação utilizados para seleção de fatores. com maiores efeitos em PCR-RAPD	40
Tabela 3.3 Matriz do Delineamento Fatorial Fracionado (DFF) $2^{(5-2)}$	41
Tabela 3.4 Matriz do Delineamento Central Composto (DCC)	43
Tabela 3.5 Quantidade de DNA (μg) extraído/cabeça de operária máxima de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> , por diferentes métodos	44

Tabela 3.6 Influência do método de extração sobre a qualidade do DNA extraído de cabeças de operária máxima de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	49
Tabela 3.7 Efeito dos diferentes fatores sobre o padrão de bandas obtidos em PCR-RAPD com DNA extraído da cabeça de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> e amplificado com seis primers	52
Tabela 4.1 Procedência das espécies do gênero <i>Atta</i> analisadas via PCR-RAPD	62
Tabela 4.2. Polimorfismos gerados pelos primers nas análises de variabilidade genética do gênero <i>Atta</i> , via PCR-RAPD	66
Tabela 4.3 Matriz de similaridade genética entre diferentes espécies de <i>Atta</i> , calculada através do coeficiente de Jaccard	67
Tabela 4.4 Identificação de espécies do gênero <i>Atta</i> , baseada na ausência ou presença de fragmentos (tamanho aproximado em pb) de PCR-RAPD, usando diferentes primers	75
Tabela 5.1 Espécies, subgêneros e local de origem das amostras de <i>Atta</i> analisadas por meio de PCR-RFLP.	96
Tabela 5.2 Seqüência dos diferentes primers utilizados nas análises da região ITS	98
Tabela 5.3 Tamanho estimado dos fragmentos (pb) da região ITS do rDNA amplificado via PCR, clivado com as enzimas <i>HaeIII</i> e <i>TaqI</i>	105

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1 Condições do DNA após 90 dias de armazenamento. (M) marcador λ DNA/*Hind* III; (1-2) -70°C; (3-4) etanol 95% a -20°C; (5-6) etanol 95% a 4°C; (7-8) etanol 95% à TA; (9-10) sílica gel à TA; (11-12) solução tampão à TA; (13-14) formiga fresca 26
- Figura 2.2 Condições do DNA após 360 dias de armazenamento. (M) marcador λ DNA/*Hind* III; (1) -70°C; (2) etanol 95% a -20°C; (3) etanol 95% a 4°C; (4) etanol 95% à TA; (5) sílica gel à TA; (6) solução tampão à TA; (7) formiga fresca 27
- Figura 2.3 Reproducibilidade do PCR-RAPD com DNA extraído aos 210 dias (primer OPB-07). (M) marcador ladder 100; (1-2) -70°C; (3-4) etanol 95% a -20°C; (5-6) etanol 95% a 4°C; (7-8) etanol 95% à TA; (9-10) sílica gel à TA; (11-12) solução tampão à TA; (13-14) formiga fresca 29
- Figura 2.4. Reproducibilidade do PCR-RAPD com DNA extraído aos 360 dias (primer OPB-01). (M) marcador 100pb; (1-2) -70°C; (3-4) etanol 95% a -20°C; (5-6) etanol 95% a 4°C; (7-8) etanol 95% à TA; (9-10) sílica gel à TA; (11-12) solução tampão à TA; (13-14) formiga fresca 30
- Figura 3.1 Integridade do DNA de *A. sexdens rubropilosa* extraído por meio de diferentes métodos. (M) marcador λ *Hind*III; (1-2) método ME₄; (3-4) método ME₁; (5-6) método ME₂; (7-8) método ME₃. 47

- Figura 3.2 Reproducibilidade do padrão de bandas de PCR-RAPD obtido com DNA extraído de diferentes espécimes de *A. sexdens rubropilosa*, por meio de diferentes métodos e amplificado com o primer OPB-03. (M) marcador 100 pb; (1-5) método ME₂; (6-10) método ME₄ 50
- Figura 3.3 Superfície de resposta do padrão de PCR-RAPD em função das concentrações de MgCl₂ e quantidade de DNA. As condições ótimas para PCR-RAPD encontram-se na área central da figura. Primer OPA-04 56
- Figura 4.1 Dendograma construído com base em dados de RAPD, utilizando o método UPGMA, sobre a matriz de similaridade calculada pelo coeficiente de Jaccard, indicando a similaridade entre as espécies de *Atta* 68
- Figura 4.2 Padrão de fragmentos amplificados por PCR-RAPD de espécimes de *Atta* obtido com o primer OPB-12. (M) marcador 100 pb; (1; 2; 4) *A. capiguara*; (3) *Atta* sp.; (5-9) *A. laevigata*; (10) *A. vollenweideri*; (11-12) *A. cephalotes*; (13-14) *A. bisphaerica* 78
- Figura. 4.3 Padrão de fragmentos amplificados por PCR-RAPD de espécimes de *Atta*. {A}: Primer OPA-10 - (M) marcador 100 pb; (1-2) *A. sexdens piriventris*; (3-6) *A. sexdens rubropilosa*; (7-8) *A. sexdens sexdens*; {B}: Primer OPA-07 - (M) marcador 100pb; (1-2) *A. sexdens piriventris*; (3-6) *A. sexdens rubropilosa*; (7-10) *A. sexdens sexdens* 79
- Figura 4.4 Padrão de fragmentos amplificados por PCR-RAPD de espécimes de *Atta* obtido com o primer OPA-07. (M) marcador 100 pb; (1-2) *A. sexdens piriventris*; (3-6) *A. sexdens rubropilosa*; (7-10) *A. sexdens sexdens*; (11) *A. opaciceps*; (12-14) *A. robusta* 80

Figura 4.5 Padrão de fragmentos amplificados por PCR-RAPD de espécimes de *Atta* obtido com o primer OPA-03. (M) marcador 100 pb; (1-3) *A. sexdens piriventris*; (4-7) *A. sexdens rubropilosa*; (8-11) *A. sexdens sexdens*; (12) *A. opaciceps*; (13-15) *A. robusta* 81

Figura 4.6 Padrão de fragmentos amplificados por PCR-RAPD de espécimes de *Atta* obtido com o primer OPA-03. (M) marcador 100 pb; (1-5) *A. capiguara*; (6-10) *A. laevigata*; (11) *A. vollenweideri*; (12-13) *A. cephalotes*; (14-15) *A. bisphaerica* 82

Figura 4.7 Padrão de fragmentos amplificados por PCR-RAPD de espécimes de *Atta* obtido com o primer OPA-10. (M) marcador 100 pb; (1-2) *A. sexdens piriventris*; (3-6) *A. sexdens rubropilosa*; (7-8) *A. sexdens sexdens*; (9) *A. opaciceps*; (10-12) *A. robusta* 83

Figura 4.8 Padrão de fragmentos amplificados por PCR-RAPD de espécimes de *Atta* obtido com o primer OPB-17. (M) marcador 100 pb; (1; 2; 3; 5) *A. capiguara*; (4) *Atta* sp.; (6-10) *A. laevigata*; (11) *A. vollenweideri*; (12-13) *A. cephalotes*; (14-15) *A. bisphaerica* 84

Figura 4.9 Padrão de fragmentos amplificados por PCR-RAPD de espécimes de *Atta* obtido com o primer OPB-04. (M) marcador 100 pb; (1) *Atta* sp.; (2-3) *A. capiguara*; (4-6) *A. laevigata*; (7) *A. vollenweideri*; (8-10) *A. robusta*; (11-12) *A. cephalotes*; (13-14) *A. bisphaerica* 85

Figura 4.10 Padrão de fragmentos amplificados por PCR-RAPD de espécimes de *Atta* obtido com o primer OPA-10. (M) marcador 100 pb; (1-4) *A. capiguara*; (5-8) *A. laevigata*; (9) *A. vollenweideri*; (10-11) *A. cephalotes*; (12-13) *A. bisphaerica* 86

Figura 5.1 Estrutura do "cluster" gênico do rDNA mostrando as regiões ITS1 e ITS2 (Internal transcribed spacer). As seqüências amplificadas neste

trabalho encontram-se entre os sítios de anelamento dos primers ITS1 e ITS4. 18S: sequência do rDNA 18S; 5.8S: sequência do rDNA 5.8S; 28S: sequência do rDNA 28S 93

Figura 5.2 Produtos da amplificação da região ITS1 do rDNA de diferentes espécies de *Atta*, com os primers ITS1 e ITS2. (M) marcador 100 pb; (1) *A. sexdens piriventris*; (2) *A. sexdens rubropilosa*; (3) *A. sexdens sexdens*; (4) *A. opaciceps*; (5) *A. robusta*; (6) *A. capiguara*; (7) *A. laevigata*; (8) *A. vollenweideri*; (9) *A. cephalotes*; (10) *A. bisphaerica* 100

Figura 5.3 Produtos da amplificação das regiões ITS1 + ITS2 do rDNA de diferentes espécies de *Atta*, com os primers ITS1 e ITS4. (M) marcador 100 pb. (1) *A. sexdens piriventris*; (2) *A. sexdens rubropilosa*; (3) *A. sexdens sexdens*; (4) *A. opaciceps*; (5) *A. robusta*; (6) *A. capiguara*; (7) *A. laevigata*; (8) *A. vollenweideri*; (9) *A. cephalotes*; (10) *A. bisphaerica* 101

Figura 5.4 Padrão de restrição da região ITS1 do rDNA de espécies de *Atta* obtido após digestão com a enzima *HaeIII*. (M) marcador 100 pb; (1) *A. sexdens piriventris*; (2) *A. sexdens rubropilosa*; (3) *A. sexdens sexdens*; (4) *A. opaciceps*; (5) *A. robusta*; (6) *A. capiguara*; (7) *A. laevigata*; (8) *A. vollenweideri*; (9) *A. cephalotes*; (10) *A. bisphaerica* 103

Figura 5.5 Padrão de restrição da região ITS do rDNA de espécie de *Atta* obtido após digestão com a enzima *TaqI*. (M) marcador 100 pb; (1) *A. sexdens piriventris*; (2) *A. sexdens rubropilosa*; (3) *A. sexdens sexdens*; (4) *A. opaciceps*; (5) *A. robusta*; (6) *A. capiguara*; (7) *A. laevigata*; (8) *A. vollenweideri*; (9) *A. cephalotes*; (10) *A. bisphaerica* 104

Figura 5.6. Padrão de restrição da região ITS1 + ITS 2 do rDNA de espécies de *Atta* obtido após digestão com a enzima *HaeIII*. (M) marcador 100 pb; (1) *A. sexdens sexdens*; (2) *A. sexdens rubropilosa*; (3) *A. sexdens piriventris*; (4) *A. opaciceps*; (5) *A. robusta*; (6) *A. capiguara*; (7) *A. laevigata*; (8) *A. vollenweideri*; (9) *A. cephalotes*; (10) *A. bisphaerica* .
..... 106

RESUMO

A variabilidade genética de espécies e subespécies do gênero *Atta* (Hymenoptera: Formicidae) foi analisada por meio de marcadores moleculares, empregando-se as técnicas PCR-RAPD (polymerase chain reaction – randomly amplified polymorphic DNA) e PCR-RFLP (polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism) da região ITS (internal transcribed spacers) do DNA ribossômico. Para alcançar os objetivos propostos foram desenvolvidos quatro trabalhos, sendo que inicialmente foram selecionados métodos de preservação para *Atta* spp., visando a obtenção de DNA em quantidade e qualidade suficientes para as análises. Constatou-se que por um período de até sete meses, a preservação pode ser feita em qualquer um dos sistemas avaliados: -70°C, etanol 95% a -20°C, etanol 95% a 4°C, etanol 95% à temperatura ambiente (TA), sílica gel à TA e tampão de extração à TA. Para um período de até 12 meses, com exceção da preservação em etanol 95% à TA, a preservação poderá ser feita em qualquer dos métodos avaliados. Posteriormente, determinaram-se as condições ótimas para a utilização da técnica PCR-RAPD, através da avaliação de alguns parâmetros com maior influência na eficiência da reação, utilizando-se os delineamentos estatísticos fatorial fracionado e central composto. Os melhores perfis de bandas de PCR-RAPD foram obtidos com as seguintes condições: 1 X tampão [10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 3,0 mM Mg²⁺, 50 mM KCl], 100 µM de cada dNTP, 0,2 µM de primer, 1,0 U de *Taq* polimerase, 25 ng DNA e BSA 0,05%, utilizando-se o programa de amplificação: 3 min a 94°C, 3 min a 35°C, seguidos de

40 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 36°C e 2 min a 72°C, com extensão final de 5 min a 72°C. Na análise da diversidade genética de oito espécies e duas subespécies do gênero *Atta* por meio de PCR-RAPD, 206 fragmentos polimórficos gerados por 11 primers foram selecionados. A análise de agrupamento utilizando o método UPGMA, sobre uma matriz de similaridade calculada pelo coeficiente de Jaccard, permitiu distribuir as espécies em quatro grupos: I) *Atta sexdens piriventris*, *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta sexdens sexdens* e *Atta robusta*; II) *Atta opaciceps*; III) *Atta capiguara*, *Atta vollenweideri*, *Atta laevigata*, *Atta* sp. e *Atta bisphaerica*; IV) *Atta cephalotes*. Esses grupos correspondem, em sua maioria, aos subgêneros estabelecidos por Borgmeier em 1959. Por meio de PCR-RAPD, alguns fragmentos polimórficos facilmente identificáveis (presentes em alguns indivíduos, ausentes em outros), gerados pelos primers OPA-03, OPA-07 e OPA-10, permitiram a identificação das espécies e subespécies analisadas. A análise da região ITS do DNA ribossômico das espécies de *Atta* permitiu demonstrar que essa região pode ser útil para agrupar as espécies dentro de subgêneros, confirmando os resultados obtidos na análise da diversidade, assim como para identificar algumas espécies.

ABSTRACT

The genetic variability of species and subspecies of the genus *Atta* (Hymenoptera: Formicidae) was analyzed by means of molecular markers, using PCR-RAPD (polymerase chain reaction - randomly amplified polymorphic DNA) and PCR-RFLP (polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism) of the ITS region (internal transcribed spacers) of the ribosomal DNA. To reach the proposed objectives, four experiments were carried out. First, methods were studied to preserve *Atta* spp. for extraction of high amounts of good quality DNA to be used in RAPD analysis. The data showed that the insects can be well preserved up to seven months in any one of the studied systems: -70°C, ethanol 95% at -20°C, ethanol 95% at 4°C, ethanol 95% at room temperature (RT), silica gel at RT and extraction buffer at RT. For a period of up to 12 months, except for the preservation in ethanol 95% at RT, DNA with quality could be extracted using any of the methods. Subsequently, the optimum conditions for PCR-RAPD were determined using fractional factorial and central composite statistical designs to evaluate some parameters with large influence in the reaction efficiency. The best band profiles were obtained with the following conditions: 1 X buffer [10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 3,0 mM Mg²⁺, 50 mM KCl], 100 mM of each dNTP, 0,2 primer mM, 1,0 U of Taq polymerase, 25 ng DNA and BSA 0,05%, using the amplification program: 3 min at 94°C, 3 min at 35°C, followed by 40 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 36°C and 2 min at 72°C, with a final extension step of 5 min at 72°C. To assess the genetic diversity of eight species and two subspecies of the genus *Atta*

through PCR-RAPD, eleven arbitrary primers were selected, generating 206 polymorphic fragments. The grouping analysis using the UPGMA method on a similarity matrix calculated by the coefficient of Jaccard, sub-divided the species in four groups: I) *Atta sexdens piriventris*, *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta sexdens sexdens* e *Atta robusta*; II) *Atta opaciceps*; III) *Atta capiguara*, *Atta vollenweideri*, *Atta laevigata*, *Atta* sp. e *Atta bisphaerica*; IV) *Atta cephalotes*. These groups fit quite well into the established subgenus described by Borgmeier em 1959. Clearly distinctive polymorphic fragments (presents in some individuals, absent in others) generated by the primers OPA-03, OPA-07 and OPA-10 allowed the identification of the species and subspecies used in this study. Finally, the PCR-RFLP analysis of the ITS region of the ribosomal DNA of the *Atta* species demonstrated that this region is useful to group the species in subgenera, confirming the results obtained with PCR-RAPD, as well as to identify some species.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Origem

O gênero *Atta* Fabricius, 1805 (Hymenoptera; Formicidae; Myrmicinae; Attini) compreende as formigas cultivadoras de fungo, popularmente conhecidas por saúvas.

Segundo Jacobi, 1919, citado por Borgmeier, 1950, o centro de irradiação de um gênero geralmente se encontra onde ele é representado pelo maior número de espécies. O Brasil, por contar com o maior número de espécies do gênero *Atta*, distribuídas nos seus mais variados ecossistemas, é considerado o centro de origem e de irradiação do gênero, mais especificamente na região Norte do Amazonas.

1.2 Distribuição geográfica

Devido à alta capacidade de adaptação aos mais diversificados ambientes, a área de dispersão das saúvas vai do sul dos Estados Unidos, Texas (latitude 33° N), até o sul da Argentina (latitude 44°). No entanto, não são encontradas no Chile, em algumas ilhas do Caribe e no Canadá. Quanto à distribuição vertical, elas são encontradas do zero a estratos de até 2.500 m de altitude, de acordo com Sales (1998). No Brasil, ocorrem em todos os estados (Della Lucia, 1993).

1.3 Importância

Devido ao hábito que possuem de cortar e transportar fragmentos de diversos vegetais para os seus ninhos para cultivar o fungo do qual se alimentam, em determinadas situações podem causar sérios prejuízos à agricultura, pastagens e reflorestamentos. Embora a maioria dos autores vejam as saúvas somente como inseto-praga, há aqueles que atribuem a elas alguns efeitos benéficos, tais como a aeração do solo, reciclagem de nutrientes e fonte de alimentação (Sales & Gomes, 1984; Sales, 1998).

1.4 Histórico do gênero

As formigas cortadeiras do gênero *Atta* sempre despertaram a atenção de pesquisadores, tendo sido inclusive citadas pelo padre Anchieta, em 1560. Até meados do século passado poucas referências bibliográficas são encontradas sobre elas, mas a partir dessa época as pesquisas se intensificaram, sendo hoje o volume de trabalhos muito extenso.

De acordo com Tropicair (1973), em Mariconi (1970) são citados 155 trabalhos, dos quais 46% referem-se a métodos de controle; 19% sobre aspectos gerais ou de determinada espécie, incluindo também os tratados gerais sobre insetos; 10% tratam de aspectos biológicos que podem conter ou não alguma referência ecológica; 9% referem-se à sistemática e à classificação; 8% sobre a estrutura do ninho e problemas ligados ao fungo; 3% analisam a saúva como praga e sua depredação e outros 3% abordam o parasitismo e outros aspectos; os demais referem-se à ecologia. Embora muitos outros trabalhos tenham sido

desenvolvidos a partir dessa data, acreditamos que esses índices não tenham sofrido grandes alterações.

Observa-se por esses dados que são poucos os trabalhos voltados à taxonomia. De acordo com Carvalho (1998), um dos fatores que contribuem para a escassez de trabalhos nessa área é falta de taxonomistas. O Brasil dispõe de um número muito reduzido de especialistas capazes de identificar corretamente as espécies do gênero *Atta*. Outro fator que contribui para tal situação é a dificuldade para se identificar as espécies. Segundo Borgmeier (1950) "um dos aspectos menos agradáveis da taxonomia das formigas é o fato de ela ser baseada quase que exclusivamente em operárias, isto é, em fêmeas estéreis. Ainda, segundo o autor, a distinção das espécies de *Atta* somente pelos caracteres das operárias é difícilima e quase impossível, pois as operárias não são apenas polimórficas, mas também certos caracteres são muito variáveis mesmo em operárias do mesmo tamanho.

Devido aos problemas taxonômicos acima relacionados, outros caracteres também passaram a ser utilizados para a diferenciação das espécies. Assim Mayr (1868) foi o primeiro a chamar a atenção para a grande importância da genitália masculina na sistemática do gênero *Atta*, sendo seguido por Emery (1913) e Forel (1913), citados por Gonçalves (1942), e por Borgmeier (1939; 1950; 1959).

A primeira grande revisão do gênero foi feita por Borgmeier (1939), que apresentou uma lista contendo 26 espécies de *Atta*, incluindo subespécies e variedades. Posteriormente, Gonçalves (1942) elaborou uma chave dicotômica para as espécies e observou que através da genitália masculina era possível estudar a filogenia das espécies e também separar as formas em três grupos bem

definidos, considerando-os como subgêneros: *Archeatta*, *Neoatta* e *Atta*. Nesse trabalho o autor validou 11 espécies e 18 subespécies. A seguir, Gonçalves (1942; 1944; 1982), descreveu três novas espécies. Em uma comparação minuciosa da genitália das espécies e subespécies, Borgmeier (1950) concluiu que o gênero deveria ser dividido em cinco subgêneros, descrevendo, portanto, dois novos: *Paleatta* e *Epiatta*. Em sua nova classificação o autor considerou 15 espécies e 15 subespécies. Revisando novamente o gênero, Borgmeier (1959) considerou o subgênero *Epiatta* sinônimo de *Neoatta* e manteve apenas quatro subgêneros. Cancelou também todos os nomes subespecíficos do gênero *Atta* e validou apenas 14 espécies. Gonçalves (1963), levando em conta considerações de ordem morfológica e biológica, revalidou três subespécies de *Atta sexdens*. Em sua grande obra, Mariconi (1970) considerou válidas as espécies citadas por Borgmeier (1959) e também as subespécies revalidadas por Gonçalves (1963), totalizando 16 espécies e subespécies, das quais 11 ocorriam no Brasil. O número de espécies e subespécies é elevado para 17, quando Gonçalves (1982) descreve uma nova espécie encontrada na Bahia. Desta forma, Della Lucia (1993) considerou 12 as espécies, incluindo aí as subespécies que ocorrem no Brasil. No entanto, com Bolton (1995) sinonimizando todas as subespécies de *A. sexdens* e com Delabie (1998) considerando a espécie descrita por Gonçalves (1982) como sinônimo de *Atta laevigata* (Fred. Smith, 1858), atualmente são reconhecidas 14 espécies: *A. colombica* Guérin, 1845; *A. insularis* Guérin, 1845; *A. mexicana* (F. Smith, 1858); *A. saltensis* Forel, 1913; *A. texana* (Buckley, 1860); *A. bisphaerica* Forel, 1908; *A. capiguara* Gonçalves, 1944; *A. cephalotes* (L., 1758); *A. goiana* Gonçalves, 1942; *A. laevigata* (F. Smith, 1858); *A. opaciceps* Borgmeier, 1939; *A.*

robusta Borgmeier, 1939; *A. sexdens* (L., 1758) e *A. vollenweideri* Forel, 1893. Com exceção das cinco primeiras espécies, as demais são encontradas no Brasil.

Quanto aos trabalhos sobre a filogenia do gênero *Atta*, tanto Emery (1922), citado por Gonçalves (1982), como Weber (1958) colocam-no em último lugar da tribo *Attini*, indicando assim a sua elevada especialização. Quanto à filogenia das espécies de *Atta*, Gonçalves (1942), com base nos caracteres da genitália masculina e auxiliado pelos das operárias, considerou as espécies do subgênero *Archeatta* as mais primitivas, sendo que desse subgênero originou-se o subgênero *Atta*. Considerou ainda o subgênero *Neoatta* o mais especializado dos três. Borgmeier (1950), ao descrever dois novos subgêneros, admitiu serem as espécies do subgênero *Paleatta* as mais primitivas e que deste grupo derivou o subgênero *Epiatta*, que foi a transição para *Neoatta*. O subgênero *Atta*, que derivou desse último segundo o autor, deve ter sua origem ao norte do Rio Amazonas, na sub-zona Guiana. Desse subgênero derivou o subgênero *Archeatta*. Borgmeier (1959) e Gonçalves (1986) consideram como sendo a seguinte a ordem de evolução dos subgêneros: *Atta*, *Archeatta*, *Neoatta* e *Paleatta*.

Por estes trabalhos observa-se que as espécies do gênero *Atta* sofreram várias alterações ao nível de subgênero, espécie, subespécie e variedade, demonstrando a falta de consenso entre os diversos taxonomistas.

1.5 Uso de marcadores moleculares em taxonomia de insetos

Segundo Martins (1978), no que diz respeito à entomologia, em todas as situações que tratam do controle ou do equacionamento de problemas ecológicos ou biológicos, o passo inicial é a identificação correta da espécie envolvida, cujo nome científico é a chave para a documentação, passada e futura, para o arquivamento ou comunicação da informação; é o elo de ligação entre todos os passos do conhecimento e do trabalho científico. Ainda, segundo o autor, sem possibilidade de contestação, a sistemática é a peça básica ou fundamental em qualquer atividade que se deseje desenvolver no campo da entomologia, seja ela pura, ou aplicada.

De acordo com Cenis (1994), os métodos morfológicos tradicionalmente utilizados para identificação de insetos apresentam muitas limitações em alguns grupos de insetos, tanto pela ambigüidade inerente ao seu uso como pela dificuldade de serem aplicados em alguns estádios de desenvolvimento do inseto.

Isto tem motivado a aplicação de técnicas baseadas no estudo de diferenças genéticas, de utilização mais difícil, porém mais estáveis e objetivas.

Com o avanço das técnicas de biologia molecular, diversos métodos de detecção de polimorfismo genético no DNA têm sido utilizados em estudos de sistemática de vegetais, microrganismos (bactérias, fungos e vírus), ácaros e insetos. A vantagem dessas técnicas é que permitem analisar diretamente a variabilidade da seqüência nucleotídica do DNA, incluindo tanto zonas altamente conservadas como outras variáveis. Como consequência, permitem detectar

diferenças genéticas muito menores e, portanto, refinar consideravelmente a análise taxonômica.

Dentre estas técnicas, a reação da polimerase em cadeia - polimorfismo de DNA amplificado ao acaso - PCR-RAPD (polymerase chain reaction-random amplified polymorphic DNA) (Williams *et al.*, 1990) tem sido utilizada com sucesso para identificar marcadores genéticos em diversas ordens de insetos, entre elas Coleoptera, Diptera, Homoptera, Hymenoptera, Lepidoptera e Orthoptera. Diversos autores têm utilizado essa técnica em trabalhos voltados à identificação e caracterização de espécies e na análise da variabilidade genética inter e intraespecífica de populações (Black *et al.*, 1992; Edwards *et al.*, 1993; Perring *et al.*, 1993; Valenberghe-Masutti, 1994; Shoemaker *et al.*, 1995; Garner *et al.*, 1996; Schreiber *et al.*, 1997; Pornkulwat *et al.*, 1998).

Outro importante marcador genético utilizado para separar espécies e biótipos, e também para análises filogenéticas de espécies estreitamente relacionadas ou não, é a variabilidade entre as seqüências de nucleotídeos do DNA ribossomal (rDNA). Os DNAs ribossomais de eucariotos apresentam-se repetidos sucessivamente em cadeia. Cada unidade repetida consiste de regiões codificadas denominadas 18S, 5.8S e 28S rRNAs, dois espaçadores internos transcritos (ITS1 e ITS2 – Internal Transcribed Spacers) que separam cada região codificada, e um espaçador externo transcrito (ETS – external transcribed spacers) junto ao final 5' do gene que codifica o rRNA 18S (Hillis *et al.*, 1991). As unidades repetidas são separadas por um espaçador intergênico (IGS – intergenic spacer). As unidades do rDNA têm seqüências de componentes que evoluem a diferentes taxas e podem ser usadas para estudos sistemáticos em diferentes níveis

taxonômicos. As regiões codificadas evoluem lentamente e são altamente conservadas entre diferentes espécies e gênero (Turbeville *et al.*, 1991). Esta pode ser usada para comparar organismos distintamente relacionados. As regiões espaçadoras (ITS e IGS) evoluem rapidamente e podem ser usadas para comparar espécies, subespécies ou populações intimamente relacionadas (Collins *et al.*, 1996; Paskewitz *et al.* 1993; Honda *et al.* 1998).

1.6 Objetivos

O presente trabalho teve como objetivos: a) selecionar métodos de preservação de espécimes do gênero *Atta* para extração de DNA para análises de PCR-RAPD; b) avaliar métodos de extração de DNA das espécies de *Atta* e otimizar os fatores utilizados nas análises PCR-RAPD; c) analisar por meio da técnica PCR-RAPD a variabilidade interespecífica em *Atta*; d) determinar o relacionamento genético das espécies do gênero *Atta*, por meio da análise do DNA ribossomal; e) identificar as espécies por meio de marcadores moleculares.

CAPÍTULO 2

COMPARAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO DE *ATTA* SPP. PARA EXTRAÇÃO DE DNA PARA ANÁLISES DE PCR-RAPD

2.1 Introdução

O desenvolvimento de técnicas em genética molecular, tal como PCR, tem revolucionado os estudos sobre biologia molecular em insetos. Sistemática é uma das áreas na qual importantes problemas filogenéticos têm sido resolvidos através da comparação de seqüências de nucleotídeos, freqüentemente obtidos de pequenas amostras. Tais estudos com insetos têm permitido examinar o relacionamento taxonômico em diferentes níveis (Post *et al.*, 1992; Haymer & McInnis, 1994).

Entretanto, um fator limitante em muitos trabalhos com marcadores moleculares é a dificuldade de se obter DNA da espécie viva e sim somente DNA genômico de espécies conservadas em diferentes agentes conservantes e condições de temperatura (Post *et al.*, 1993).

Diversos estudos têm sido realizados para se determinar o efeito de diferentes condições de armazenamento sobre a preservação do DNA (Goelz *et al.*, 1985; Smith *et al.*, 1987; Arctander, 1988; Bramwell & Burns, 1988), citados por Post *et al.* (1993), principalmente sobre amostras de tecidos de vertebrado, mas os resultados não são necessariamente aplicáveis para espécimes de insetos.

A maioria das técnicas utilizadas nas análises moleculares requerem DNA de boa qualidade, não fragmentado, assim, especial consideração deve ser dada à preservação das amostras. Muitas vezes, existe dificuldade para manter o inseto vivo por longo período, como em casos de importação, transporte a longas distâncias, ou de capacidade limitada de trabalho no laboratório. Surge, assim, a necessidade de armazenar os indivíduos de maneira adequada para evitar perdas significativas de quantidade e qualidade do DNA.

Vários autores (Post *et al.*, 1993; Reiss *et al.*, 1995; Dillon *et al.*, 1996; Koch *et al.*, 1998) têm demonstrado que um número de variáveis, tais como a concentração de reagentes, temperatura, espécie e idade dos espécimes, podem alterar a quantidade e/ou a qualidade do DNA extraído dos insetos, e como consequência o padrão de bandas obtidas em PCR-RAPD.

Diversos métodos de preservação de insetos têm sido usados, por períodos variáveis, para estudos que utilizam DNA. A maioria dos autores preservam as amostras em via seca a -70 ou -80°C, ou em etanol 70, 95 ou 100% à temperatura ambiente (Kambhampati *et al.*, 1992; Haymer & McInnis, 1993; Shoemaker *et al.*, 1994; Antolin *et al.*, 1996; Hidayat *et al.*, 1996; Honda *et al.*, 1998). Outros preservam em etanol 100% a -70°C, ou etanol 70% a -20°C (Phillips *et al.*, 1995; Dowdy & MacGaughey, 1996).

A preservação de insetos em etanol é uma prática padrão, mas a possibilidade do uso indevido desse preservativo como bebida alcoólica e as consequentes restrições ocasionalmente aplicadas para o seu transporte internacional, têm levado à investigação de outros meios para preservação (Post *et al.*, 1993).

Cockburn & Fritz (1995) avaliaram a preservação de insetos a 37°C com diferentes concentrações de álcool, tampão de lise de extração, CaCl₂, removedor de manchas de roupa contendo proteinase e em solução com 0,25 M EDTA, 2,5% SDS (w/v), 0,5 M Tris-HCl (pH 9,2) e concluíram que esse último foi muito mais efetivo que os demais tratamentos. Mesmo após um ano de preservação a 37°C esse tratamento permitiu extrair DNA >5kb. Ao contrário de etanol e isopropanol, a solução EDTA/SDS/Tris não é volátil, inflamável e tóxica. De acordo com os autores, tanto a preservação a seco quanto a preservação em álcool não são efetivas para períodos de armazenamento maiores que poucos dias, sem danos substanciais ao DNA. Entretanto, a preservação de espécimes, previamente secos, em isopropanol tem sido considerada tão efetiva quanto armazenados em freezer a -70°C.

Muitos autores utilizam o nitrogênio líquido para acondicionar os insetos durante suas coletas a campo, para posterior transferência a outro agente conservante em laboratório. No entanto, devido ao seu elevado custo e dificuldades de manuseio, outros meios têm sido avaliados para tal finalidade.

Para preservação de *Simulium damnosum* (Diptera: Simuliidae), a maior quantidade de DNA com o mínimo de degradação foi obtida quando as moscas foram preservadas em nitrogênio líquido, etanol a 4°C ou em sílica gel, após 372, 137 e 136 dias, respectivamente. Na maioria das amostras mantidas alfinetadas ou em formol salino 10%, não foi possível detectar DNA. Por outro lado, o DNA obtido de moscas mantidas em solução Carnoy (etanol – ácido acético, 3:1), metanol ou propanol apresentou-se muito degradado (Post *et al.*, 1993).

A preservação de tecidos da cabeça e da perna de *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) em etanol 100% a 4°C produziu significativamente mais DNA (cerca de 4000 ng) que o preservado em sílica gel (cerca de 2400 ng). A produção de DNA armazenado por zero (testemunha), duas, quatro, seis e oito semanas em etanol decresceu significativamente nas duas primeiras semanas de armazenamento. Entretanto, após esse período as alterações na quantidade de DNA extraído não foram significativas, permanecendo próximo de 4000 ng de DNA. A qualidade do DNA preservado em etanol 100% a 4°C não foi alterada após oito semanas estocado (Stevens & Wall, 1995).

A tentativa de se extrair DNA de espécimes secos ou preservados em metanol e propanol com baixas concentrações, provou ser insatisfatória (Post *et al.*, 1993). No entanto, DNA extraído de *Agrodiaetus* spp. (Lepidoptera), após sete anos conservado a seco, mostrou-se com qualidade satisfatória para análise PCR-RAPD (Hammond *et al.*, 1996).

Insetos que apresentam o exoesqueleto fortemente esclerotizado, como os coleópteros, podem apresentar diferentes problemas de preservação, quando comparados com outros que não apresentem estas características.

A conservação de *Amara glacialis* (Coleoptera: Carabidae) utilizando os seguintes meios de preservação: frasco de vidro contendo papel impregnado com acetato de etila; etanol 95%; fixador Carnoy; tampão de extração (100 mM Tris, pH 8,0, 50 mM EDTA, 160 mM sucrose pH 8,0 e 1,0% SDS), contendo insetos homogeneizados e inteiros; e imersão em nitrogênio líquido e posterior armazenamento a -80°C, por um período de até 144 dias, mostrou que acetato de etila e o fixador Carnoy não preservaram o DNA com alto peso molecular. Os

conservantes etanol, tampão de extração e nitrogênio líquido, mantiveram o DNA intacto, observando-se alguma degradação nos insetos mantidos inteiros no tampão de extração (Reiss *et al.*, 1995). Os autores concluem que a conservação em nitrogênio líquido a longo prazo é melhor do que em etanol, embora sua utilização em situação de campo seja a menos adequada. Como a curto prazo os dois conservantes são igualmente eficazes, o armazenamento em etanol é mais apropriado, uma vez que não requer equipamento especial, tal como recipientes para acondicionar nitrogênio líquido, além do que, não há necessidade de homogeneizar os insetos como no caso do armazenamento em tampão de extração.

Com exceção do nitrogênio líquido, na maioria dos conservantes, tais como etanol, metanol, soluções de paraformaldeído ou soluções salinas contendo agentes cátions-queladores (ex. EDTA), o grau de degradação do DNA varia grandemente, dependendo da procedência da amostra (Laulier *et al.*, 1995). O armazenamento de DNA em solução tamponada de tiocianato de guanidina, poderoso inibidor de nucleases, tem-se mostrado muito eficiente para sua preservação e também de RNA. A quantidade recuperada de DNA de *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) extraído e mantido em uma solução tamponada à base de 4M de tiocianato de guanidina, 2% N-lauroil-sarcosina, 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 50 mM EDTA e 0,01% 2-mercaptoetanol, à temperatura ambiente e por um período de até 41 dias, foi cerca de 450 ng, contra apenas 10-20 ng e 2,5-10 ng de DNA extraído de *D. melanogaster* mantida em etanol ou metanol, respectivamente. O DNA e RNA mantidos nesta solução pelo período de 41 dias à temperatura ambiente encontravam-se adequados para PCR.

Entre as variáveis que podem reduzir a quantidade e a qualidade do DNA, pode estar o agente utilizado para matar os espécimes. Insetos mortos com vapor de acetato de etila (um produto tradicionalmente utilizado por muitos entomologistas para este fim) e posteriormente mantidos secos ao ar, geralmente possibilitam a extração de pequena quantidade de DNA e de qualidade insatisfatória para as análises PCR. O extensivo uso do acetato de etila para matar insetos pode ser uma das razões pelas quais estudos com DNA de insetos de museu têm falhado ou produzido resultados inconsistentes (Dillon *et al.*, 1996).

Embora vários trabalhos sobre armazenamento de insetos, visando preservar o DNA para análises moleculares tenham sido desenvolvidos com várias espécies, nenhuma pesquisa foi desenvolvida com esta finalidade para formigas. Apenas Shoemaker *et al.* (1994), trabalhando com DNA de formiga lava-pé, *Solenopsis* spp. (Hymenoptera: Formicidae) que, em condições de campo armazenou os exemplares em nitrogênio líquido e, posteriormente, em laboratório, armazenou a -70°C, obteve excelentes resultados em suas análises.

Considerando que diversos fatores podem afetar a qualidade e quantidade do DNA, dentre esses a espécie a ser conservada, e que na maioria das vezes a extrapolação de resultados não é aplicável, o objetivo deste trabalho foi selecionar métodos de preservação de *Atta* spp. que permitissem a extração de DNA em quantidade e qualidade satisfatórias para ser utilizado em análises PCR-RAPD.

2.2 Material e Métodos

Foram comparados os seguintes meios de preservação (tratamentos) à temperatura ambiente (TA) e controlada: (1) armazenamento a -70°C ; (2) armazenamento em etanol 95% a -20°C ; (3) armazenamento em etanol 95% a 4°C ; (4) armazenamento em etanol 95% à TA; (5) armazenamento em sílica gel à TA; (6) armazenamento em solução tampão à TA (pH 9,2) de extração de DNA, contendo 0,25 M EDTA, 2,5% (w/v) SDS, 0,5 M Tris-HCl, e (7) formiga fresca (o DNA extraído de formiga fresca foi usado como controle). As avaliações ocorreram aos 90, 210 e 360 dias após o armazenamento.

Operárias maiores (soldados) de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908, coletadas de um único saueiro em Assis-SP, em 06/09/97, foram acondicionadas ainda vivas em frasco de vidro contendo etanol 95% e trazidas ao laboratório. Após 48 horas em etanol, 30 indivíduos para cada tratamento (10 para cada época de avaliação) foram colocados para secar em dessecador a vácuo, durante 30 min. Em seguida, foram colocados em frascos de vidros de 50 ml, de acordo com o tratamento e a época, contendo os meios conservantes, com exceção dos tratamentos (1) e (5) que foram acondicionados em tubos de microcentrífuga (1,5 ml) e frasco de vidro de 200 ml, respectivamente. No tratamento (5), entre a camada de sílica gel e as formigas, colocou-se um disco de papel de filtro de igual diâmetro do frasco, fechando-o com tampa contendo anel de vedação de borracha e parafilme.

Para análise da quantidade e da qualidade do DNA, para evitar a contaminação com DNA de outros organismos, extraiu-se individualmente, o DNA apenas da cabeça; quatro por época de avaliação/tratamento.

A extração do DNA foi de acordo com o protocolo de Cheung *et al.* (1993) – modificado, conforme descrito a seguir. Antes da extração, as cabeças foram destacadas e colocadas para secar em dissecador a vácuo durante 30 min e homogeneizadas individualmente por meio de homogeneizador elétrico a 1.800 rpm (Glas-Col Mod. 099C), com pistilo de plástico descartável, em tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, contendo 200 µl do tampão de extração [200 mM Tris-HCl (pH 8,0), 2 M NaCl e 70 mM EDTA]. Com relação ao protocolo original deixou-se de utilizar o metabissulfito de sódio. Em seguida, adicionaram-se 50 µl de sarcosyl 5%, homogeneizando-se novamente. Após 30 min de incubação a 65°C, o material foi centrifugado por 15 min a 10000 rpm e o sobrenadante transferido para um novo tubo. O DNA foi precipitado com a adição de 110 µl de acetato de amônia e 250 µl de isopropanol gelado, deixando-se “overnight” na geladeira. Após centrifugação por 15 min a 10000 rpm, descartou-se o sobrenadante e o “pellet” foi lavado duas vezes com 300 µl de etanol 70% gelado, deixando-o secar à temperatura ambiente. O DNA foi ressuspendido em 50 µl de TE buffer (Tris-EDTA, pH 8,0), contendo RNase (10 µg/ml), e armazenado a -20°C.

A quantidade de DNA de cada extração foi determinada por fluorescência, com o corante Hoechst 33258, utilizando-se o fluorímetro DyNA Quant 200 (Hoefer Instruments).

A qualidade do DNA foi determinada através de eletroforese em gel de agarose 0,8%, utilizando-se 1000 ng de DNA para cada amostra. A corrida foi em 0,5 X TBE (Tris-borato-EDTA) a 5 V/cm, corando-se o gel em solução de brometo de etídio 0,05 %. O gel foi fotografado sob luz UV com filme Polaroid 667, através de câmera Polaroid MP 4. As fotos foram analisadas usando densitômetro (Bio-Rad-modelo 620) e, após o ajuste para a reflectância do “background” do gel, a integral da densidade de cada varredura foi calculada para DNA acima de 9,4 kb.

A análise estatística dos dados foi feita através do modelo inteiramente casualizado em parcelas subdivididas com quatro repetições, onde os tratamentos estão na parcela e as épocas de avaliação nas subparcelas. Para avaliar a reproducibilidade do perfil de bandas obtido com DNA extraído nas diferentes épocas de armazenamento de cada tratamento, foram realizadas reações de PCR-RAPD utilizando 25 µl de solução, contendo 100 µM de cada dNTP, 0,2 µM de primer, 1,0 U de *Taq* polimerase, 0,05% BSA e tampão (3,0 mM Mg²⁺, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl - pH 9,0). Foram utilizados os primers OPB-07 e OPB-01 (Operon Technol.), previamente selecionados, respectivamente para as avaliações do DNA extraído aos 210 e 360 dias após o armazenamento. Os produtos das reações foram observados em gel de agarose 1,5%, a 5 V/cm, corado em brometo de etídio a 0,05% e fotografado com filme Polaroid.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Quantidade de DNA

As quantidades de DNA extraídas de acordo com os tratamentos (métodos de preservação) e dentro de cada época avaliada podem ser observadas na Tabela 2.1. Embora os valores dos Quadrados Médios ($F = 28,15$, $P > 0,05$) (Tabela 2.2) não tenham sido significativos para Épocas e para a interação Tratamento X Épocas de avaliação, a preservação em etanol 95% à TA propiciou a extração das menores quantidades de DNA nas três épocas avaliadas. Essa tendência é confirmada através do teste de comparação de médias dos tratamentos, onde a preservação em etanol 95% à TA diferiu significativamente dos demais métodos de preservação, apresentando um decréscimo muito grande na quantidade de DNA produzido, principalmente aos 360 dias (Tabela 2.1).

A redução observada na quantidade de DNA extraído aos 210 dias desse tratamento, comparado com a quantidade obtida na preservação em etanol 95% a 4°C, é semelhante à redução obtida por Post *et al.* (1993) com DNA de fêmeas de *S. damnosum* após 120 dias de preservação em etanol 80% à temperatura ambiente, comparado com a quantidade obtida na preservação em etanol 100% a 4°C, pelo mesmo período. Por outro lado, Koch *et al.* (1998) obtiveram baixa quantidade de DNA de alto peso molecular extraído da cabeça de *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae) preservada em etanol 100% à temperatura ambiente, por um período de aproximadamente quatro anos, atribuindo o resultado ao pequeno tamanho da cabeça desta espécie. No entanto, Reiss

Tabela 2.1 Quantidade de DNA (μg) extraído da cabeça de *Atta. sexdens rubropilosa* nas diferentes épocas e tratamentos avaliados avaliados (média de 4 repetições).

Tratamentos	Épocas de avaliação (dias)			Média
	90	210	360	
1 -70°C	3,94	4,24	3,56	3,91ab
2 Etanol 95% a -20°C	3,93	5,03	3,61	4,08ab
3 Etanol 95% a -4°C	3,10	3,39	4,05	3,53 b
4 Etanol 95% à TA	2,04	2,10	0,41	1,52 c
5 Sílica gel à TA	4,80	4,40	4,81	4,67a
6 Tampão à TA	4,26	3,66	3,89	3,94ab
7 Formiga fresca	4,42	3,88	4,38	4,23ab
Média	3,77	3,81	3,53	

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) para os tratamentos.

Tabela 2.2 Quantidade de DNA (μg) extraído da cabeça de *Atta sexdens rubropilosa* nas diferentes épocas e tratamentos avaliados (média de 4 repetições).

F. V.	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	6	30365,21	5060,87	28,15*
Resíduo (a)	21	3775,26	179,77	
Épocas	2	544,14	272,07	1,05 ns
Trat ^{os} X Épocas	12	5998,57	499,88	1,93 ns
Resíduo (b)	42	10607,65	258,72	
Total	83	50754,65		

et al. (1995), armazenando *A. glacialis* em etanol 95% à temperatura ambiente, obtiveram um decréscimo significativo na quantidade de DNA após 73 dias, com perda cem vezes maior aos 144 dias. Por estes dados observa-se que as quantidades de DNA obtidas de insetos preservados por esta técnica, podem variar de uma espécie para outra e também em função do tempo de armazenamento. Embora, de um modo geral, o período de conservação do DNA em etanol 95% à temperatura ambiente seja relativamente curto, no caso específico de *Atta* constatou-se um decréscimo significativo na sua quantidade somente após 210 dias. O efeito da temperatura na preservação em etanol sobre a quantidade de DNA pode ser visto nos tratamentos 2 (etanol 95% a -20°C) e 3 (etanol 95% a 4°C). Embora esses métodos de preservação não tenham diferido estatisticamente entre si e dos demais métodos, diferiram da preservação em etanol 95% à TA, produzindo maiores quantidades de DNA, sendo que a -20°C a produção de DNA foi melhor do que a 4°C (Tabela 2.1). Os resultados obtidos com a preservação em etanol 95% a 4°C são corroborados pelos dados alcançados por Post *et al.* (1995) ao obter um pequeno decréscimo na quantidade de DNA de *S. vittatum* preservado nessas condições, após 371 dias. Por outro lado, obteve uma perda significativa na quantidade de DNA quando preservou os insetos em etanol 95% a -20°C, por igual período de tempo, o que não foi observado neste trabalho. Nossos dados mostram que no caso da preservação em etanol, a temperatura de armazenamento é mais importante do que a variação da concentração, dentro da faixa de 80 a 100%. A preservação em sílica gel à TA, na média das três épocas avaliadas, foi o método de preservação que propiciou a extração das maiores quantidades de DNA. Altas quantidades de DNA também

foram extraídas por Post *et al.* (1995), quando utilizou este método de preservação. Esses resultados, provavelmente, devem-se ao fato de o material encontrar-se bastante desidratado, o que permite melhor homogeneização dos tecidos.

Os resultados obtidos demonstraram que todos os meios utilizados para a preservação de *Atta* spp. permitiram a extração de DNA em quantidades satisfatórias para as análises de sua qualidade, até aos 360 dias de armazenamento, com exceção apenas da preservação em etanol 95% à TA. Espécimes do gênero *Atta* destinados a estudos com DNA, poderiam ser preservados em qualquer um dos meios testados, por um período de até sete meses, dependendo apenas de sua disponibilidade e condições laboratoriais. Já para a preservação por até 12 meses, com exceção de etanol 95% à TA, todos os demais métodos avaliados poderiam ser empregados. Os dados obtidos neste trabalho mostram que existem meios que permitem a preservação de *Atta*, e que são alternativos aos meios de preservação a baixas temperaturas (-70, -20°C), tais como em etanol a 4°C, sílica gel à TA e tampão à TA, para períodos de armazenamento de até um ano, dispensando o uso de refrigeradores de alto custo e facilitando o transporte.

2.3.2 Qualidade do DNA

A qualidade do DNA obtido em cada método de preservação, dentro das épocas avaliadas, pode ser observada na Tabela 2.3, considerando apenas o DNA de peso molecular acima de 9,4 kb como indicador de boa qualidade. A

Tabela 2.3 Efeito dos diferentes métodos de preservação sobre a qualidade de DNA (porcentagem de DNA $\geq 9,4$ kb), extraído da cabeça de soldado de *Atta sexdens rubropilosa* obtido nas diferentes épocas.

Tratamentos	Épocas avaliadas (dias)		
	90	210	360
1 -70°C	0,82 a ¹ (68,10) ²	0,69 a (48,68)	0,57 ab (32,50)
2 Etanol 95%/-20°C	0,81 a (66,20)	0,62 a (39,23)	0,55 ab (30,68)
3 Etanol 95%/4°C	0,78 a (60,85)	0,64 a (41,18)	0,56 ab (32,08)
4 Etanol 95%/TA	0,77 a (59,13)	0,71 a (51,15)	0,00 c (0,00)
5 Sílica gel/TA	0,71 a (49,98)	0,58 a (33,98)	0,47 b (23,05)
6 Tampão/TA	0,73 a (53,53)	0,62 a (38,70)	0,50 b (25,88)
7 Formiga fresca	0,81 a (65,05)	0,69 a (48,53)	0,70 a (50,00)

¹Dados transformados em $\sqrt{x/100}$. Valores seguidos pela mesma letra na vertical não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

²Porcentagem de DNA acima de 9,4 kb

análise de variância destes dados evidenciou efeito significativo da interação tratamentos versus épocas ($F= 10,67$; $P<0,05$) (Tabela 2.4). Aos 90 dias (Fig. 2.1) e aos 210 dias após o armazenamento (Fig. 2.2), todos os métodos de preservação produziram igual percentagem de DNA com boa qualidade, quando comparados ao controle (formiga fresca). Embora os tratamentos não tenham diferido estatisticamente entre si aos 90 e 210 dias, observa-se que a degradação do DNA armazenado em sílica gel e em tampão, mantido à temperatura ambiente, foi ligeiramente maior que nos outros métodos. Aos 210 dias, o DNA extraído de todos os tratamentos apresentou queda em sua qualidade em relação aos 90 dias, embora ainda com quantidades satisfatórias de DNA de boa qualidade. Resultados semelhantes obtiveram Post *et al.* (1995) com mosquitos armazenados em etanol 80% a -20°C por 136 dias. Aos 360 dias após o armazenamento (Fig. 2.2), o efeito do tempo de preservação sobre os tratamentos ficou bastante evidenciado. As amostras preservadas a -70°C , em etanol 95% a -20°C e em etanol 95% a 4°C , não diferiram do controle (formiga fresca), enquanto que as preservadas em sílica gel à TA e em tampão à TA, não diferiram dos outros tratamentos, mas diferiram da testemunha. A preservação em etanol 95% à TA diferiu estatisticamente dos demais tratamentos, com 100% do DNA apresentando peso molecular abaixo de 9,4 kb (Fig. 2.2; coluna 4). Após 360 dias de armazenamento, observa-se que houve degradação do DNA em todos os métodos de preservação quando comparados com o DNA extraído de formiga fresca.

A reproducibilidade da reação de PCR-RAPD utilizando DNA das amostras preservadas pelos diferentes métodos, após os períodos de

Tabela 2.4 Análise de variância (ANOVA) - $P < 0,05$ - para a qualidade do DNA ($\geq 9,4$ kb) extraído da cabeça de soldado de *Atta sexdens rubropilosa*, em função dos tratamentos e épocas de armazenamento.

F. V.	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	6	0,45184528	0,07530755	30,91
Resíduo (a)	21	0,05116500	0,00243643	
Épocas	2	1,25292503	0,62646252	94,74*
Tratamentos X Épocas	12	0,84687139	0,07057262	10,67*
Resíduo (b)	42	0,27773639	0,00661277	
Total	83	2,88054309		

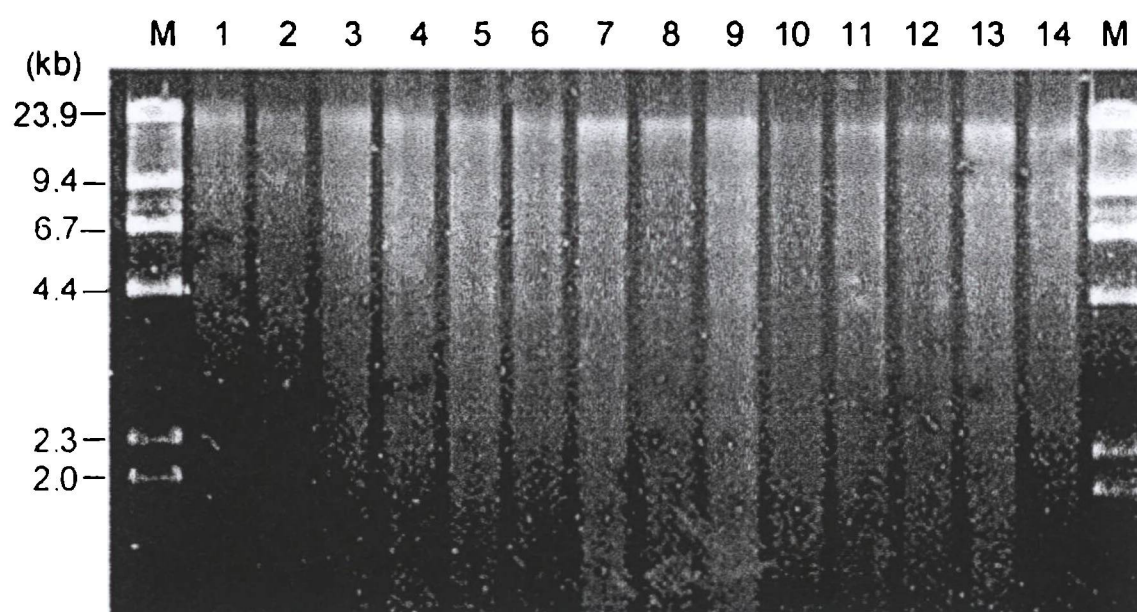


Figura 2.1 Condições do DNA após 90 dias de armazenamento. (M) marcador λ DNA/*Hind* III; (1-2) -70°C; (3-4) etanol 95% a -20°C; (5-6) etanol 95% a 4°C; (7-8) etanol 95% à TA; (9-10) sílica gel à TA; (11-12) solução tampão à TA; (13-14) formiga fresca.

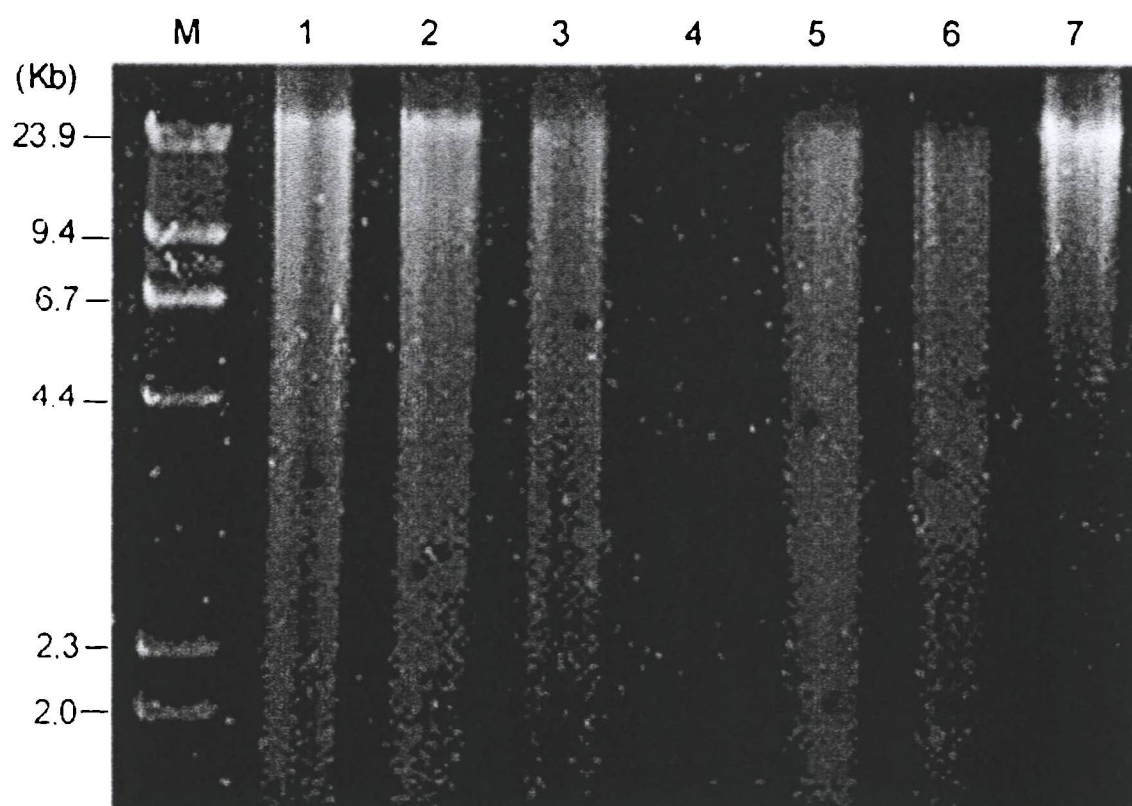


Figura 2.2 Condições do DNA após 360 dias de armazenamento. (M) marcador λ DNA/*Hind* III; (1) -70°C ; (2) etanol 95% a -20°C ; (3) etanol 95% a 4°C ; (4) etanol 95% à TA; (5) sílica gel à TA; (6) solução tampão à TA; (7) formiga fresca.

armazenamento, pode ser vista nas Figs. 2.3 e 2.4. Nota-se que até 210 dias, o DNA obtido em todos os métodos de preservação apresentou padrão de bandas semelhante quando amplificado através da técnica PCR-RAPD (Fig. 2.3), demonstrando que todos os tratamentos mantiveram o DNA em boas condições para amplificação. No entanto, aos 360 dias de armazenamento o padrão de bandas apresentado pelo DNA extraído do material preservado em etanol à TA, mostrou-se diferente do padrão obtido com os outros métodos de preservação. Na Fig. 2.4, colunas 7 e 8, observa-se a ausência das bandas 350, 430, 780 e 2200 pb, caracterizando que o DNA obtido após armazenamento em etanol 95% à TA, após 360 dias, não é mais adequado para PCR-RAPD. A degradação do DNA nessas condições de preservação pode ser devido à contínua atividade de nucleases, mesmo em álcool, que poderiam ser inibidas com a adição de EDTA (Dessauer *et al.*, 1990).

2.4 Conclusões

Em função dos resultados obtidos pode-se afirmar que o armazenamento de espécimes de *Atta*, por um período de até sete meses, visando posteriores análises de PCR-RAPD, poderá ser feito em qualquer um dos sistemas avaliados. Espécimes armazenados em etanol 95% à TA, por períodos superiores a 210 dias, apresentam DNA de baixa qualidade para análises PCR-RAPD, podendo levar a resultados não confiáveis. Para um período de até 12 meses, com exceção da preservação em etanol 95% à TA, o armazenamento poderia ser preferencialmente a -70°C, em etanol 95% a -20°C ou em etanol 95% a 4°C. Caso

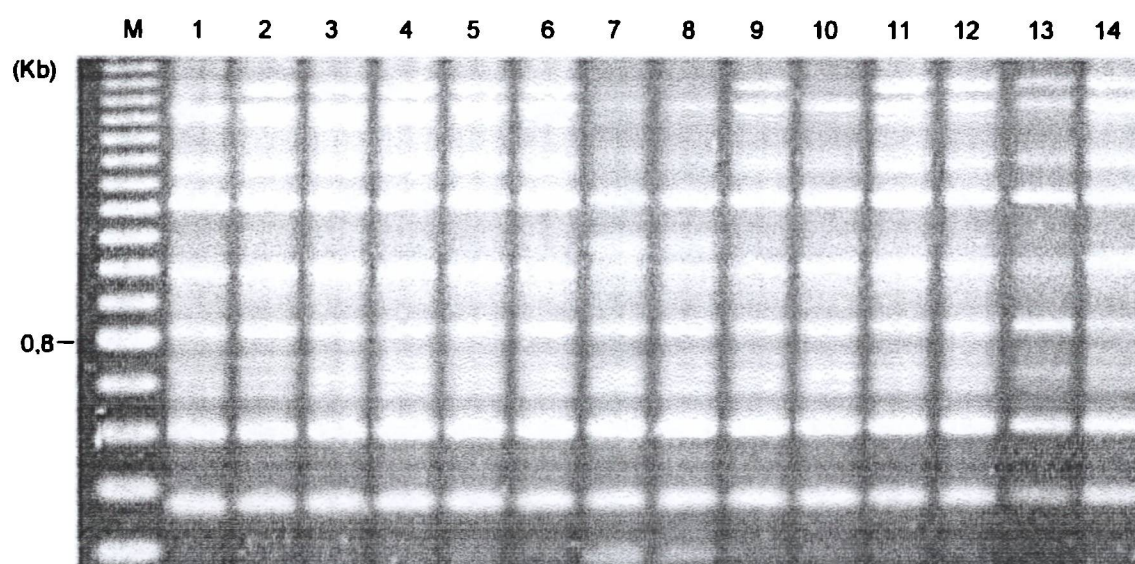


Figura 2.3 Reproducibilidade do PCR-RAPD com DNA extraído aos 210 dias (primer OPB-07). (M) marcador ladder 100; (1-2) -70°C; (3-4) etanol 95% a -20°C; (5-6) etanol 95% a 4°C; (7-8) etanol 95% à TA; (9-10) sílica gel à TA; (11-12) solução tampão à TA; (13-14) formiga fresca.

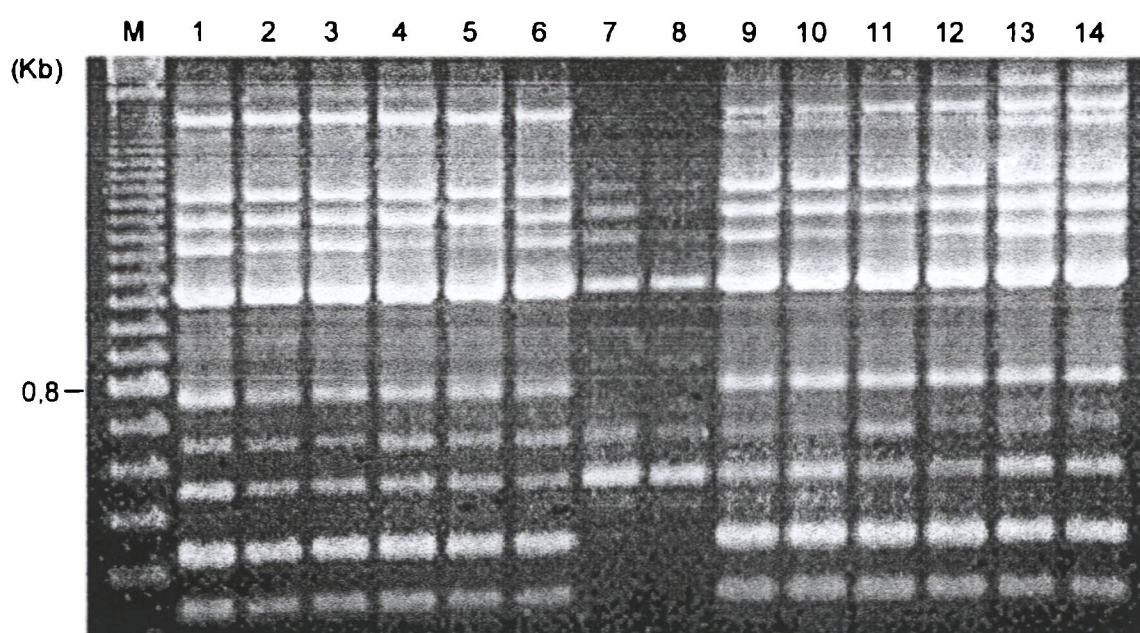


Figura 2.4. Reproducibilidade do PCR-RAPD com DNA extraído aos 360 dias (primer OPB-01). (M) marcador 100pb; (1-2) -70°C; (3-4) etanol 95% a -20°C; (5-6) etanol 95% a 4°C; (7-8) etanol 95% à TA; (9-10) sílica gel à TA; (11-12) solução tampão à TA; (13-14) formiga fresca.

a preservação a baixas temperaturas não seja possível, ou quando o transporte do material em etanol não for permitido por ser um produto inflamável, a utilização de sílica gel ou da solução tampão são alternativas eficientes, uma vez que mantêm o DNA com qualidade satisfatória para as análises de PCR-RAPD, além de não conterem substâncias de riscos.

CAPÍTULO 3

OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES PARA ANÁLISES PCR-RAPD EM *ATTA* SPP.

3.1 Introdução

Recentemente Williams *et al.* (1990) desenvolveram uma nova técnica para detectar polimorfismo genético denominada PCR-RAPD (polimorfismo de DNA amplificado ao acaso), baseada na amplificação do DNA com um simples primer de 10 nucleotídeos, usando o método de PCR (reação da polimerase em cadeia). Para o uso dessa técnica nenhum conhecimento prévio da seqüência do DNA e nem sondas de DNA específicas são necessários (Wolf *et al.*, 1993). Os fragmentos de DNA produzidos servem para fazer discriminações entre indivíduos, raças ou espécies. Portanto, PCR-RAPD pode ser empregado em diversos estudos que se utilizam de marcadores genéticos (Hardrys *et al.*, 1992).

Entretanto, devido a um complexo de interações entre os componentes da reação de PCR e às diferentes finalidades para as quais essa técnica é utilizada, é muito improvável que um conjunto de condições de amplificação possa ser adequado para todas as situações, havendo, portanto, a necessidade de se estabelecer *a priori* as condições ótimas de reação para que os fragmentos de DNA obtidos possam ser reproduzíveis. Assim, a otimização dos componentes e de outros fatores da reação, para cada técnica molecular, é de fundamental importância para a reprodução dos resultados.

Diversos trabalhos têm demonstrado o efeito das concentrações de magnésio, cloreto de potássio, enzima *Taq* polimerase, primer, DNA, deoxinucleotídeos (dNTPs) e também dos parâmetros: termociclador, programas de temperaturas (desnaturação, anelamento e extensão), número de ciclos e método de extração do DNA sobre a eficiência de amplificação de fragmentos de DNA de plantas, bactérias, fungos e nematóides em PCR-RAPD (Levi *et al.*, 1993; Meunier & Grimont, 1993; Wolff *et al.*, 1993; He *et al.*, 1994; Jutras *et al.*, 1995; Liu & Berry, 1995; Boleda *et al.*, 1996; Staub, 1996).

Para investigar a influência de diversos fatores sobre uma reação, basicamente dois tipos de métodos têm sido utilizados. O mais tradicional é aquele em que apenas um fator é testado a cada experimento, sendo os demais fatores fixados e trocados em sucessivos experimentos. O outro método, mais efetivo e mais eficiente, permite modificar diversos fatores a cada vez, possibilitando detectar a interação entre vários parâmetros. Nesse método utilizam-se os delineamentos Fatorial Fracionado (DFF) e o Central Composto (DCC). Mesmo que o número de variáveis seja alto, pode-se obter resposta individual para cada fator, com um limitado número de experimentos. Esses delineamentos possibilitam de uma maneira fácil, rápida e econômica a otimização dos fatores para cada reação de PCR, como observado por Boleda *et al.* (1996).

Este trabalho teve por objetivo determinar as condições ótimas para a utilização da técnica PCR-RAPD em análises taxonômicas das espécies do gênero *Atta*, através da avaliação de alguns dos parâmetros com maior influência na eficiência da reação.

3.2 Material e Métodos

Como fonte de DNA, para evitar possível contaminação das amostras com DNA de ovos ou larvas de parasitóides, utilizou-se somente a cabeça de operária máxima (soldado) de *A. sexdens rubropilosa*, coletadas em um único saquinho, no município de Assis-SP. As formigas foram conservadas em etanol 95% à temperatura ambiente durante 15 dias, sendo as cabeças destacadas e secas a vácuo durante 20 min, antes da extração do DNA. Para cada método de extração dez cabeças foram homogeneizadas individualmente com pistilo plástico descartável usando-se homogeneizador elétrico a 1800 rpm, em tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, contendo o tampão de extração de cada método.

3.2.1 Avaliação de Métodos de Extração de DNA

Foram comparados quatro métodos de extração de DNA denominados ME₁, ME₂, ME₃ e ME₄, conforme abaixo descritos:

3.2.1.1 Método ME₁

Trata-se de um protocolo similar ao descrito por Doyle & Doyle (1990), com algumas modificações. Resumidamente, as cabeças foram homogeneizadas em tubos de microcentrífuga de 1,5 ml, contendo 300 µl do tampão de extração [100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 2% CTAB, 1,4 M NaCl e 20 mM EDTA]. Após 30 min de incubação a 65°C, o material foi centrifugado por 10 min (10000 g) e o sobrenadante transferido para um novo tubo, adicionando-se igual volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Após suave homogeneização e centrifugação

por 2 min a 10000 g, a fase superior foi transferida para um novo tubo e adicionado 2/3 do volume de isopropanol gelado, permanecendo por 30 min em gelo, seguido de nova centrifugação por 15 min (10000 g). Descartou-se o sobrenadante e o "pellet" foi lavado com 1 ml de etanol 70% gelado e deixado secar à temperatura ambiente. O DNA foi ressuspendido em 50 µl de TE buffer e armazenado a -20°C.

3.2.1.2 Método ME₂

Foi utilizado um protocolo similar ao descrito por Cheung *et al.* (1993), com pequenas modificações. As cabeças foram trituradas em tubos de microcentrífuga de 1,5 ml, contendo 200 µl do tampão de extração [200 mM Tris-HCl (pH 8,0) 2 M NaCl e 70 mM EDTA]. Em relação ao protocolo original deixou-se de utilizar o metabissulfito de sódio. Em seguida, adicionaram-se 50 µl de sarcosyl 5% e a solução foi homogeneizada novamente. Após 30 min de incubação a 65°C, o material foi centrifugado durante 15 min (10000 g) e o sobrenadante transferido para um novo tubo. O DNA foi precipitado com a adição de 110 µl de acetato de amônia e 250 µl de isopropanol gelado e mantido em geladeira durante a noite. Após centrifugação durante 15 min a 10000 g, o "pellet" foi lavado duas vezes com 300 µl de etanol 70% gelado e deixado secar à temperatura ambiente. O DNA foi ressuspendido em 50 µl de TE buffer com RNase (10 µg/ml) e armazenado a -20°C.

3.2.1.3 Método ME₃

O protocolo utilizado foi descrito por Walsh *et al.* (1991). As cabeças dos insetos foram homogeneizadas em tubos de microcentrífuga de 1,5 ml, contendo 700 µl de solução de Chelex 5% (Bio-Rad) e incubadas inicialmente a 56°C durante 30 min e posteriormente a 100°C durante 5 min. Em seguida o material foi centrifugado durante 30 s (10000 g) e armazenado a -20°C.

3.2.1.4 Método ME₄

Este método consiste de uma combinação dos protocolos de Yu & Pauls (1993) e Doyle & Doyle (1990). As cabeças foram homogeneizadas em tubos de microcentrífuga de 1,5 ml, contendo 300 µl do tampão de extração [200 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,5% SDS, 250 mM NaCl, 50 mM EDTA e 100 µg/ml Proteinase K. Após 30 min de incubação a 65°C, o material foi centrifugado durante 10 min a 10000 g e o sobrenadante transferido para um novo tubo, adicionando-se igual volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Após suave homogeneização e centrifugação por 2 min (10000 g) para separação das fases, a fase superior foi transferida para um novo tubo e adicionado 2/3 do volume de isopropanol gelado, permanecendo durante 30 min em gelo, seguido de nova centrifugação durante 15 min. Descartou-se o sobrenadante e o "pellet" foi lavado com 1 ml de etanol 70% gelado e deixado secar à temperatura ambiente. O DNA foi ressuspendido em 50 µl de TE buffer e armazenado a -20°C.

A concentração de DNA obtida em cada amostra dos diferentes métodos de extração foi determinada por fluorimetria (DyNA Quant 200, Hoefer Instruments), com o corante Hoechst 33258.

A qualidade do DNA foi determinada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%. A corrida foi realizada em 0,5 X TBE (Tris-borato-EDTA) a 5 V/cm, corando-se o gel em solução de brometo de etídio 0,5 µg/ml. O gel foi fotografado sob luz UV com filme Polaroid 667, através de câmera Polaroid MP 4 (Polaroid MP 4⁺ Instant Camera System).

As fotos foram analisadas usando-se densitômetro (Bio-Rad modelo 620), e após o ajuste para a fluorescência do "background" do gel, a integral da varredura foi calculada para três intervalos de peso molecular: $\geq 9,4$ kb, $< 9,4$ kb $> 2,3$ kb e $\leq 2,3$ kb. O DNA de diferentes amostras, extraído por meio dos melhores métodos, foi utilizado em PCR-RAPD com o primer OPA-03 (Operon Technologies, Alameda, CA). As reações foram conduzidas em um volume de 25 µl, contendo 40 ng de DNA, 100 µM de cada dNTP, 0,2 µM de primer, 1,0 U de *Taq* polimerase, 2 mM MgCl₂ e 1 X tampão. As amplificações foram realizadas no termociclador PTC-100TM (MJ Research, Inc., Watertown, MA), programado para um ciclo de 2 min a 94°C, 1 min a 36°C e 2 min a 72°C, seguido de 40 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 36°C e 2 min a 72° C, com extensão final de 5 min a 72°C. Os produtos das amplificações do DNA foi analisado em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio a 0,5 µg/ml e fotografado sob luz UV com filme Polaroid 667. Os dois melhores métodos de extração foram selecionados para os experimentos de

determinação dos fatores de maiores significâncias para a eficiência da reação de PCR-RAPD.

3.2.2 Determinação de Fatores com Maiores Efeitos em PCR-RAPD

Para se determinar quais os fatores com maior influência na reação de PCR-RAPD utilizou-se o Delineamento Fatorial Fracionado (DFF) (Tabela 3.1) de acordo com Boleda *et al.* (1996), avaliando-se as seguintes variáveis em dois níveis, representados pelos sinais (-) e (+): 1) método de extração de DNA [ME₂ (-) e ME₄ (+)]; 2) quantidade de DNA [25 ng (-) e 50 ng (+)]; 3) concentração de MgCl₂ [1,5 (-) e 3,0 mM (+)]; 4) concentração de albumina de soro bovino (BSA) [0,05 (-) e 0,1% (+)]; e 5) programas de amplificação [P₁ (+): 2 min a 94°C, seguido de 40 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 36°C e 2 min a 72°C, com extensão final de 5 min a 72; P₂ (-): 3 min a 94°C, 3 min a 35°C, 2 min a 72°C, seguidos de 40 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 36°C e 2 min a 72°C, com extensão final de 5 min a 72°C (Tabela 3.2). Nas reações de PCR-RAPD foram utilizados 25 µl de solução, contendo 100 µM de cada dNTP, 0,2 µM de primer, 1,0 U de *Taq* polimerase e tampão [10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 50 mM KCl]. Foram utilizados os primers AW, AT, A2, C18, A04 e B7 (Operon Tech.). Os demais fatores da reação variaram conforme mostrado na Tabela 3.3. Os produtos das reações foram observados em gel de agarose a 1,5%, corado em brometo de etídio a 0,5 µg/ml e fotografado com filme Polaroid. A intensidade das bandas claramente visíveis e reproduzíveis foi avaliada através de nota visual cuja escala variou de 0 a 5, sendo que o total acumulado das notas de cada experimento, obtido com cada um dos primers, foi

Tabela 3.1 Fatores e níveis avaliados através do Delineamento Fatorial Fracionado (DFF).

Fator	Nível (-)	Nível (+)
Método de extração de DNA	ME ₂	ME ₄
Concentração de DNA	25,0 ng	50,0 ng
Concentração de MgCl ₂	1,5 mM	3,0 mM
Concentração de BSA	0,05%	0,1%
Programa de amplificação	P ₂	P ₁

(*) Os sinais (-) e (+) indicam apenas os níveis utilizados para cada fator.

}

Tabela 3.2 Programas de amplificação utilizados para seleção de fatores com maiores efeitos em PCR-RAPD.

(P ₁)			(P ₂)		
Passo	Tempo (min)	T°C	Passo	Tempo (min)	T°C
1	2	94	1	3	94
seguido de 40 ciclos de:			2	3	35
			3	2	72
2	1	94	seguido de 40 ciclos de:		
3	1	36	4	1	94
4	2	72	5	1	36
5	5	72	6	2	72
			7	5	72

Tabela 3.3 Matriz do Delineamento Fatorial Fracionado (DFF) $2^{(5-2)}$.

Experimentos	Fatores				
	Métodos de extração	DNA (ng)	MgCl ₂ (mM)	BSA (%)	Programas
1	- (ME ₂)	- (25)	- (1,5)	+ (0,1)	+ (P ₁)
2	- (ME ₂)	- (25)	+ (3,0)	- (0,05)	- (P ₂)
3	- (ME ₂)	+ (50)	- (1,5)	- (0,05)	- (P ₂)
4	- (ME ₂)	+ (50)	+ (3,0)	+ (0,1)	+ (P ₁)
5	+ (ME ₄)	- (25)	- (1,5)	- (0,05)	+ (P ₁)
6	+ (ME ₄)	- (25)	+ (3,0)	+ (0,1)	- (P ₂)
7	+ (ME ₄)	+ (50)	- (1,5)	+ (0,1)	- (P ₂)
8	+ (ME ₄)	+ (50)	+ (3,0)	- (0,05)	+ (P ₁)

utilizado para as análises estatísticas realizadas através do programa Statgraphics 5.0 (Graphic Software System, Rockville, MD, USA).

3.2.3 Otimização dos Fatores

Para otimização dos dois fatores de maior impacto positivo nas reações de PCR-RAPD, utilizou-se o Delineamento Central Composto (DCC), de acordo com Boleda *et al.* (1996), conforme matriz apresentada na Tabela 3.4. Nas reações de PCR-RAPD foram utilizados 25 µl de solução, contendo 100 µM de cada dNTP, 0,2 µM do primer OPA-04 (Operon Tech.), 1,0 U de *Taq* polimerase, BSA 0,05% e tampão [10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 50 mM KCl]. As concentrações de MgCl₂ e as quantidades de DNA foram as estabelecidas na Tabela 3.4. Os produtos das reações foram observados em gel de agarose a 1,5%, corado em brometo de etídio a 0,5 µg/ml e fotografado com filme Polaroid. A intensidade das bandas foi determinada através de densitometria (Bio-Rad mod. 620), sendo a somatória dos valores da reflectância de todas as bandas de cada experimento multiplicada por 10⁻¹ e utilizado para as análises estatísticas realizadas através do programa Statgraphics 5.0 (Graphic Software System, Rockville, MD, USA).

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Extração de DNA

As quantidades de DNA/cabeça extraídas de *A. sexdens rufopilosa* em cada método são mostradas na Tabela 3.5.

Tabela 3.4 Matriz do Delineamento Central Composto (DCC).

Experimentos	Fatores			
	Código dos níveis		Níveis reais	
	DNA (ng)	MgCl ₂ (mM)	DNA (ng)	MgCl ₂ (mM)
1	- 1	- 1	15	2
2	+ 1	- 1	35	2
3	- 1	+ 1	15	4
4	+ 1	+ 1	35	4
5	- 1,41	0	11	3
6	+ 1,41	0	39	3
7	0	- 1,41	25	1,6
8	0	+ 1,41	25	4,4
9	0	0	25	3
10	0	0	25	3
11	0	0	25	3
12	0	0	25	3

Tabela 3.5 Quantidade de DNA (μg) extraído/cabeça de operária máxima de *Atta sexdens rubropilosa*, por diferentes métodos.

Amostras	Métodos de extração (ME)			
	ME ₁	ME ₂	ME ₃	ME ₄
1	1,00	5,80	2,80	3,50
2	2,55	1,95	4,00	2,25
3	1,50	4,40	3,05	3,15
4	1,10	1,10	2,15	3,90
5	1,55	1,90	2,85	2,00
6	1,85	6,50	3,70	3,75
7	2,00	3,55	3,20	2,70
8	0,85	3,35	3,15	5,00
9	1,50	1,90	3,45	3,10
10	1,10	4,35	4,45	3,25
Média ¹	1,50 ^b	3,48 ^a	3,28 ^a	3,26 ^a

¹Médias seguidas pelas mesmas letras na horizontal não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

As maiores quantidades de DNA foram obtidas pelos métodos ME₂, ME₃ e ME₄, que não diferiram estatisticamente entre si, mas diferiram do método 1, que apresentou a extração de menores quantidades de DNA (Tabela 3.5).

Embora existam variações nas concentrações dos componentes do tampão de extração, a diferença básica entre os métodos de ME₁, ME₂ e ME₄ é quanto ao detergente utilizado para romper as membranas celulares. Enquanto os métodos ME₂ e ME₄ utilizam, respectivamente, sarcosyl e SDS (sodium dodecyl sulfate), o método ME₁ utiliza o detergente catiônico CTAB (cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide). A extração de menores quantidades de DNA através do método ME₁, provavelmente seja devida à concentração de CTAB utilizada no tampão, que neste caso pode ter sido insuficiente para desnaturação dos tecidos e células de cabeças de *Atta*. Waldschmidt *et al.* (1997), extraíndo DNA de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae), observaram que quando reduziram de 2% para 1% a concentração de CTAB, mantendo-se constante os demais componentes do tampão de extração, o método tornou-se ineficiente. No caso específico da extração de DNA de *A. sexdens rubropilosa*, utilizando-se o método ME₁, seria importante verificar se o aumento na concentração de CTAB poderia tornar o método mais eficiente. O método ME₃, apesar de não utilizar nenhum agente desnaturante, extraiu quantidades de DNA semelhantes às obtidas pelos métodos ME₂ e ME₄. Este método utiliza apenas uma solução a 5% da resina de troca catiônica Chelex, sendo que a ruptura dos tecidos ocorre devido à fervura do material.

Apesar de todos os métodos terem extraído DNA suficiente para preparar cerca de 60 a 140 reações de PCR-RAPD, tanto o DNA obtido por meio do

método ME₁ como do método ME₃ apresentaram-se totalmente degradados (Fig. 3.1).

Embora neste trabalho o DNA extraído pelo método ME₁ se encontrasse totalmente degradado, o método tem sido amplamente empregado com sucesso por diversos autores para a extração de DNA de tecidos de plantas (Doyle & Doyle, 1990; Boiteaux *et al.*, 1999), de fungos (Graham *et al.*, 1994), de ácaros (Kraus, & Hunt, 1995) e de insetos de diversas ordens, tais como: Lepidoptera (Roehrdanz, 1994,1997; Deverno *et al.*,1998); Hymenoptera (Waldschmidt, *et al.*, 1997; Diptera (Stevens & Wall, 1997). Em comparação com os métodos ME₂ e ME₄, a concentração de EDTA no tampão de extração utilizado neste método é baixa (20 mM). Como esse componente é incluído no tampão com o objetivo de inibir enzimas dependentes de metais, principalmente DNases (Ferreira & Grattapaglia, 1996), a concentração empregada pode ter sido insuficiente para evitar a degradação do DNA.

A degradação do DNA extraído pelo método ME₃, provavelmente deve-se à concentração utilizada de Chelex. Apesar da alta atividade quelante de íons de metais polivalentes dessa resina, a concentração utilizada pode não ter sido suficiente para inibir a ação das nucleases devido à grande quantidade de material utilizado no processo de extração (cabeça de operária maior). DNA com qualidade para análises PCR tem sido obtido de insetos de tamanho pequeno das ordens Hemiptera (Honda *et al.*, 1998) e Hymenoptera (Edwards & Hoy, 1993, 1995; Vanlerberghe-Masutti, 1994), assim como também de outras amostras tais como fungo, *Candida albicans* (Bernal *et al.*, 1997), sêmen, sangue e cabelo (Walsh *et al.*, 1991), utilizando sempre Chelex 5%.

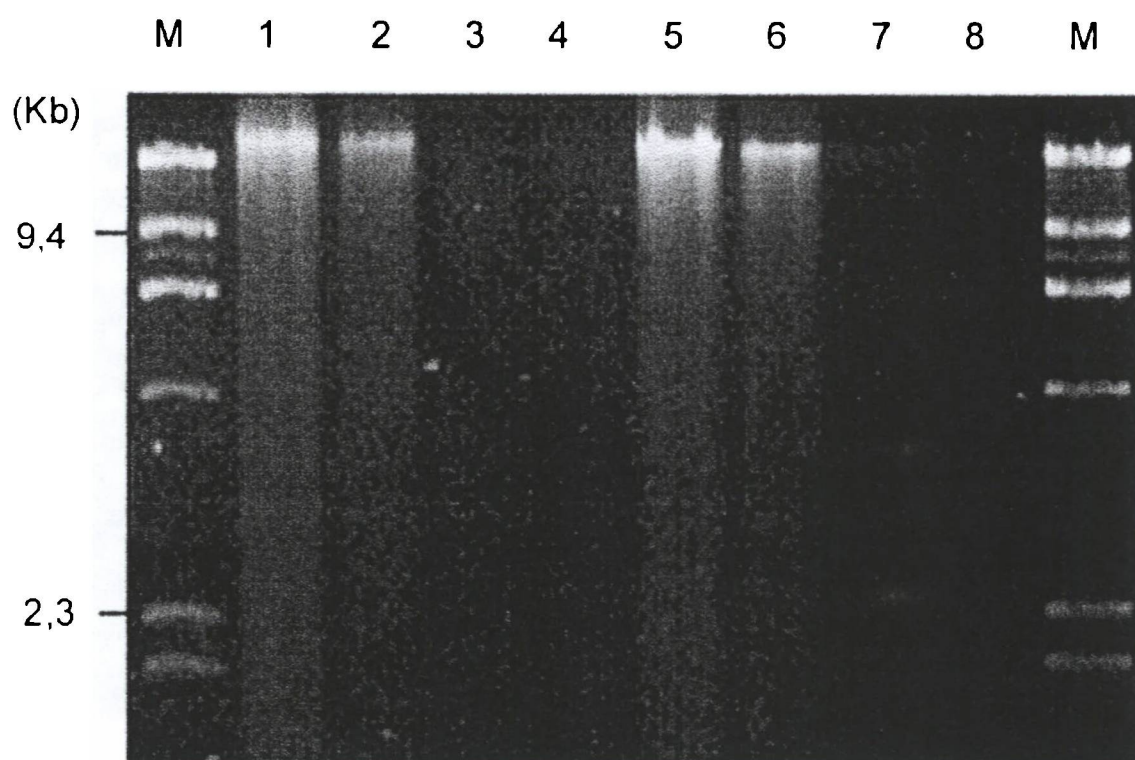


Figura 3.1 Integridade do DNA de *Atta sexdens rubropilosa* extraído por meio de diferentes métodos. (M) marcador λ HindIII; (1-2) método ME₄; (3-4) método ME₁; (5-6) método ME₂; (7-8) método ME₃.

A qualidade do DNA extraído por meio dos métodos de ME₂ e ME₄ pode ser observada através dos dados apresentados na Tabela 3.6. Considerando apenas o DNA de peso molecular acima de 9,4 kb como sendo o de melhor qualidade para as análises PCR-RAPD, observa-se que a porcentagem de DNA com peso molecular $\geq 9,4$ kb, extraída pelo método ME₂ (70,59%) diferiu significativamente da extraída pelo método ME₄ (59,67%).

A reproducibilidade do PCR-RAPD utilizando DNA extraído por meio desses protocolos demonstrou que o padrão de bandas, considerando apenas as claramente visíveis e reproduzíveis, não foi afetado pelo método de extração, comprovando que ambos possibilitaram a extração de DNA com qualidade satisfatória para as análises de PCR-RAPD (Fig. 3.2). Pequenas variações na intensidade das bandas podem ser observadas quando se utiliza DNA extraído de diferentes espécimes. Entretanto, quando se repetiu a análise PCR-RAPD com DNA extraído de um único espécime, não ocorreram variações no padrão e na intensidade das bandas (dados não apresentados). Estes resultados demonstram que ambos os métodos são adequados para a extração de DNA para análises de PCR-RAPD. Entretanto, o custo das extrações quando se utiliza o método M₂ é ligeiramente inferior ao custo com M₄.

3.3.2 Fatores de Maiores Efeitos

Não há um único fator que produz sempre a melhor especificidade, eficiência em PCR-RAPD. De modo geral, é necessário verificar qual a melhor

Tabela 3.6 Influência do método de extração sobre a qualidade do DNA extraído de cabeças de operária máxima de *Atta sexdens rubropilosa*.

Métodos de extração	Qualidade do DNA		
	$\geq 9,4$ kb	$< 9,4$ kb $> 2,3$ kb	$\leq 2,3$ kb
ME ₂	1,00 b ¹ (70,60) ²	0,51 b (24,20)	0,22 b (5,20)
ME ₄	0,88a (59,67)	0,55 b (27,43)	0,36a (12,90)

¹Dados transformados em arcoseno $\sqrt{x}/100$. Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

² Dados originais em porcentagem de DNA.

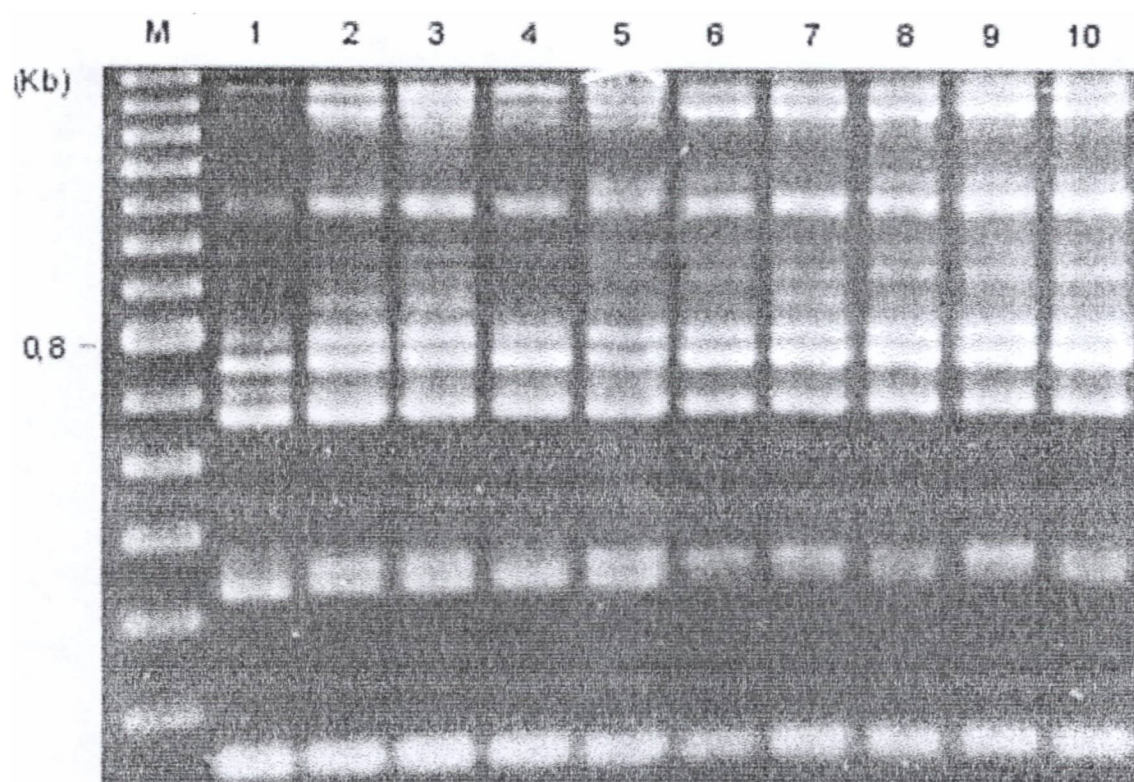


Figura 3.2 Reproducibilidade do padrão de bandas de PCR-RAPD obtido com DNA extraído de diferentes espécimes de *Atta sexdens rubropilosa*, por meio de diferentes métodos e amplificado com o primer OPB-03. (M) marcador 100 pb; (1-5) método ME₂; (6-10) método ME₄.

combinação de diferentes fatores para se obter perfis de bandas com boa reprodutibilidade.

Para verificar os efeitos de diferentes fatores em análises de PCR-RAPD em *Afta*, foram conduzidos oito experimentos com seis primers diferentes. O efeito de cada fator, estimado através de nota visual atribuída às bandas claramente visíveis e reproduzíveis dos oito experimentos, conduzidos com cada um dos seis primers encontra-se na Tabela 3.7. Pode-se concluir, pelos dados apresentados nessa tabela, que o fator método de extração teve pouco efeito sobre PCR-RAPD, ao passo que os outros quatro fatores (2, 3, 4 e 5) tiveram maior influência. Apesar da pequena importância do método de extração sobre a amplificação de fragmentos de DNA, o método ME₂ foi superior ao método ME₄, provavelmente devido à maior quantidade de DNA de peso molecular acima de 9,4 kb extraída por este protocolo.

Entre os fatores de maior influência, o programa de temperatura foi o que apresentou maior efeito sobre a qualidade do padrão de bandas, sendo que o programa P₂ propiciou os melhores resultados. A maior diferença entre os programas P₁ e P₂ encontra-se no aumento dos tempos de desnaturação, anelamento e extensão efetuados no Programa P₂ sendo que no primeiro passo, elevou-se o tempo de desnaturação de 2 para 3 min, acrescentaram-se 3 min a 35°C (anelamento) e 2 min a 72°C (extensão) antes de se repetirem os 40 ciclos.

Observa-se também que, com o aumento da concentração de MgCl₂ de 1,5 para 3,0 mM e com a diminuição da concentração de BSA de 0,1% para 0,05% e da quantidade de DNA de 50 para 25 ng, ocorreu aumento significativo no número

Tabela 3.7 Efeito dos diferentes fatores sobre o padrão de bandas obtidos em PCR-RAPD com DNA extraído da cabeça de *Atta sexdens rubropilosa* e amplificado com seis primers.

	Fator	Efeito ¹
1	Método de Extração de DNA	-0,825
2	Quantidade de DNA	- 1,975
3	Concentração de MgCl ₂	+ 1,225
4	Concentração de BSA	- 1,475
5	Programa de amplificação	- 3.075

¹Influência do fator sobre a reproducibilidade do PCR-RAPD. Quanto maior o valor, maior o benefício do fator sobre PCR-RAPD. Os sinais (+) e (-) indicam os níveis utilizados de cada fator.

de fragmentos de DNA amplificados. Em ambos os programas de temperatura, o número de fragmentos de DNA amplificados foi maior quando utilizaram-se 3 mM de $MgCl_2$, sendo esse efeito observado com maior evidência no programa P_2 . A concentração de $MgCl_2$ é um dos fatores que influenciam diretamente a reproducibilidade do PCR-RAPD, uma vez que esta afeta a especificidade dos fragmentos amplificados, o anelamento dos primers e a atividade e fidelidade da enzima *Taq* polimerase e, conseqüentemente, a intensidade com a qual os fragmentos aparecem no gel de eletroforese (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

Embora a concentração de $MgCl_2$ seja muito importante para obtenção de um exato padrão de bandas, sua importância foi menor do que a concentração de DNA na amplitude de concentração utilizada neste trabalho (Tabela 3.7). A adequação da concentração de DNA é muito importante, uma vez que DNA em excesso pode resultar ou na falha completa da reação devido à alta concentração de impurezas agregadas, ou a perfis eletroforéticos com arraste ("smears") e bandas pouco definidas. Por outro lado, baixa concentração resulta em amplificação errática ou não amplificação de certos fragmentos com perfis de eletroforese não reproduzíveis (Ferreira & Grattapaglia, 1996). Entre as concentrações de DNA avaliadas, a de 25 ng foi melhor do que 50 ng. Liu & Berry (1995) também concluíram que uma concentração menor, no caso 50 ng de DNA de determinadas espécies de nematóide produziu mais fragmentos de DNA do que concentrações de 100 e 200 ng.

Outro fator de relativa importância na reação de PCR-RAPD foi a adição de BSA (albumina de soro bovino). Segundo Ferreira & Grattapaglia (1996) o BSA é utilizado como estabilizador de atividades enzimáticas contra a desnaturação

durante o armazenamento, diluições ou reações enzimáticas *in vitro*. Aparentemente o BSA estabiliza a *Taq* polimerase protegendo-a de impurezas agregadas ao DNA, bem como de íons presentes na superfície de alguns tipos de plásticos utilizados na fabricação de tubos de microcentrífuga. A adição de BSA resulta em amplificações mais intensas, em maior homogeneidade entre as amostras e principalmente na eliminação de reações falhas. Os dados mostraram que os melhores resultados foram obtidos nos experimentos em que se utilizou BSA 0,05%. Quando se utilizou BSA 0,1%, ocorreu a formação de “grumos” de aspecto gelatinoso no interior da reação, comprometendo a sua qualidade. A formação desses “grumos” provavelmente seja consequência da desnaturação do BSA durante o processo de amplificação dos fragmentos de DNA, quando a temperatura é elevada a 94°C. Resultados negativos também foram obtidos por Liu & Berry (1995) quando utilizaram a concentração de 0,18% de BSA na reação de amplificação de DNA de diferentes espécies de nematóides. Os autores observaram que para uma determinada espécie de nematóide não houve amplificação de fragmentos de DNA, enquanto que para outra espécie apenas 2-3 fragmentos foram amplificados.

Os resultados aqui alcançados indicam que maior eficiência de amplificação dos fragmentos de DNA é obtida, quando nas reações PCR-RAPD são utilizados os seguintes fatores: método de extração ME₂, programa de amplificação P₂, BSA 0,05%, 3,0 mM MgCl₂ e 25 ng de DNA. Desses fatores, a concentração de MgCl₂ e a quantidade de DNA foram selecionados para serem otimizados, devido à sua reconhecida importância nas amplificações de PCR-RAPD.

3.3.3 Otimização da Concentração de $MgCl_2$ e Quantidade de DNA

A superfície de resposta, que descreve o comportamento do sistema dentro dos parâmetros estudados, produto da equação $PCR = 12,34 + (0,34 A) + (-1,30 B) + (-2,53 A^2) + (-1,78 B^2) + (1,7A B)$, onde A = quantidade de DNA e B = concentração de $MgCl_2$, permitiu localizar a região ótima que possibilita a melhor eficiência de amplificação dos fragmentos do DNA, avaliada através da intensidade das bandas medida por densitometria. (Fig. 3.3). Nela observa-se que a concentração de $MgCl_2$ deve estar entre 2,0 e 3,2 mM e a quantidade ótima de DNA entre 19 e 30 ng. Resultados similares foram reportados por Liu & Berry (1995) que concluíram ser de 3,5 mM de $MgCl_2$ a concentração ótima para PCR-RAPD com DNA de duas espécies de nematóides entomopatogênicos. Considerando que a eficiência da atividade da *Taq* polimerase e o anelamento dos primers dependem da concentração de $MgCl_2$, a sua amplitude de variação deve ser muito estreita, uma vez que concentrações incorretas podem resultar em baixa eficiência de amplificação ou na produção de produtos não específicos. Aumentando a sua concentração geralmente resulta em um padrão de bandas com maior número de fragmentos amplificados, independentemente do primer utilizado (Jutras *et al.*, 1995).

Devido à sua importância para a reação de PCR-RAPD, o $MgCl_2$ deveria ser otimizado para cada combinação espécie e primer, separadamente (Wolff *et al.*, 1993). Alguns primers são fortemente influenciados pela concentração de $MgCl_2$, enquanto outros são relativamente insensíveis a mudanças na concentração. Na prática, a otimização do $MgCl_2$ para cada primer nem sempre

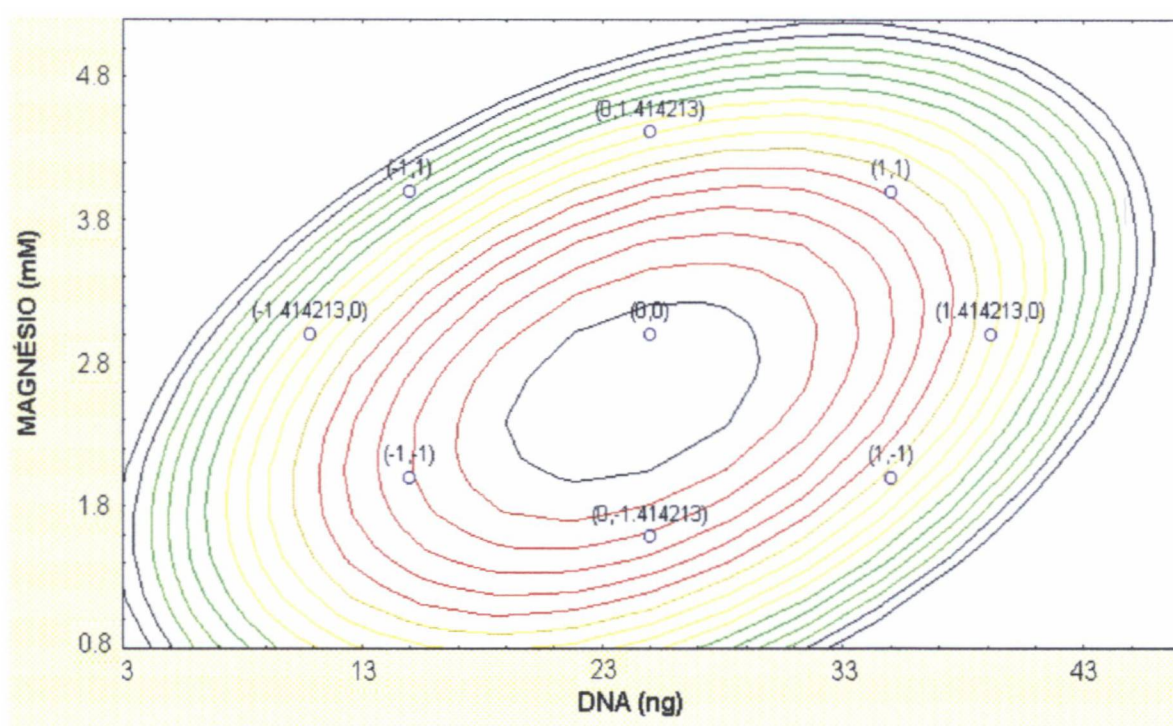


Figura 3.3 Superfície de resposta do padrão de PCR-RAPD em função das concentrações de $MgCl_2$ e quantidade de DNA. As condições ótimas para PCR-RAPD encontram-se na área central da figura. Primer OPA-04.

é viável quando um número de diferentes primers é utilizado com um grande número de diferentes amostras. À fim de solucionar tal situação, Roehrdanz & Flanders (1993) avaliaram o efeito de diversas concentrações de $MgCl_2$ em diversos primers, na eficiência de PCR-RAPD com DNA de parasitóides microhimenópteros, e concluíram ser de 3 mM a concentração ideal para todos os primers usados. O intervalo ótimo de concentração de $MgCl_2$ entre 2,0 e 3,2 mM, encontrado neste trabalho, está dentro do intervalo de 1,5 e 4,0 mM utilizado pela grande maioria dos autores que empregam a técnica PCR-RAPD em análises moleculares de insetos. A quantidade de DNA em relação ao primer é um dos fatores fundamentais para o sucesso da reação de PCR, uma vez que poderá não ocorrer amplificação se a sua quantidade for excessivamente baixa ou alta.

Consequentemente, para reproducibilidade da reação de PCR-RAPD, a quantidade de DNA deverá ser definida e permanecer constante (Jutras *et al.*, 1995). Embora seja conhecido que em vegetais a quantidade ótima de DNA varia grandemente de espécie para espécie: de 3 ng em *Brassica* sp. (Demeke *et al.*, 1991) até 400 ng em tomate (Klein-Lankhorst *et al.*, 1991), nas espécies de insetos as quantidades de DNA utilizadas nas reações têm oscilado entre 10 e 50 ng (Vanlerberghe-Masutti, 1994; Stevens & Wall, 1997; Margaritopoulos *et al.*, 1998; Edwards & Hoy, 1993). Assim, os resultados aqui obtidos, indicando que a quantidade ótima de DNA de *A. sexdens rubropilosa* para as reações PCR-RAPD está entre 19 e 30 ng, são compatíveis com as quantidades normalmente utilizadas para outros insetos, por outros autores.

3.4 Conclusões

Em função de todos os resultados obtidos neste trabalho, as condições estabelecidas para as reações PCR-RAPD com DNA de cabeças de operária maior de *A. sexdens rubropilosa* foram: 25 µl de solução contendo 1 X tampão [10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 3,0 mM Mg²⁺, 50 mM KCl], 100 µM de cada dNTP, 0,2 µM de primer, 1,0 U de *Taq* polimerase, 25 ng DNA (extraído pelo método ME₂) e BSA 0,05%, utilizando-se o programa de amplificação P₂: 3 min a 94°C, 3 min a 35°C, 2 min a 72°C, seguidos de 40 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 36°C e 2 min a 72°C, com extensão final de 5 min a 72°C.

CAPÍTULO 4

ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA E IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *ATTA* POR MEIO DE PCR-RAPD

4.1 Introdução

A identificação correta de um inseto é de fundamental importância para o desenvolvimento de trabalhos, seja qual for o campo a ser estudado. No entanto, os métodos morfométricos tradicionalmente utilizados para identificação de insetos, apresentam muitas limitações em alguns grupos de insetos, tanto pela ambigüidade inerente ao seu uso como pela dificuldade de serem aplicados em alguns estádios de desenvolvimento do inseto (Cenis, 1994).

No caso específico das espécies do gênero *Atta*, conforme Borgmeier (1950), “um dos aspectos desagradáveis da identificação de formicídeos é o fato de ela ser baseada quase que exclusivamente em aspectos morfológicos das operárias, isto é fêmeas degeneradas. As formas sexuais são negligenciadas, o que é lastimável pois o ideal de toda sistemática deve ser o estudo comparativo da maior soma possível de caracteres fenotípicos, porque assim se pode formar uma idéia exata da espécie”.

As dificuldades de se identificar morfológicamente as espécies, devido aos problemas acima expostos, e também devido à escassez de taxonomistas para muitas famílias de diversas ordens, principalmente no Brasil, têm motivado a aplicação de técnicas moleculares baseadas no estudo de diferenças genéticas que, embora sejam de utilização mais difícil, são mais estáveis e objetivas.

Dentre as técnicas genéticas empregadas, PCR-RAPD (Williams *et al.*, 1990) tem sido amplamente utilizada com sucesso para identificar marcadores que caracterizam as espécies. Essa técnica permite a amplificação de numerosos fragmentos de DNA, delimitados por um primer de dez bases de seqüência arbitrária que hibridizam-se em seqüências complementares distribuídas ao acaso no DNA. Dessa forma, detectam-se variações produzidas por mutações nos sítios de hibridação ou por inserções ou eliminações de bases entre os sítios. Esses polimorfismos têm sido utilizados na identificação de espécies e subespécies de diversos organismos tais como espécies vegetais, bactérias, fungos, nematóides, ácaros e insetos pertencentes a diversas ordens (Cenis, 1994). No caso específico de insetos, os resultados independem do estágio de desenvolvimento dos mesmos. Além de permitir a identificação de espécimes, como os dados moleculares representam o genótipo dos indivíduos, é possível também calcular a distância genética (similaridade) entre dois ou mais indivíduos, podendo com essas informações construir-se dendogramas por meio de técnicas de análise de agrupamentos (Nei, 1987).

Diversos autores têm utilizado com êxito a técnica PCR-RAPD para identificação e análise da similaridade genética de várias espécies de insetos, incluindo gafanhotos (Chapco *et al.*, 1992; Silveira *et al.*, 1998); afídeos (Black IV *et al.*, 1992; Cenis *et al.*, 1993; Margaritopoulos *et al.*, 1998; Figueroa *et al.*, 1999); mosquitos e moscas (Kambhampati *et al.*, 1992; Infante-Malachias *et al.*, 1999); microhimenópteros parasitóides (Landry *et al.*, 1993; Narang *et al.*, 1994; Vanlerberghe-Masutti, 1994; Antolin *et al.*, 1996; Aljanabi *et al.*, 1998); joaninhas (Roehrdanz & Flanders, 1993); mosca branca (Guirao *et al.*, 1994; De Barro &

Driver, 1997; Quintero *et al.*, 1998); coleobrocas (Cognato *et al.*, 1995); cochonilhas (Frey & Frey, 1995); curculionídeos (Hidayat *et al.*, 1996). Em recente revisão sobre o uso de PCR-RAPD em entomologia aplicada e evolutiva, Harry *et al.* (1998) citam cerca de 70 trabalhos nos quais a técnica é utilizada, envolvendo sete ordens e 34 famílias de insetos. No entanto nenhum trabalho utilizando técnicas moleculares, e mais especificamente PCR-RAPD, foi realizado com o gênero *Atta*.

Este trabalho teve como objetivo: estabelecer as relações taxonômicas (similaridade genética) entre as espécies e subespécies de *Atta* analisadas e identificar marcadores genéticos para identificação e caracterização das mesmas.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Espécies

As amostras de saúvas analisadas, representando oito espécies e três subespécies, foram coletadas por colaboradores em populações naturais, acondicionadas em frascos contendo etanol 95% e mantidas à temperatura ambiente até o seu recebimento no laboratório, onde foram armazenadas em etanol 95% a -20°C Os espécimes foram identificados pelos professores Dr. Francisco de Assis Menezes Mariconi (USP/Piracicaba-SP) e Dr. Luiz Carlos Forti (UNESP/Botucatu-SP) (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 Procedência das espécies de *Atta* analisadas via PCR-RAPD.

Espécies	Localidade	UF	País
<i>A. sexdens piriventris</i> Santschi, 1919	Porto Alegre	RS	Brasil
	São Mateus do Sul	PR	Brasil
	Pato Branco	PR	Brasil
<i>A. sexdens rubropilosa</i> Forel, 1908	Assis	SP	Brasil
	Dourados	MS	Brasil
	Inajá	PR	Brasil
	Botucatu	SP	Brasil
<i>A. sexdens sexdens</i> (L., 1758)	Cruz das Almas	BA	Brasil
	Mundo Novo	BA	Brasil
	Bananeiras	PB	Brasil
	Cuiabá	MT	Brasil
<i>A. opaciceps</i> Borgmeier, 1939	Solânea	PB	Brasil
	Fortaleza	CE	Brasil
<i>A. robusta</i> Borgmeier, 1939	Guarapari	ES	Brasil
	Ilha Guriri	ES	Brasil
	São João da Barra	RJ	Brasil
<i>A. capiguara</i> Gonçalves, 1944	Guairaçá	PR	Brasil
	Cafeara	PR	Brasil
	Colorado	PR	Brasil
	Nova Olímpia	PR	Brasil
	Presidente Epitácio	SP	Brasil
	Lavras	MG	Brasil
<i>A. laevigata</i> (F. Smith, 1858)	Jardim	MS	Brasil
	Farol	PR	Brasil
	Manaus	AM	Brasil
	Caracas	-	Venezuela
	Dourados	MS	Brasil
	Monte Caceros	-	Argentina
<i>A. vollenweideri</i> Forel, 1893	Caracas	-	Venezuela
<i>A. cephalotes</i> (L., 1758)	Restrepo	-	Colombia
<i>A. bisphaerica</i> Forel, 1908	Lavras	MG	Brasil
	Botucatu	SP	Brasil

4.2.2 Extração de DNA

Para minimizar os riscos de contaminação das amostras com DNA de ovos ou larvas de parasitóides, o DNA foi extraído apenas da cabeça de operárias maiores (soldados), individualmente, utilizando-se o protocolo de Cheung *et al.*, 1993-modificado, como descrito no capítulo anterior.

4.2.3 PCR-RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso)

As reações de PCR-RAPD foram conduzidas em tubo de microcentrífuga de 0,5 ml em um volume total de 25 μ l, contendo 100 μ M de cada dATP, dCTP, dGTP e dTTP, 0,5 μ M de cada primer, 25 ng de DNA, 1,25 U de *Taq* polimerase, 0,05% de BSA e tampão (10 mM Tris-HCl, 3 mM MgCl₂ e 50 mM KCl, pH 8,3). As amplificações foram realizadas no termociclador PTC-100TM (MJ Research, Inc.), utilizando o seguinte programa de amplificação: 3 min a 94°C, 3 min a 35°C e 2 min a 72°C, seguidos de 40 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 36°C e 2 min a 72°C, com extensão final de 5 min a 72°C. Foram utilizados 40 primers (Operon Technologies) pertencentes ao Kit A (OPA-01 a OPA-20) e Kit B (OPB-01 a OPB-20), selecionados ao acaso. Os produtos das reações foram observados em gel de agarose a 1,5%, corado em brometo de etídio a 0,05% e fotografado com o sistema Kodak EDAS 120. As fotos foram apresentadas na forma de negativo para melhor distinção dos fragmentos.

4.2.4 Análise dos Dados

Somente fragmentos (bandas) claramente visíveis e reproduzíveis em dois ou mais géis, com DNA de diferentes espécimes de um mesmo saubeiro, foram considerados para as análises. A presença ou ausência de cada fragmento, registrada diretamente das fotografias dos géis, foi considerada como um carácter independente. Os dados foram analisados pelo programa NTSYS-pc V 1.8 (Rohlf, 1993). A matriz de distância genética foi calculada através do coeficiente de similaridade de Jaccard (Sneath & Sokal, 1973), o qual não considera as ausências conjuntas como elemento em favor da similaridade:

$S_{xy} = a/(a+b+c)$, onde:

a = número de caracteres presentes em x e y ;

b = número de caracteres presentes em x mas não em y ;

c = número de caracteres ausentes em x mas presente em y .

A análise de agrupamento foi feita utilizando-se a técnica UPGMA (unweighted mean pair group arithmetic mean) (Sneath & Sokal, 1973). Para se medir o grau de confiabilidade com o qual o dendograma representa a matriz de similaridade, utilizou-se a técnica do coeficiente de correlação cofenética (Sokal & Rohlf, 1962). Esta técnica consiste em construir uma nova matriz de similaridade a partir dos valores do dendograma, denominada matriz cofenética. Os dados de ambas as matrizes (a de similaridade e a cofenética) foram computados através de estatística de Mantel (Rohlf, 1993) para se obter o coeficiente de correlação cofenética.

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1 Diversidade Genética

Dos 40 primers utilizados neste trabalho, apenas 11 primers (Tabela 4.2) foram selecionados por terem amplificado com sucesso fragmentos de todas as espécies de *Atta*. Um total de 215 bandas, cujos tamanhos variaram entre 280 e 2010 pb, foram usadas como caracteres distintos nas análises estatísticas. Todos os primers selecionados revelaram polimorfismo, que variou de 75% (com OPA-19) a 100% (com OPA-04, OPA-07, OPA-10, OPA-17, OPB-12, OPB-15 e OPB-18). O número de fragmentos selecionados amplificados por cada primer e as percentagens de bandas polimórficas e monomórficas encontram-se na Tabela 4.2, onde observa-se que dos 215 fragmentos selecionados, cerca de 206 (95,8%) são polimórficos e os demais, monomórficos. Essa alta taxa de fragmentos polimórficos revela uma significativa divergência genética entre as espécies, tornando fácil a identificação das mesmas por meio desta técnica (Guirao *et al.*, 1994). A presença ou ausência dos 206 fragmentos polimórficos, codificados como (1) e (0), respectivamente, foi determinada para cada amostra de *Atta* e utilizada para gerar a matriz de similaridade, utilizando-se o coeficiente de Jaccard (Tabela 4.3). A análise de agrupamento, determinada através da técnica UPGMA, usando o coeficiente de similaridade de Jaccard, é apresentada como dendograma na Fig. 4.1. O coeficiente de correlação cofenética obtido entre a matriz de similaridade e a matriz cofenética foi de 0,949. Sneath & Sokal (1973) demonstraram empiricamente que valores superiores a 0,8 indicam uma boa representação da matriz de similaridade por parte do dendograma e que a técnica

Tabela 4.2. Polimorfismos gerados pelos primers nas análises de variabilidade genética do gênero *Atta*, via PCR-RAPD.

Código	Seqüência (5' – 3')	Nº de fragmentos amplificados	Nº de fragmentos polimórficos	% de polimorfismo
OPA-03	AGTCAGCCAC	19	16	84,20
OPA-04	AATCGGGCTG	15	15	100,00
OPA-07	GAAACGGGTG	24	24	100,00
OPA-10	GTGATCGCAG	15	15	100,00
OPA-17	GACCGCTTGT	19	19	100,00
OPA-19	CAAACGTCGG	12	9	75,00
OPB-01	GTTTCGCTCC	26	25	96,10
OPB-12	CCTTGACGCA	25	25	100,00
OPB-15	GGAGGGTGTT	17	17	100,00
OPB-17	AGGGAACGAG	21	19	90,50
OPB-18	CCACAGCAGT	22	22	100,00
Total		215	206	95,80

Tabela 4.3 Matriz de similaridade genética entre diferentes espécies de *Atta*, calculada através do coeficiente de Jaccard.

1. <i>A. s. piriventris</i> - RS	1,00
2. <i>A. s. piriventris</i> - S. M. do Sul	0,90 1,00
3. <i>A. s. piriventris</i> - Pato Branco	0,92 0,91 1,00
4. <i>A. s. rubropilosa</i> - Assis	0,90 0,86 0,86 1,00
5. <i>A. s. rubropilosa</i> - Dourados	0,89 0,89 0,84 0,93 1,00
6. <i>A. s. rubropilosa</i> - Inajá	0,90 0,88 0,84 0,93 0,95 1,00
7. <i>A. s. rubropilosa</i> - Botucatu	0,91 0,89 0,86 0,95 0,96 0,96 1,00
8. <i>A. s. sexdens</i> - Cruz das Almas	0,87 0,83 0,80 0,87 0,84 0,85 0,88 1,00
9. <i>A. s. sexdens</i> - Mundo Novo	0,77 0,75 0,75 0,78 0,78 0,77 0,77 0,79 1,00
10. <i>A. s. sexdens</i> - Bananeiras	0,85 0,85 0,79 0,87 0,85 0,86 0,88 0,92 0,85 1,00
11. <i>A. s. sexdens</i> - Cuiabá	0,81 0,80 0,80 0,87 0,88 0,87 0,86 0,86 0,75 0,85 1,00
12. <i>A. opaciceps</i> - Solânea	0,63 0,62 0,53 0,63 0,63 0,65 0,66 0,65 0,63 0,69 0,64 1,00
13. <i>A. opaciceps</i> - Fortaleza	0,63 0,63 0,54 0,62 0,62 0,64 0,65 0,60 0,61 0,69 0,60 0,83 1,00
14. <i>A. robusta</i> - Guarapari	0,64 0,64 0,60 0,68 0,67 0,68 0,68 0,69 0,73 0,73 0,65 0,64 0,70 1,00
15. <i>A. robusta</i> - Ilha Guriri	0,67 0,67 0,63 0,69 0,69 0,69 0,69 0,67 0,73 0,71 0,67 0,60 0,63 0,92 1,00
16. <i>A. robusta</i> - S. J. da Barra	0,68 0,66 0,62 0,68 0,68 0,70 0,69 0,69 0,72 0,73 0,67 0,65 0,66 0,86 0,93 1,00
17. <i>A. capiguara</i> - Guairaçá	0,63 0,62 0,57 0,61 0,63 0,61 0,63 0,63 0,57 0,62 0,64 0,59 0,54 0,53 0,54 0,58 1,00
18. <i>A. capiguara</i> - Cafeara	0,61 0,59 0,54 0,62 0,61 0,60 0,63 0,63 0,57 0,61 0,63 0,59 0,56 0,54 0,53 0,56 0,97 1,00
19. <i>A. capiguara</i> - Colorado	0,64 0,62 0,57 0,68 0,64 0,63 0,65 0,69 0,61 0,67 0,67 0,61 0,53 0,59 0,57 0,57 0,94 0,96 1,00
20. <i>A. sp.</i> - Nova Olímpia	0,57 0,55 0,58 0,59 0,56 0,57 0,59 0,63 0,55 0,58 0,56 0,52 0,49 0,55 0,57 0,63 0,70 0,71 0,70 1,00
21. <i>A. capiguara</i> - Pres. Epitácio	0,64 0,62 0,57 0,63 0,63 0,66 0,64 0,64 0,56 0,62 0,61 0,63 0,57 0,56 0,56 0,61 0,90 0,91 0,90 0,71 1,00
22. <i>A. laevigata</i> - Lavras	0,61 0,59 0,55 0,59 0,57 0,59 0,59 0,58 0,54 0,58 0,58 0,59 0,56 0,53 0,55 0,58 0,73 0,74 0,73 0,62 0,82 1,00
23. <i>A. laevigata</i> - Jardim	0,64 0,63 0,59 0,62 0,63 0,61 0,62 0,60 0,53 0,60 0,61 0,56 0,52 0,47 0,49 0,54 0,72 0,73 0,71 0,64 0,80 0,91 1,00
24. <i>A. laevigata</i> - Farol	0,59 0,58 0,55 0,58 0,57 0,56 0,57 0,57 0,53 0,56 0,57 0,58 0,58 0,51 0,53 0,55 0,73 0,77 0,72 0,60 0,80 0,89 0,89 1,00
25. <i>A. laevigata</i> - Manaus	0,59 0,59 0,54 0,58 0,59 0,60 0,61 0,61 0,54 0,61 0,58 0,63 0,60 0,57 0,55 0,59 0,70 0,71 0,69 0,67 0,81 0,86 0,88 0,83 1,00
26. <i>A. laevigata</i> - Caracas	0,59 0,57 0,52 0,59 0,57 0,58 0,60 0,62 0,52 0,62 0,57 0,57 0,56 0,53 0,50 0,53 0,66 0,69 0,67 0,63 0,78 0,77 0,87 0,80 0,87 1,00
27. <i>A. laevigata</i> - Dourados	0,61 0,61 0,57 0,62 0,63 0,62 0,63 0,61 0,59 0,61 0,62 0,61 0,57 0,52 0,54 0,59 0,69 0,68 0,70 0,54 0,73 0,82 0,76 0,85 0,73 0,71 1,00
28. <i>A. vollenweideri</i> - M ^{te} Cáceros	0,63 0,61 0,57 0,64 0,61 0,62 0,64 0,67 0,58 0,66 0,65 0,56 0,54 0,56 0,55 0,58 0,71 0,74 0,73 0,66 0,80 0,68 0,74 0,71 0,78 0,80 0,61 1,00
29. <i>A. cephalotes</i> - Caracas	0,49 0,49 0,45 0,46 0,44 0,46 0,48 0,50 0,41 0,47 0,45 0,36 0,39 0,41 0,40 0,44 0,48 0,48 0,50 0,44 0,53 0,50 0,51 0,48 0,54 0,57 0,46 0,54 1,00
30. <i>A. cephalotes</i> - Restrepo	0,53 0,50 0,47 0,50 0,47 0,51 0,50 0,53 0,46 0,51 0,47 0,44 0,43 0,46 0,45 0,50 0,52 0,54 0,58 0,47 0,59 0,55 0,55 0,51 0,59 0,61 0,47 0,60 0,88 1,00
31. <i>A. bisphaerica</i> - Lavras	0,50 0,50 0,44 0,51 0,48 0,47 0,49 0,52 0,46 0,49 0,52 0,54 0,48 0,49 0,46 0,47 0,67 0,73 0,72 0,56 0,69 0,62 0,60 0,63 0,64 0,63 0,61 0,62 0,54 0,56 1,00
32. <i>A. bisphaerica</i> - Botucatu	0,51 0,49 0,46 0,51 0,49 0,49 0,48 0,49 0,47 0,49 0,52 0,45 0,49 0,49 0,48 0,51 0,63 0,65 0,62 0,57 0,66 0,57 0,61 0,59 0,60 0,65 0,56 0,62 0,53 0,56 0,83 1,00

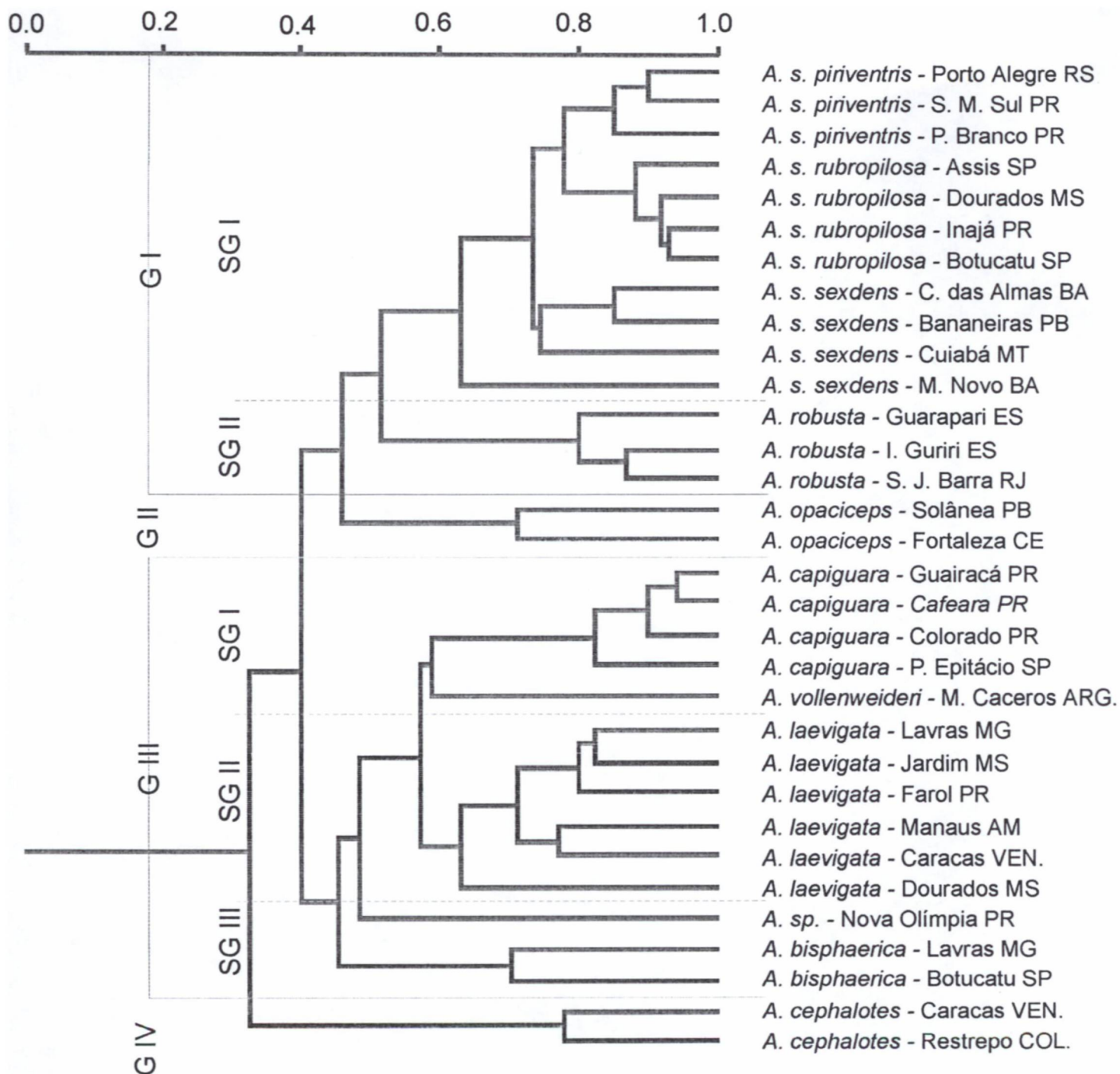


Figura 4.1 Dendrograma construído com base em dados de RAPD, utilizando o método UPGMA, sobre a matriz de similaridade calculada pelo coeficiente de Jaccard, indicando a similaridade entre as espécies de *Atta*.

de ligamento médio (UPGMA) é a que origina menor distorção entre a matriz de similaridade e o dendograma.

A análise de similaridade entre as amostras de *Atta*, através da técnica UPGMA (Fig. 4.1), separou as espécies em quatro grupos, sendo o Grupo I constituído pelas espécies de *A. sexdens piriventris*, *A. sexdens rubropilosa*, *A. sexdens sexdens* e *A. robusta*. Nesse grupo, observa-se a formação de dois subgrupos: um constituído pelas subespécies de *A. sexdens* e outro por *A. robusta*. No subgrupo das *A. sexdens*, pode-se observar a formação de três núcleos distintos que separam as amostras das espécies de *A. sexdens piriventris*, *A. sexdens rubropilosa* e *A. sexdens sexdens*. No núcleo de *A. sexdens piriventris*, a menor similaridade encontrada entre as amostras foi de 0,85. Essa alta similaridade pode ser explicada pela restrita área de ocupação dessa subespécie, quando comparada à de outras espécies, uma vez que é encontrada apenas nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Região Sul do Paraná (Mariconi, 1970). Em função do alto grau de similaridade observado entre as amostras analisadas, parece não haver dúvidas quanto à sua classificação. Situação semelhante ocorre no núcleo de *A. sexdens rubropilosa*, onde observa-se alto grau de similaridade entre as amostras das diferentes localidades, embora essa subespécie tenha sua área de ocupação maior do que a de *A. sexdens piriventris*. Por outro lado, no núcleo das *A. sexdens sexdens* observa-se que o índice de similaridade entre as amostras variou de 0,63 a 0,85, provavelmente devido à sua ampla distribuição, sendo encontrada em 18 estados brasileiros (Della Lúcia *et al.*, 1993), onde ocorrem diferentes condições ecológicas. Dentro desse núcleo, as amostras provenientes de Mundo Novo-BA e Cuiabá-MT, apresentaram os mais

baixos índices de similaridade, respectivamente 0,63 e 0,74, indicando alta variabilidade genética dentro dessa subespécie.

Esse resultado sugere uma análise mais aprofundada, envolvendo maior número de amostras de *A. sexdens sexdens*, cujos resultados poderão indicar novos núcleos dentro do subgrupo das *A. sexdens*. Tal hipótese é corroborada por Delabie *et al.* (1997) que, ao observarem uma distribuição parapátrica de *A. sexdens sexdens* e *A. sexdens rubropilosa* na região sul da Bahia, levantaram uma série de dúvidas sobre a afinidade entre os dois taxa, sugerindo que somente estudos genéticos aprofundados poderiam resolvê-las.

Embora Borgmeier (1959) e Bolton (1995) tenham sinonimizado as diferentes subespécies de *A. sexdens*, a maior parte dos autores brasileiros continua a considerar como válidos os três taxa em suas publicações: *A. sexdens piriventris*, *A. sexdens rubropilosa* e *A. sexdens sexdens* (Delabie *et al.*, 1997). Os resultados, embora necessitem de maior aprofundamento, ajudam a sustentar a revalidação das três subespécies proposta por Gonçalves (1963), por serem as mesmas facilmente caracterizadas pela morfologia, ocuparem áreas geográficas bem definidas e construírem formigueiros de estruturas diferentes.

No subgrupo II encontra-se apenas um núcleo constituído pelas amostras de *A. robusta* provenientes de Guarapari-ES, Ilha Guriri-ES e São João da Barra-RJ, com alto índice de similaridade entre si. Também, nesse caso, o alto índice de similaridade pode ser devido à restrita área de distribuição da espécie, que de acordo com Della Lucia *et al.* (1993) é encontrada apenas no estado do Rio de Janeiro, embora neste trabalho tenham sido também analisadas amostras coletadas no estado do Espírito Santo. Pelo dendograma observa-se que o

subgrupo de *A. sexdens* é o que se encontra mais próximo de *A. robusta*, o que demonstra que Borgmeier (1939) estava correto ao, inicialmente, classificar *A. robusta* como subespécie de *A. sexdens* e, posteriormente, elevá-la à categoria de espécie (Borgmeier, 1950). Entretanto, esse mesmo autor não deveria ter incluído *A. robusta* como pertencente ao subgênero *Epiatta*, juntamente com *A. opaciceps*, *A. capiguara*, *A. laevigata* e *A. vollenweideri* e sim como *Neoatta*, juntamente com *A. sexdens*.

No grupo II, ou intermediário, encontra-se apenas um núcleo constituído por *A. opaciceps*. O índice de similaridade observado (0,72) entre as amostras provenientes de Solânea-PB e Fortaleza-CE pode ser considerado relativamente baixo. No entanto, provavelmente esse índice seja explicado devido à ampla distribuição da espécie pela Região Nordeste, ocorrendo desde o Nordeste da Bahia até ao Piauí, e também devido à distância entre os locais de origem das amostras. Embora o grupo II esteja mais próximo do grupo I, a distância que o separa do grupo III é muito pequena, sendo que por esta razão o mesmo foi denominado “intermediário”.

No grupo III, representado por *A. capiguara*, *A. vollenweideri*, *A. laevigata*, *Atta* sp. e *A. bisphaerica*, observa-se a formação de três subgrupos. No subgrupo I podemos distinguir dois núcleos: um constituído pelas amostras de *A. capiguara* e outro por *A. vollenweideri*. No núcleo de *A. capiguara* os índices encontrados entre as amostras indicam alta similaridade entre as mesmas. O núcleo seguinte, um núcleo isolado, é representado apenas por *A. vollenweideri* que se une ao núcleo de *A. capiguara*, mas com baixo nível de similaridade (0,60). Embora a similaridade entre esses dois núcleos seja baixa, ela nos remete ao trabalho de

Borgmeier (1950), o qual utiliza o aparelho genital masculino para separação das espécies. Nesse trabalho o autor menciona que as "sagitas" de *A. capiguara* são muito semelhantes às de *A. vollenweideri*, o que corrobora os resultados obtidos no presente trabalho.

No subgrupo II, composto pelas amostras de *A. laevigata*, observam-se três núcleos bem distintos, em cuja formação nota-se a influência do fator regionalização. O primeiro núcleo é formado com as amostras provenientes de Lavras-MG, Jardim-MS e Farol-PR, que apresenta índice de similaridade acima de 0,82. No segundo núcleo, formado pelas amostras provenientes de Manaus-AM e Caracas, Venezuela, o índice de similaridade entre as amostras é menor do que aqueles observados dentro do grupo anterior. O terceiro núcleo caracteriza-se por ser um núcleo isolado, constituído apenas pela amostra proveniente de Dourados-MS e agrupa-se aos dois primeiros núcleos a um nível de similaridade de apenas 0,63. Esse índice é inferior aos índices observados nos agrupamentos entre as subespécies de *A. sexdens*.

Esses resultados evidenciam a variabilidade genética entre as amostras de *A. laevigata* de diferentes regiões geográficas, como já havia sido observado por Carvalho & Vieira (1999) ao analisarem 14 amostras dessa espécie procedentes de diversas localidades. A variabilidade genética aqui encontrada indica a necessidade de uma análise mais detalhada dessa espécie, envolvendo maior número de amostras de uma mesma e de outras localidades, cujos resultados poderão levar à descrição de subespécies dentro de *A. laevigata*, o que não constituiria surpresa alguma, uma vez que Gonçalves (1942) já descrevera diversas subespécies e variedades. Além da variabilidade genética, *A. laevigata*

apresenta também um dos padrões de variação morfológica mais acentuados entre os Attini, sobretudo na morfologia das operárias (Delabie, 1998). Provavelmente essa variabilidade tenha levado Gonçalves (1982) a descrever uma nova espécie, *A. silvai*, que posteriormente foi considerada por Delabie (1998), sinônimo júnior de *A. laevigata*. Devido a estas variabilidades, somente trabalhos futuros poderão esclarecer a posição taxonômica de *A. silvai* e de outras amostras de diferentes regiões do País.

No subgrupo III encontramos um núcleo isolado constituído apenas por uma amostra de *Atta* sp., proveniente de Nova Olímpia-PR, e outro formado pelas amostras de *A. bisphaerica* provenientes de Lavras-MG e Botucatu-SP. O espécime de *Atta* sp., coletado em Nova Olímpia, inicialmente identificado pelo Dr. Luiz Carlos Forti como *A. capiguara*, constitui um núcleo isolado que se agrupa primeiramente a *A. laevigata*, *A. vollenweideri* e *A. capiguara*, com apenas 0,49 de similaridade. Provavelmente trata-se um novo táxon, o que somente poderá ser esclarecido após novas análises morfológicas e moleculares. No núcleo constituído por *A. bisphaerica* o índice de similaridade observado entre as amostras foi de 0,71, sendo que essas se agrupam às demais espécies com baixo nível de similaridade (0,46). Esse baixo nível de similaridade com as demais espécies provavelmente é devido a *A. bisphaerica* ser considerada uma das espécies mais primitivas do gênero *Atta* (Borgmeier, 1950).

O grupo IV é constituído apenas pelas amostras de *A. cephalotes* provenientes de Caracas-Venezuela e Restrepo-Colômbia. Observa-se pelo dendograma que *A. cephalotes* agrupa-se às demais espécies com nível de similaridade de 0,40, inferior ao qual *A. bisphaerica* se agrupa com as demais

espécies. De acordo com Borgmeier (1950) *A. cephalotes* é a mais primitiva do gênero *Atta*, o que provavelmente explica sua distância genética das demais espécies.

4.3.2 Identificação das espécies

A utilização da técnica de PCR-RAPD além de permitir a análise de similaridade genética, permite também identificar marcadores genéticos para serem usados na identificação das espécies e subespécies do gênero *Atta*, tal como utilizados por Roehrdanz *et al.* (1993), Narang *et al.* (1994) e Frey & Frey (1995), para elaboração de chaves para identificação de espécies de coccinelídeos, himenópteros parasitóides e cochonilhas, respectivamente.

Os 11 primers selecionados produziram fragmentos polimórficos que podem ser utilizados para identificar todas as espécies de *Atta* estudadas (Tabela 4.4). Dois desses primers, individualmente, distinguem cinco espécies; um primer distingue quatro espécies e os demais apenas uma espécie cada. A distinção dos fragmentos, seu tamanho aproximado em pares de bases (pb) e, a condição de presentes ou ausentes, são listados na tabela. A escolha destes fragmentos como identificadores das espécies não significa que somente eles estão presentes nos géis; outros fragmentos menos informativos também são encontrados.

Observa-se na Tabela 4.4 que apenas para *A. sexdens sexdens* há a necessidade da associação de dois primers para sua identificação - presença ou ausência de fragmentos de dois primers, enquanto que para as demais, apenas a

Tabela 4.4 Identificação de espécies do gênero *Atta*, baseada na ausência ou presença de fragmentos (tamanho aproximado em pb) de PCR-RAPD, usando diferentes primers.

Espécies	Primers	Fragmentos (pb)
<i>A. sexdens piriventris</i>	OPA-03	280, 430, 650, 800 e 1380 presentes; 450, 520, 720 e 1220 ausentes
	OPA-07	590, 670, 800, 1090, 1570 e 1890 presentes; 1920 ausente
<i>A. sexdens rubropilosa</i>	OPA-07	750, 780, 1090 e 1920 presentes
	OPA-17 e	800, 890 e 1350 presentes
	OPB-01	660, 960, 1140, 1340 e 1500 presentes
<i>A. sexdens. sexdens</i>	OPA- 07 e	1090, 1280 e 1570 presentes; 1890 e 780 ausentes
	OPA-10	980, 1100, 1180 e 1260 presentes; 1040 e 1400 ausentes
<i>A. robusta</i>	OPA-07	820, 1090, 1280 e 1600 presentes
	OPA-10	970, 1040, 1180 e 1250 presentes
	OPA-17	890, 940, 1000 e 1140 presentes
	OPB-18	600, 700, 910, 1100 e 1510 presentes
	OPA-03	850, 940, 1250 e 1480 presentes
<i>A. opaciceps</i>	OPA-07	800, 850, 950, 1920 e 2010 presentes

Tabela 4.4 (Continuação)

<i>A. capiguara</i>	OPA-07	1060, 1260, 1540 e 1710 presentes; 1880 ausente
	OPA-17	890, 1140, 1270, 1400, 1550 e 1700 presentes
	OPB-17	460, 570, 780, 870, 1040 e 1300 presentes; 1140 e 1180 ausentes
<i>A. vollenweideri</i>	OPA-03	720, 800, 1000, 1230 e 1390 presentes; 450 ausente
	OPA-10	780, 980, 1100 e 1180 presentes
<i>A. laevigata</i>	OPA-03	430, 650, 750, 900 e 1340 presentes
	OPA-10	970, 1090, 1180 e 1280 presentes
	OPB-01	910, 1110, 1340, 1550 e 1890 presentes
<i>A. bisphaerica</i>	OPA-04	620, 740, 770 e 1440 presentes
	OPA-10	1090, 1180 e 1330 presentes
	OPB-12	330, 720, 910, 980, 1150 e 1780 presentes
	OPB-15	1240, 1350 e 1540 presentes
	OPB-17	770, 830, 970, 1040, 1430, 1500 e 1630 presentes
<i>A. cephalotes</i>	OPA-04	620, 1200, 1320, 1440 e 1810 presentes
	OPA-10	870, 1090, 1180, 1250 e 1400 presentes
	OPB-12	1150, 1220, 1670 e 1820 presentes
	OPB-17	770, 830, 1050, 1080 e 1180 presentes

presença de fragmentos de um primer é suficiente para a identificação/discriminação da espécie. Também, com exceção dessa espécie, para todas as outras foi possível encontrar mais de um primer para sua identificação, como é o caso, por exemplo, de *A. bisphaerica* que pode ser identificada utilizando-se apenas um dos seguintes primers isoladamente: OPA-04, OPA-10, OPB-12 (Fig. 4.2), OPB-15 e OPB-17. No caso específico de *A. sexdens sexdens* a identificação é feita através da presença dos fragmentos 1090, 1280 e 1570 e ausência dos 780 e 1890, do primer OPA-07 e pela presença dos fragmentos 980, 1100, 1180 e 1260 e ausência dos 1040 e 1400 do primer OPA-10 (Fig 4.3). Para *A. sexdens rubropilosa*, a identificação é possível com apenas um primer ou pela associação de dois primers. Assim, essa espécie pode ser identificada pela presença dos fragmentos 670, 740, 1090 e 1920 do primer OPA-07 (Fig. 4.4) ou pela associação da presença dos fragmentos dos primers OPA-17 e OPB-01. A identificação das espécies *A. sexdens piriventris* e *A. opaciceps* pode ser feita por meio do primer OPA-03 (Fig. 4.5). Nesse caso há que se constar a presença dos fragmentos nitidamente visíveis 280, 430, 650, 800 e 1380 e a ausência dos fragmentos 450, 520, 720 e 1220 para a primeira espécie e presença dos fragmentos 850, 940, 1250 e 1480 para a segunda. Quando esse mesmo primer é utilizado para identificar *A. laevigata* (Fig. 4.6), observa-se a presença dos fragmentos 430, 650, 750, 900 e 1340. Nas Figs. 4.6 a 4.10, pode-se observar os fragmentos amplificados por cada primer que identificam as espécies *A. robusta*, *A. capiguara*, *A. vollenweideri* e *A. cephalotes*, respectivamente. Embora todos os primers tenham produzido fragmentos

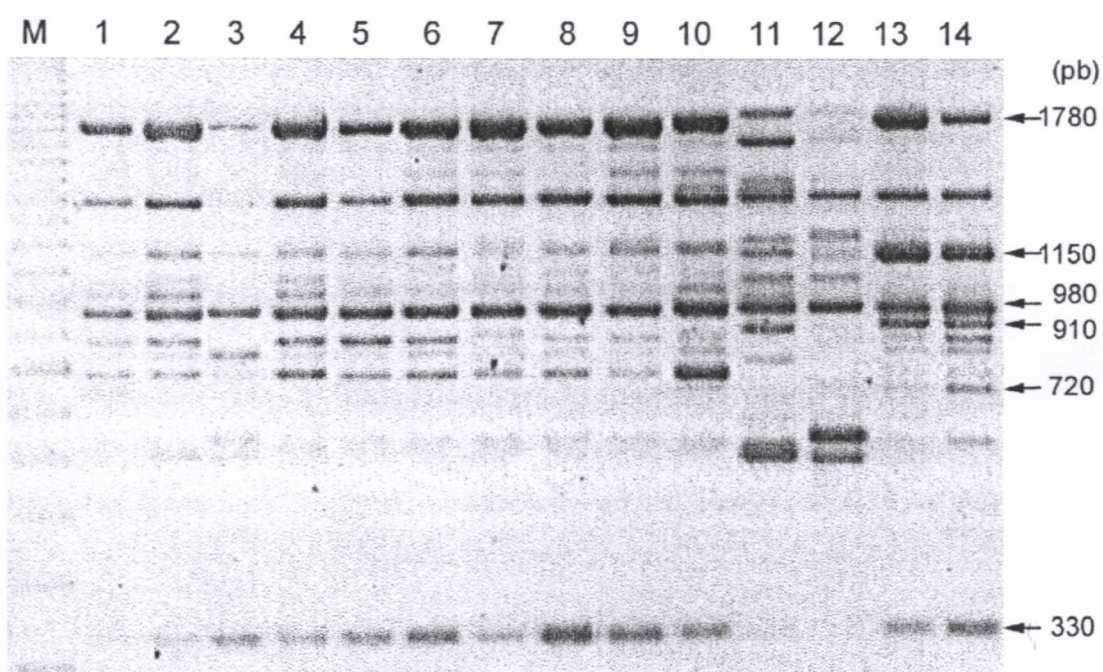


Figura 4.2 Padrão de fragmentos amplificados por PCR-RAPD de espécimes de *Atta* obtido com o primer OPB-12. (M) marcador 100 pb; (1; 2; 4) *A. capiguara*; (3) *Atta* sp.; (5-9) *A. laevigata*; (10) *A. vollenweideri*; (11-12) *A. cephalotes*; (13-14) *A. bisphaerica*.

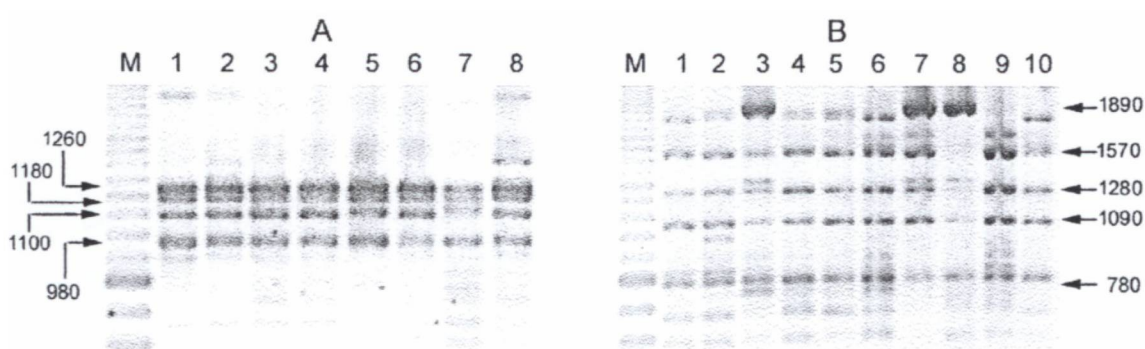


Figura. 4.3 Padrão de fragmentos amplificados por PCR-RAPD de espécimes de *Atta*. **{A}**: Primer OPA-10 - (M) marcador 100 pb; (1-2) *A. sexdens piriventris*; (3-6) *A. sexdens rubropilosa*; (7-8) *A. sexdens sexdens*; **{B}**: Primer OPA-07 - (M) marcador 100pb; (1-2) *A. sexdens piriventris*; (3-6) *A. sexdens rubropilosa*; (7-10) *A. sexdens sexdens*.

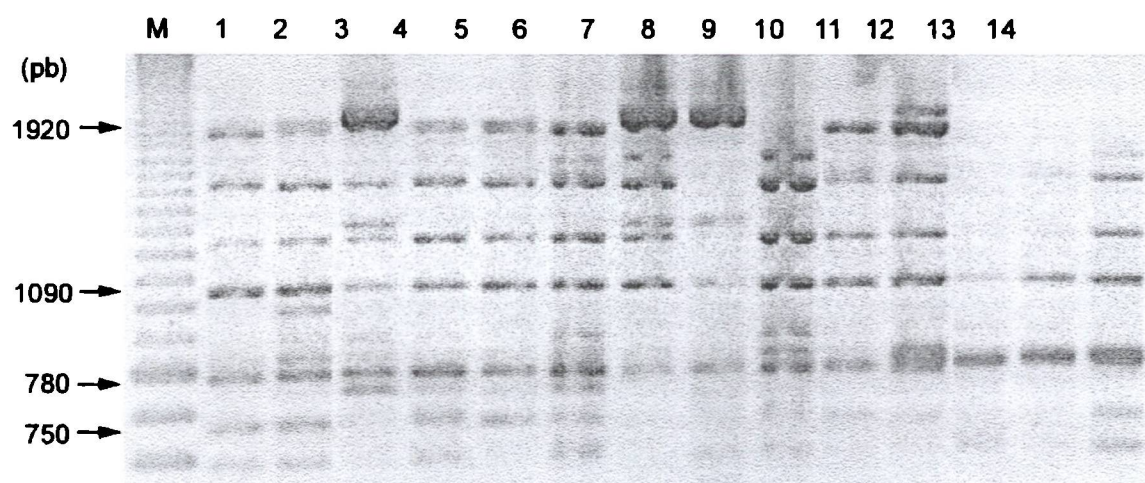


Figura 4.4 Padrão de fragmentos amplificados por PCR-RAPD de espécimes de *Atta* obtido com o primer OPA-07. (M) marcador 100 pb; (1-2) *A. sexdens piriventris*; (3-6) *A. sexdens rubropilosa*; (7-10) *A. sexdens sexdens*; (11) *A. opaciceps*; (12-14) *A. robusta*.

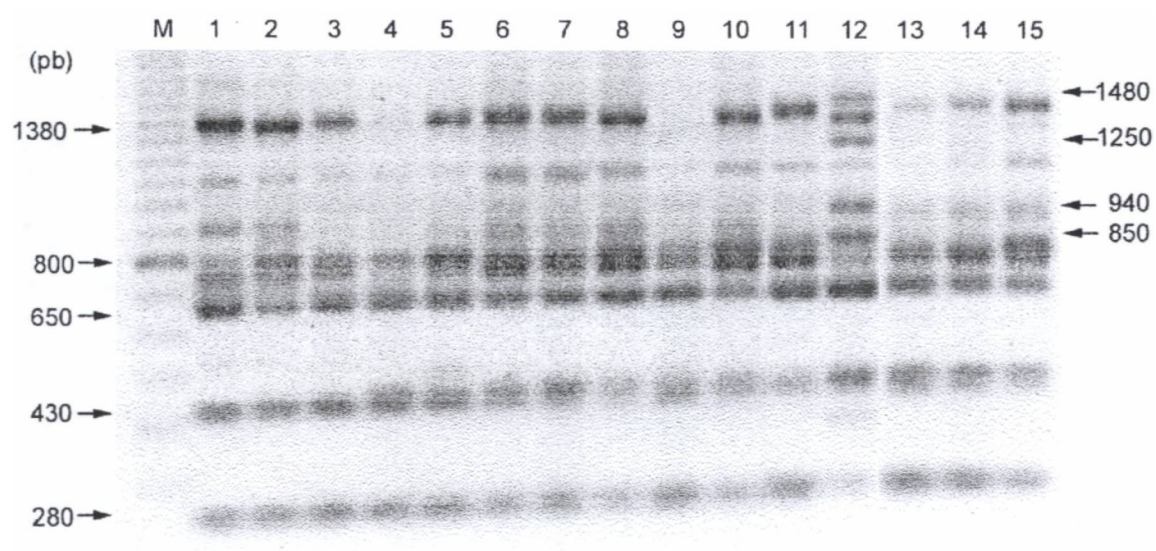


Figura 4.5 Padrão de fragmentos amplificados por PCR-RAPD de espécimes de *Atta* obtido com o primer OPA-03. (M) marcador 100 pb; (1-3) *A. sexdens piriventris*; (4-7) *A. sexdens rubropilosa*; (8-11) *A. sexdens sexdens*; (12) *A. opaciceps*; (13-15) *A. robusta*.

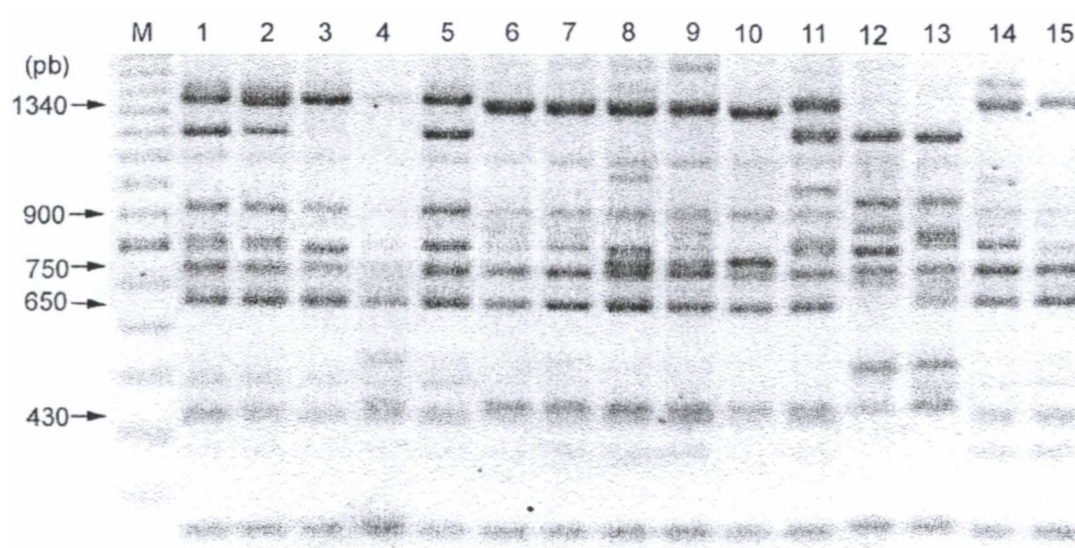


Figura 4.6 Padrão de fragmentos amplificados por PCR-RAPD de espécimes de *Atta* obtido com o primer OPA-03. (M) marcador 100 pb; (1-5) *A. capiguara*; (6-10) *A. laevigata*; (11) *A. vollenweideri*; (12-13) *A. cephalotes*; (14-15) *A. bisphaerica*.

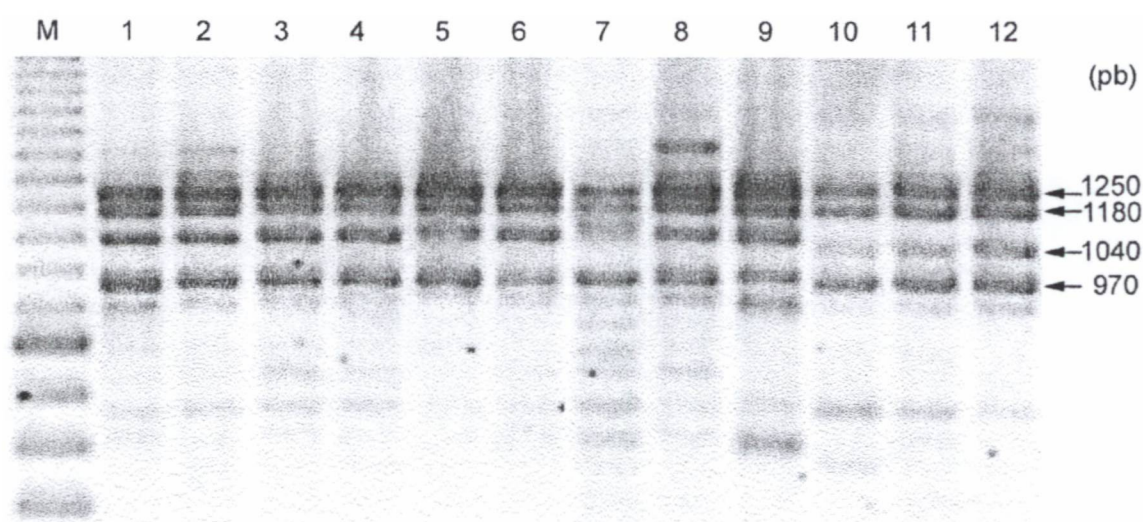


Figura 4.7 Padrão de fragmentos amplificados por PCR-RAPD de espécimes de *Atta* obtido com o primer OPA-10. (M) marcador 100 pb; (1-2) *A. sexdens piriventris*; (3-6) *A. sexdens rubropilosa*; (7-8) *A. sexdens sexdens*; (9) *A. opaciceps*; (10-12) *A. robusta*.

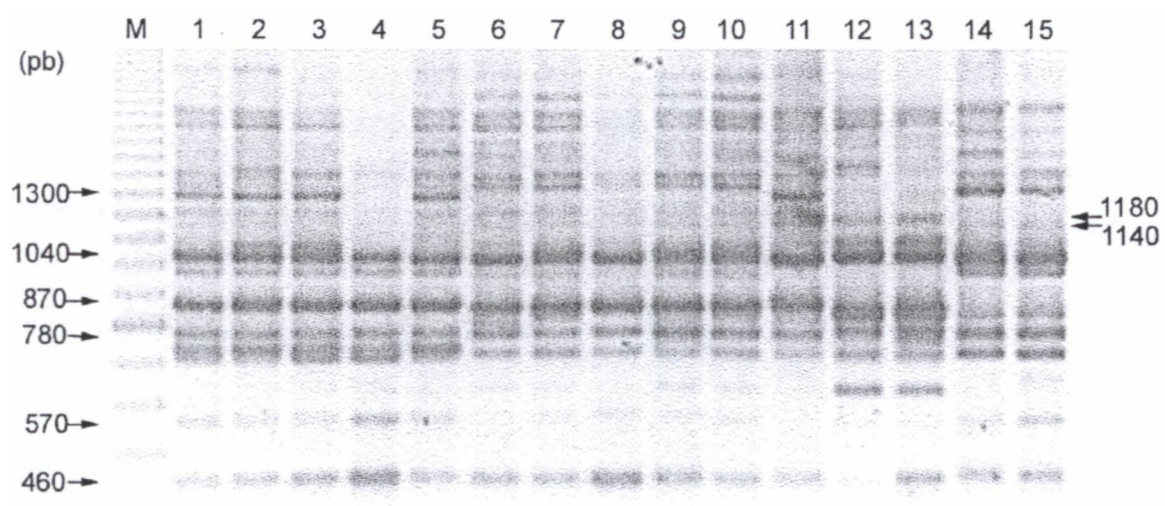


Figura 4.8 Padrão de fragmentos amplificados por PCR-RAPD de espécimes de *Atta* obtido com o primer OPB-17. (M) marcador 100 pb; (1; 2; 3; 5) *A. capiguara*; (4) *Atta* sp.; (6-10) *A. laevigata*; (11) *A. vollenweideri*; (12-13) *A. cephalotes*; (14-15) *A. bisphaerica*.

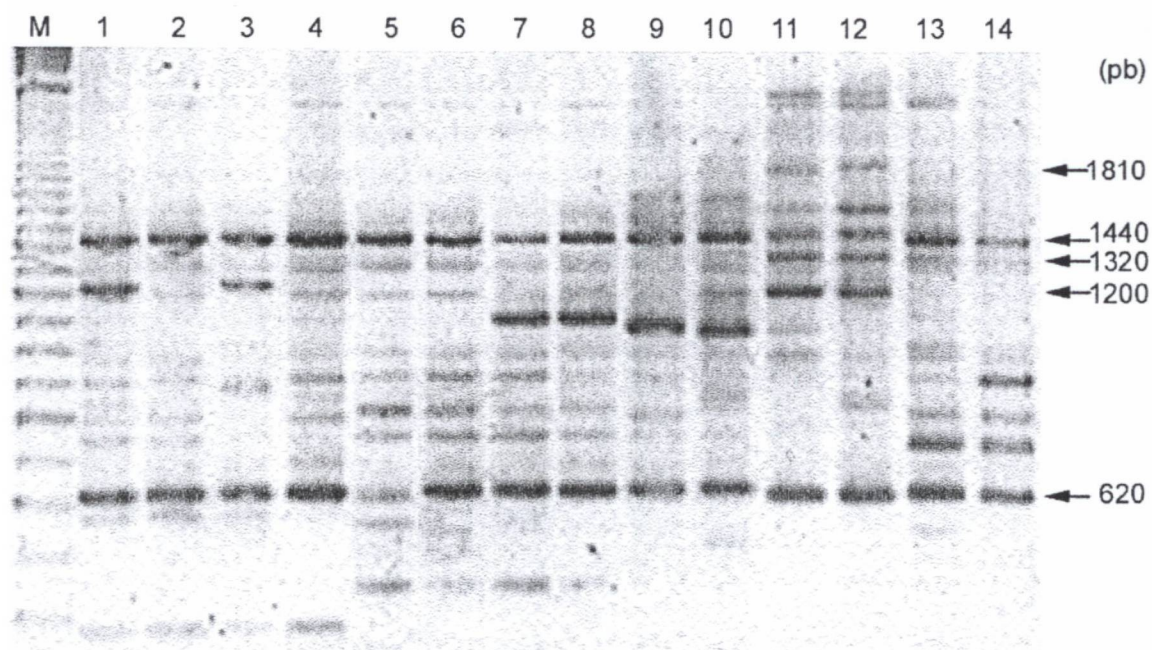


Figura 4.9 Padrão de fragmentos amplificados por PCR-RAPD de espécimes de *Atta* obtido com o primer OPB-04. (M) marcador 100 pb; (1) *Atta* sp.; (2-3) *A. capiguara*; (4-6) *A. laevigata*; (7) *A. vollenweideri*; (8-10) *A. robusta*; (11-12) *A. cephalotes*; (13-14) *A. bisphaerica*.

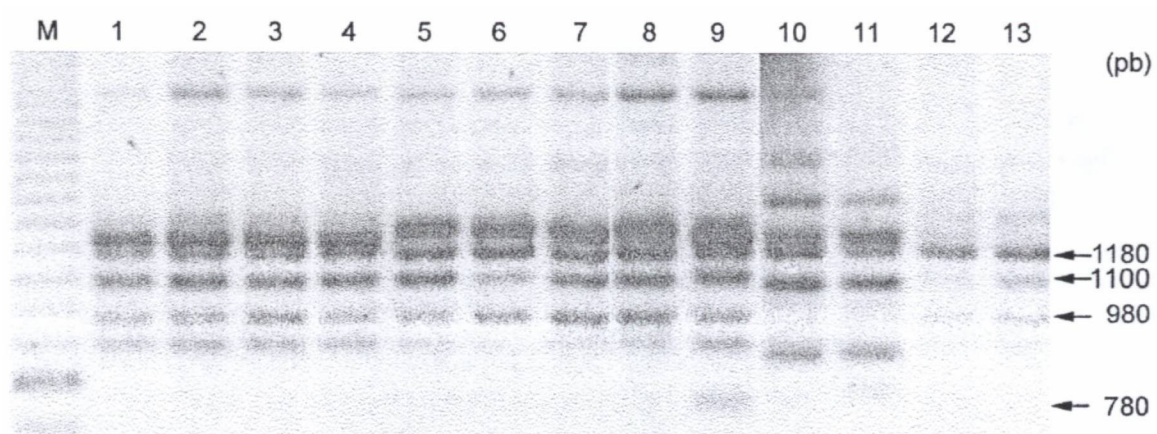


Figura 4.10 Padrão de fragmentos amplificados por PCR-RAPD de espécimes de *Attia* obtido com o primer OPA-10. (M) marcador 100 pb; (1-4) *A. capiguara*; (5-8) *A. laevigata*; (9) *A. vollenweideri*; (10-11) *A. cephalotes*; (12-13) *A. bisphaerica*.

polimórficos que permitem várias alternativas de uso dos mesmos para identificação das dez espécies/subespécies analisadas neste trabalho, a identificação das mesmas poderá ser realizada utilizando-se apenas os primers OPA-03, OPA-07 e OPA-10.

4.4 Conclusões

Os resultados deste trabalho mostraram que PCR-RAPD pode ser usada tanto para analisar a variabilidade genética entre as espécies e subespécies do gênero *Atta*, como também para a identificação das mesmas. A técnica representa uma valiosa ferramenta em estudos taxonômicos, particularmente com espécimes difíceis de serem identificadas ao nível de espécie, subespécie ou espécies crípticas, através de caracteres morfológicos.

Os resultados alcançados, embora sejam os primeiros obtidos dentro do gênero *Atta* empregando-se as técnicas de marcadores moleculares e tenham atingido plenamente os objetivos propostos neste trabalho, indicam a necessidade de sua continuidade para que diversos pontos de dúvidas possam ser esclarecidos. Na sua continuidade, *A. goiana* Gonçalves, 1942 e as espécies que não ocorrem no Brasil (*A. colombica* Guérin, 1845; *A. mexicana* (F. Smith, 1858); *A. texana* (Buckely, 1860); *A. insularis* Guérin, 1845 e *A. saltensis* Forel, 1913) deverão ser incorporadas às análises.

Capítulo 5

PCR-RFLP DA REGIÃO ITS (INTERNAL TRANSCRIBED SPACERS) DO DNA RIBOSSÔMICO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *ATTA*

5.1 Introdução

As saúvas constituem um grupo de insetos dos mais complexos e avançados do ponto de vista evolucionário. Sua classificação foi por muito tempo baseada nos caracteres das operárias e dos soldados das suas espécies, mas como estes caracteres são muito variáveis, a distinção das espécies deste gênero só pode ser feita com segurança com o auxílio de genitália masculina. Emery (1913), apesar de conhecer apenas os machos de poucas espécies, tinha claro que a genitália é um caráter que permite estabelecer a formação de grupos entre as espécies. Além de esclarecerem a sistemática, esses caracteres podem servir ainda para mostrar a linha de evolução de suas espécies, o que não é possível conseguir com os das operárias (Gonçalves, 1986).

Devido à variabilidade de seus caracteres, a classificação das espécies em grupos ou em subgêneros sofreu diversas alterações ao longo do tempo. Assim, Emery (1922) reuniu todas as espécies, com suas subespécies e variedades, em apenas três grupos: I) Grupo *Cephalotes*, compreendido pelas espécies *A. cephalotes* e *A. colombica*; II) Grupo *Insularis*, pela espécie e subespécies *A. insularis*, *A. insularis mexicana* e *A. insularis texana*; III) Grupo *Sexdens*, pelas

espécies *A. laevigata*, *A. laevigata vollenweideri*, *A. laevigata vollenweideri* var. *saltensis*, *A. sexdens*, *A. sexdens* var. *bisphaerica* e *A. sexdens* var. *rubropilosa*.

Através da análise da genitália masculina, Gonçalves (1942), além de verificar que a filogenia das espécies de *Atta* poderia ser estudada através desse órgão, dividiu as diversas forma do gênero em três grupos naturais muito bem definidos (*Neoatta*, *Archeatta* e *Atta*) e os considerou subgêneros, correspondendo exatamente aos “grupos” de espécies propostos por Emery (1922). O subgênero *Archeatta*, o mais primitivo do gênero e que parece ter dado origem aos outros dois subgêneros, corresponde ao “Grupo *Insularis*” de Emery (1922) e compreende as espécies: *Atta (Archeatta) mexicana* F. Smith, 1858, *Atta (Archeatta) insularis* Guérin, 1844 e *Atta (Archeatta) texana* Buckley, 1860. O subgênero *Atta*, que corresponde ao “Grupo *Cephalotes*” de Emery (1922), compreende as espécies *Atta (Atta) cephalotes* (L., 1758), *Atta (Atta) lutea* Forel, 1893 e *Atta (Atta) colombica* Guérin, 1844 e suas respectivas subespécies. O subgênero *Neoatta*, o mais especializado dos três e que corresponde ao “Grupo *Sexdens*” de Emery (1922), é compreendido pelas espécies *Atta (Neoatta) bisphaerica* Forel, 1908, *Atta (Neoatta) goiana* Gonçalves, 1942, *Atta (Neotta) robusta* Borgmeier, 1939, *Atta (Neoatta) vollenweideri* Forel, 1893 e *Atta (Neoatta) laevigata* (F. Smith, 1858) e suas respectivas subespécies.

Através da comparação minuciosa genitália masculina de quase todas as espécies e subespécies do gênero *Atta*, Borgmeier (1950) incluiu dois novos subgêneros, totalizando desta forma cinco subgêneros, como se seguem com suas respectivas espécies:

I. Subgênero *Palaeatta*, n. subg.

1. *A. bisphaerica* Forel, 1908
2. *A. goiana* Gonçalves, 1942

II. Subgênero *Epiatta*, n. subg.

3. *A. robusta* Borgmeier, 1939
4. *A. laevigata* Fred. Smith, 1858
5. *A. laevigata venezuelensis* Gonçalves, 1942
6. *A. opaciceps* Borgmeier, 1939
7. *A. vollenweideri* Forel, 1893
8. *A. vollenweideri polita* Emery, 1905
9. *A. vollenweideri saltensis* Forel, 1913
10. *A. vollenweideri obscurata* Gallardo, 1916
11. *A. vollenweideri lizeri* Santschi, 1922
12. *A. capiguara* Gonçalves, 1944

III. Subgênero *Neoatta* Gonçalves

13. *A. sexdens* Linnaeus, 1758
14. *A. sexdens rubropilosa* Forel, 1908
15. *A. sexdens piriventris* Santschi, 1919

16. *A. sexdens tristis* Santschi, 1919

17. *A. sexdens fuscata* Santschi, 1922

18. *A. sexdens autorii*, n. subsp.

IV. Subg. *Atta* s. str.

19. *A. cephalotes* Linnaeus, 1758
20. *A. cephalotes opaca* Forel, 1904
21. *A. cephalotes integrior* Forel, 1904
22. *A. cephalotes erecta* Santschi, 1929
23. *A. cephalotes isthmicola* Weber, 1941
24. *A. cephalotes oaxaquensis* Gonçalves, 1942
25. *A. colombica* Guérin, 1845
26. *A. colombica tonsipes* Santschi, 1929
27. *A. lutea* Forel, 1893

V. Subgênero *Archeatta* Gonçalves

28. *A. insularis* Guérin, 1945
29. *A. mexicana* Fred. Smith, 1858
30. *A. texana* Buckley, 1860

Quanto à filogenia do gênero, segundo Borgmeier (1950), de acordo com as ságitas, as espécies do subgênero *Palaeatta* são as mais primitivas, tendo originado as do subgênero *Epiatta*, e desse as do subgênero *Neoatta*. Quanto aos subgênero *Atta* e *Archeatta*, diz: “pela formação do aparelho genital masculino,

ocupam um lugar tão isolado que se poderia até pensar numa separação genérica dos demais subgêneros”.

Reverendo a classificação anteriormente por ele proposta, Borgmeier (1959) considerou o subgênero *Epiatta* sinônimo de *Neoatta*, uma vez que as ságitas eram homólogas. As seis espécies (*sexdens*, *vollenweideri*, *capiguara*, *laevigata*, *opaciceps* e *robusta*), segundo as ságitas, podiam representar uma série ortogenética de adaptação, indo da *robusta* até *sexdens*. Dessa forma validou apenas quatro subgêneros.

Nesta revisão cancelou, também, todos os nomes subespecíficos do gênero *Atta*, validando apenas 14 espécies conforme indicadas a seguir:

- | | |
|--|---------------------------------------|
| I. Subgênero <i>Atta</i> s. str. | 7. <i>A. laevigata</i> (Fr. Smith) |
| 1. <i>A. cephalotes</i> (L.) | 8. <i>A. opaciceps</i> Borgm. |
| 2. <i>A. colombica</i> Guérin | 9. <i>A. robusta</i> Borgm. |
| II. Subgênero <i>Archeatta</i> Gonçalves | 10. <i>A. capiguara</i> Gonçalves |
| 3. <i>A. insularis</i> Guérin | 11. <i>A. vollenweideri</i> For. |
| 4. <i>A. texana</i> (Buckley) | IV. Subgênero <i>Palaeatta</i> Borgm. |
| 5. <i>A. mexicana</i> (Fr. Smith) | 12. <i>A. bisphaerica</i> For. |
| III. Subgênero <i>Neoatta</i> Gonçalves | 13. <i>A. goiana</i> Gonçalves |
| 6. <i>A. sexdens</i> (L.) | 14. <i>A. saltensis</i> For. |

A constituição dos subgêneros somente foi alterada com a inclusão de uma nova espécie descrita por Gonçalves (1982), denominada *Atta (Neoatta) silvai*.

Quanto à ordem de especiação defendida por Borgmeier (1950), Gonçalves (1986) discorda, uma vez que considera o subgênero *Atta* o mais primitivo e o

mais próximo desse, *Archeatta*, tendo, para tal conclusão, se baseado no estudo de todas as peças da genitália masculina.

Embora subgêneros sejam nomenclaturas facultativas, ficando para cada um a liberdade de fazer uso ou não, eles são taxonomicamente uma necessidade em todos os momentos onde formações naturais de grupos dentro de um gênero tornam-se visíveis, como é o caso do gênero *Atta* (Borgmeier, 1959).

Em estudos com marcadores moleculares para separar grupos de espécies e biótipos, e também para análises filogenéticas de espécies estreitamente relacionadas ou não, o DNA ribossômico (rDNA) tem sido amplamente empregado. Os DNAs ribossômicos de eucariotos apresentam-se repetidos sucessivamente em série. Cada unidade repetida consiste de genes que codificam para RNA ribossômico denominados 18S, 5.8S e 28S rRNAs, dois espaçadores internos transcritos (ITS1 e ITS2 – Internal Transcribed Spacers) (Fig. 5.1) que separam cada região codificada, e um espaçador externo transcrito (ETS – External Transcribed Spacers) junto ao final 5' do gene 18S (Hillis & Dixon, 1991). As unidades repetidas são separadas por um espaçador intergênico (IGS – Intergenic Spacer). As unidades do rDNA têm seqüências de componentes que evoluem a diferentes taxas e podem ser usadas para estudos sistemáticos em diferentes níveis taxonômicos. As regiões codificadas evoluem lentamente e são altamente conservadas entre diferentes espécies e gênero (Turbeville *et al.*, 1991). Esta pode ser usada para comparar organismos geneticamente distantes. As

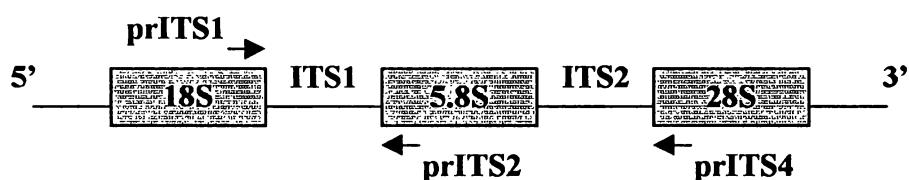


Figura 5.1 Estrutura do "cluster" gênico do rDNA mostrando as regiões ITS1 e ITS2 (Internal transcribed spacer). As seqüências amplificadas neste trabalho encontram-se entre os sítios de anelamento dos primers ITS1 e ITS4. 18S: seqüência do rDNA 18S ; 5.8S: seqüência do rDNA 5.8S; 28S: seqüência do rDNA 28S.

regiões espaçadoras (ITS e IGS) evoluem rapidamente e podem ser usadas para comparar espécies, subespécies ou populações intimamente relacionadas (Collins & Pasckewitz, 1996; Pasckewitz *et al.* 1993; Honda *et al.* 1998).

A amplificação da região ITS do DNA ribossômico através da técnica PCR (polymerase chain reaction) pode muitas vezes não detectar polimorfismo e apresentar apenas bandas monomórficas. De acordo com Ferreira & Grattapaglia (1996), bandas monomórficas têm o mesmo tamanho em pares de bases e as mesmas seqüências nas extremidades onde o primer iniciou a amplificação. Entretanto, pode ocorrer polimorfismo de restrição em virtude de substituição de nucleotídeos na seqüência. Em função disso são utilizadas enzimas de restrição para se detectarem polimorfismos em segmentos amplificados que mostram monomorfismo.

O DNA ribossômico tem sido amplamente utilizado em trabalhos voltados à distinção de populações, complexos de espécies e em análises filogenéticas de plantas, bactérias, fungos, nematóides e de diversas espécies de insetos, tais como *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae), *Orius* (Hemiptera: Anthocoridae), *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae), *Melanoplus* (Orthoptera: Acrididae) (Sappal *et al.*, 1995; Honda *et al.*, 1998; Schlötterer *et al.*, 1994; Kuperus & Chapeco, 1994).

Este trabalho teve por objetivo comprovar por meio da análise da região ITS, a formação de grupos "subgêneros" dentro do gênero *Atta*, conforme classificação atual feita com base no aparelho genital masculino, e validar/confirmar as relações genéticas entre espécies de *Atta* obtidas com o uso da técnica de PCR-RAPD.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Espécies

As amostras de saúvas utilizadas, totalizando oito espécies e duas subespécies, foram coletadas em populações naturais, acondicionadas em frascos contendo etanol 95% e mantidas à temperatura ambiente até o seu recebimento no laboratório, onde foram armazenadas em etanol 95% a -20°C. Os espécimes foram identificados pelos professores Dr. Francisco de Assis Menezes Mariconi (USP/Piracicaba-SP) e Dr. Luiz Carlos Forti (UNESP/Botucatu-SP) (Tabela 5.1).

5.2.2 Extração de DNA

O DNA foi extraído individualmente apenas da cabeça de três operárias máximas de cada espécie, por meio de homogeneização em tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, contendo 200 µl do tampão de extração [200 mM Tris-HCl (pH 8,0), 2 M NaCl e 70 mM EDTA]. Em seguida adicionaram-se 50 µl de sarcosyl 5% e homogeneizado novamente. Após 30 min de incubação a 65°C, o material foi centrifugado durante 15 min a 10000 g e o sobrenadante transferido para um novo tubo. O DNA foi precipitado com a adição de 110 µl de acetato de amônia e 250 µl de isopropanol gelado e mantido em geladeira durante a noite. Após centrifugação (15 min a 10000 g), o "pellet" foi lavado duas vezes com 300 µl de etanol 70% gelado e deixado secar à temperatura ambiente. O DNA foi ressuspenso em 50 µl de TE buffer com RNase a 10 µg/ml e armazenado a -20°C.

Tabela 5.1 Espécies, subgêneros e local de origem das amostras de *Atta* analisadas por meio de PCR-RFLP.

Espécies	Subgêneros ¹	Origem
<i>A. sexdens piriventris</i>	<i>Neoatta</i>	Porto Alegre (RS)/Brasil
<i>A. sexdens rubropilosa</i>	<i>Neoatta</i>	Lavras (MG)/Brasil
<i>A. sexdens sexdens</i>	<i>Neoatta</i>	Cuiabá (MT)/Brasil
<i>A. opaciceps</i>	<i>Neoatta</i>	Solânea (PB)/Brasil
<i>A. robusta</i>	<i>Neoatta</i>	Guarapari (ES)/Brasil
<i>A. capiguara</i>	<i>Neoatta</i>	Guairaçá (PR)/Brasil
<i>A. laevigata</i>	<i>Neoatta</i>	Lavras (MG)/Brasil
<i>A. vollenweideri</i>	<i>Neoatta</i>	Monte Caceros/Argentina
<i>A. cephalotes</i>	<i>Atta</i>	Ilhéus (BA)/Brasil
<i>A. bisphaerica</i>	<i>Palaeatta</i>	Avaré (SP)/Brasil

¹ De acordo com Borgmeier (1950).

5.2.3 PCR (Reação da Polimerase em Cadeia)

As reações de PCR foram conduzidas em tubo de microcentrífuga de 0,5 ml em volume total de 50 μ l, contendo 100 μ M de cada dATP, dCTP, dGTP e dTTP, 0,5 μ M de cada primer, 50 ng de DNA, 1,25 U de *Taq* polimerase, 0,05% de BSA (Albumina de Soro Bovino) e tampão (10 mM Tris-HCl, 3 mM MgCl₂ e 50 mM KCl, pH 8,3). As amplificações foram realizadas no termociclador PTC-100™ (MJ Research, Inc.), utilizando o seguinte programa de amplificação: 3 min a 95°C, seguido de 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 55°C e 2 min a 72°C, com extensão final de 5 min a 72°C. A sequência dos primers usados para amplificar as regiões ITS1 e ITS1 + ITS2 do rDNA são apresentadas na Tabela 5.2. O produto das amplificações foi analisado em gel de agarose 2,0% em tampão TBE 0,5X e visualizado com EtBr 0,05%. O gel foi fotografado e analisado com o sistema Kodak EDAS 120.

5.2.4 Análise de Restrição dos Produtos de PCR

Foram utilizadas as enzimas de restrição de seis pares de bases: *Bgl*II, *Eco*RI, *Pst*I, *Sma*I, *Sph*I e as de quatro pares de bases: *Rsa*I, *Hae*III e *Taq*I para clivar os fragmentos obtidos nas amplificações da região ITS. A digestão foi conduzida em tubo de microcentrífuga de 0,5 ml em um volume total de 20 μ l, contendo 10 μ l da reação de PCR, enzima de restrição (quantidade de acordo com as especificações do fabricante) e 1X tampão, incubando-se por duas horas a 37°C (ou 65°C para *Taq*I). O resultado da digestão foi analisado utilizando-se 10 μ l

Tabela 5.2 Seqüência dos diferentes primers utilizados nas análises da região ITS.

Primer	Seqüência
ITS1	5' -dTCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS2	5' -dGCTGCGTTCTTCATCGATGC
ITS4	5' -dTCCTCCGCTTATTGATATGC

da digestão em gel de agarose 2,0% (TBE 0,5X) e corado com EtBr 0,05%. O gel foi analisado com o sistema Kodak EDAS 120.

5.3 Resultados e Discussão

A região ITS de todas as espécies e subespécies de *Atta* foi amplificada com sucesso, usando os primers ITS1+ITS2 e ITS1+ITS4. Os fragmentos amplificados da região ITS do rDNA das espécies de *Atta* analisadas apresentaram-se do mesmo tamanho: cerca de 830 pb na região ITS1 (Fig. 5.2) e 1430 pb na região ITS1 + ITS2 (Fig. 5.3), significando que não há variação entre as espécies estudadas, para este nível de resolução. Resultados semelhantes foram encontrados por Baur *et al.* (1996), ao analisar a região ITS1 de diversas espécies de *Leptothorax* (Hymenoptera: Formicinae: Leptothoracini).

Entretanto, variações no tamanho dos fragmentos amplificados de rDNA de insetos têm sido relatadas em *Trichogramma* (Hymenoptera), *Culex* (Diptera), *Orius* (Hemiptera), tanto na região ITS1 como na região ITS2 (Sappal *et al.*, 1994; Debrunner, 1996; Honda *et al.*, 1998). Essas variações também têm sido encontradas em outros organismos, tais como plantas, fungos e nematóides (Persson *et al.*, 1996; Petersen *et al.*, 1997; Sttapien *et al.*, 1998; Fungaro, 2000).

Das enzimas de restrição utilizadas, apenas *TaqI* e *HaeIII* clivaram os fragmentos amplificados da região ITS do rDNA. Não foi detectado nenhum sítio de restrição para as enzimas *BglII*, *EcoRI*, *PstI*, *SmaI*, *RsaI* e *SphI* nas regiões ITS1 e ITS2 (dados não apresentados). A enzima *TaqI* clivou a região ITS1 em

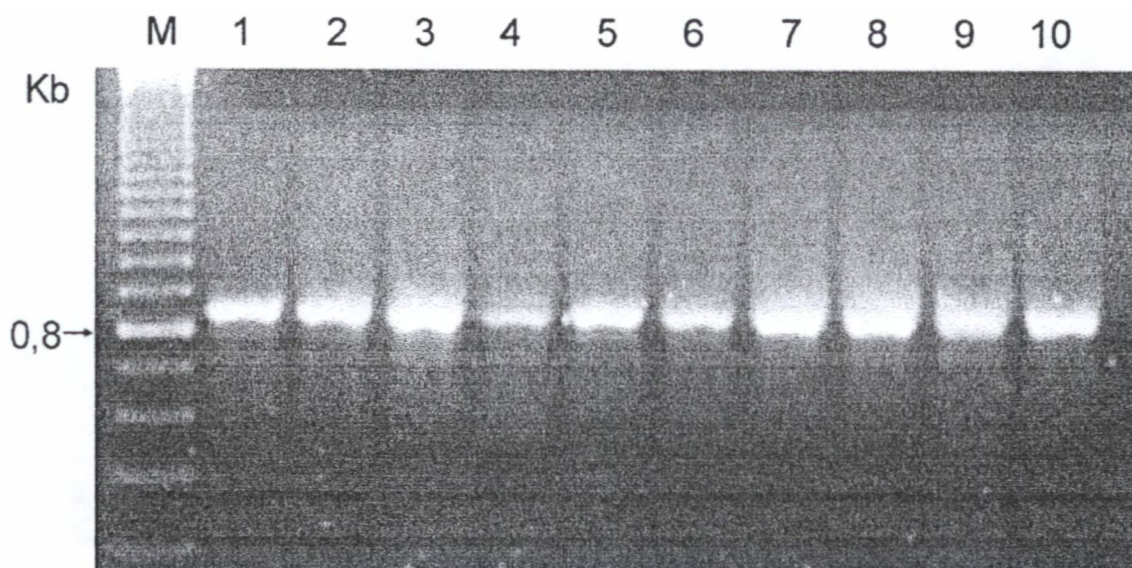


Figura 5.2 Produtos da amplificação da região ITS1 do rDNA de diferentes espécies de *Atta*, com os primers ITS1 e ITS2. (M) marcador 100 pb; (1) *A. sexdens piriventris*; (2) *A. sexdens rubropilosa*; (3) *A. sexdens sexdens*; (4) *A. opaciceps*; (5) *A. robusta*; (6) *A. capiguara*; (7) *A. laevigata*; (8) *A. vollenweideri*; (9) *A. cephalotes*; (10) *A. bisphaerica*.

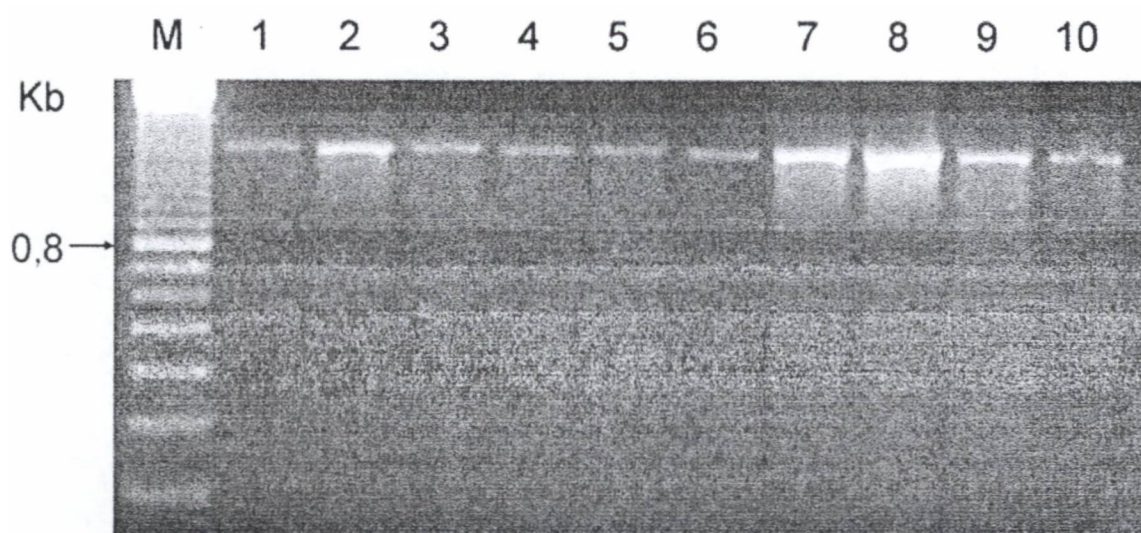


Figura 5.3 Produtos da amplificação das regiões ITS1 + ITS2 do rDNA de diferentes espécies de *Atta*, com os primers ITS1 e ITS4. (M) marcador 100 pb. (1) *A. sexdens piriventris*; (2) *A. sexdens rubropilosa*; (3) *A. sexdens sexdens*; (4) *A. opaciceps*; (5) *A. robusta*; (6) *A. capiguara*; (7) *A. laevigata*; (8) *A. vollenweideri*; (9) *A. cephalotes*; (10) *A. bisphaerica*.

três sítios de restrição, estimados em 430, 220 e 120 pb, que foram comuns a todas as espécies de *Atta*, não diferenciando, portanto, nenhuma espécie. A diferença de tamanho verificada entre a soma desses fragmentos e o fragmento intacto deve-se, provavelmente, à existência de um ou mais sítios de restrição presentes nessa região, resultando em fragmentos menores de 100 pb, os quais não são discriminados em gel de agarose a 2%.

A região ITS1, quando clivada pela *HaeIII* (Fig. 5.4) apresentou diferentes padrões de restrição, permitindo separar as espécies em três grupos: Grupo I: *A. sexdens piriventris*, *A. sexdens rubropilosa*, *A. sexdens sexdens*, *A. opaciceps*, *A. robusta*, *A. capiguara*, *A. laevigata* e *A. vollenweideri*; Grupo II: *A. cephalotes* e Grupo III: *A. bisphaerica*.

As regiões ITS1 + ITS2 cortadas pela *TaqI* apresentaram dois padrões de bandas (Fig. 5.5 e Tabela 5.3), que permitiram distribuir as espécies em dois grupos: Grupo I: *A. sexdens piriventris*, *A. sexdens rubropilosa*, *A. sexdens sexdens*, *A. robusta* e *A. cephalotes*; Grupo II: *A. opaciceps*, *A. capiguara*, *A. laevigata*, *A. vollenweideri* e *A. bisphaerica*. Estas mesmas regiões, quando cortadas pela *HaeIII* (Fig. 5.6 e Tabela 5.3), não apresentaram novos sítios de restrição com relação àqueles observados quando se utilizou essa mesma enzima para cortar a região ITS1, não alterando, portanto, a classificação das espécies dentro dos grupos observados naquele caso.

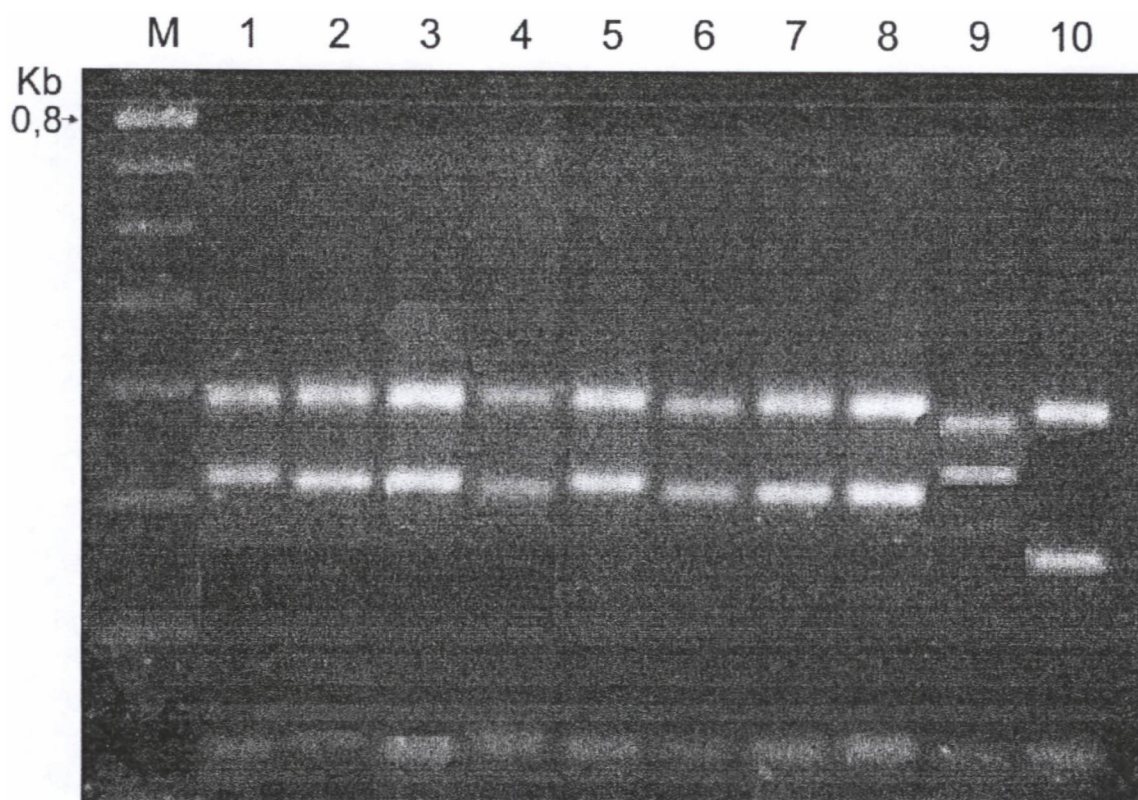


Figura 5.4 Padrão de restrição da região ITS1 do rDNA de espécies de *Atta* obtido após digestão com a enzima *HaeIII*. (M) marcador 100 pb; (1) *A. sexdens piriventris*; (2) *A. sexdens rubropilosa*; (3) *A. sexdens sexdens*; (4) *A. opaciceps*; (5) *A. robusta*; (6) *A. capiguara*; (7) *A. laevigata*; (8) *A. vollenweideri*; (9) *A. cephalotes*; (10) *A. bisphaerica*.

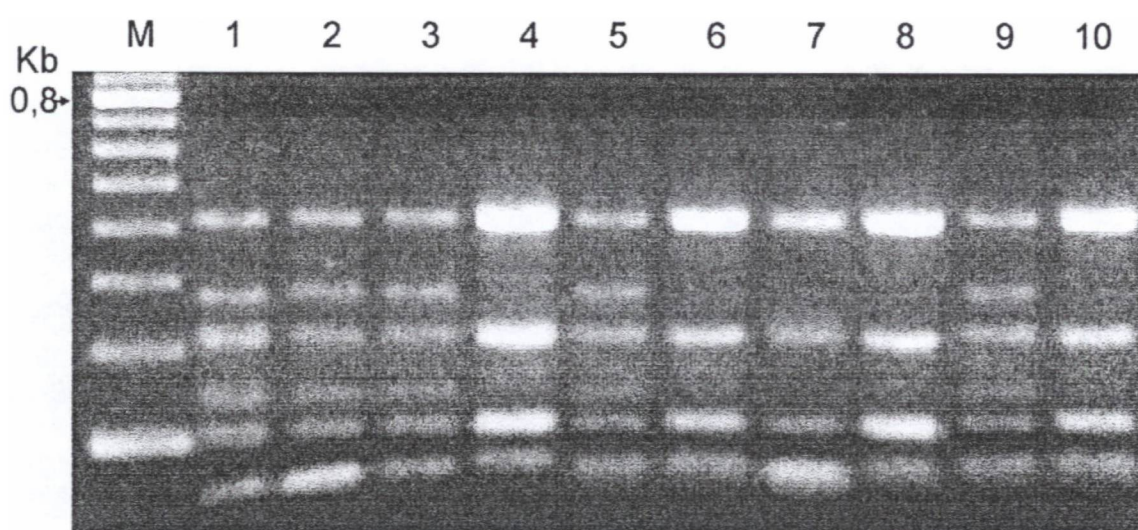


Figura 5.5 Padrão de restrição da região ITS do rDNA de espécie de *Atta* obtido após digestão com a enzima *TaqI*. (M) marcador 100 pb; (1) *A. sexdens piriventris*; (2) *A. sexdens rubropilosa*; (3) *A. sexdens sexdens*; (4) *A. opaciceps*; (5) *A. robusta*; (6) *A. capiguara*; (7) *A. laevigata*; (8) *A. vollenweideri*; (9) *A. cephalotes*; (10) *A. bisphaerica*.

Tabela 5.3 Tamanho estimado dos fragmentos (pb) da região ITS do rDNA amplificado via PCR, clivado com as enzimas *HaeIII* e *TaqI*.

Espécies	Enzimas de restrição								
	<i>HaeIII</i>			<i>TaqI</i>					
	Região			Região					
	ITS1		ITS2	ITS1			ITS2		
<i>A. sexdens piriventris</i>	390	320	710	430	220	120	280	140	80
<i>A. sexdens rubropilosa</i>	390	320	710	430	220	120	280	140	80
<i>A. sexdens sexdens</i>	390	320	710	430	220	120	280	140	80
<i>A. opaciceps</i>	390	320	710	430	220	120	-	-	80
<i>A. robusta</i>	390	320	710	430	220	120	280	140	80
<i>A. capiguara</i>	390	320	710	430	220	120	-	-	80
<i>A. laevigata</i>	390	320	710	430	220	120	-	-	80
<i>A. vollenweideri</i>	390	320	710	430	220	120	-	-	80
<i>A. cephalotes</i>	370	330	710	430	220	120	280	140	80
<i>A. bisphaerica</i>	390	280	710	430	220	120	-	-	80

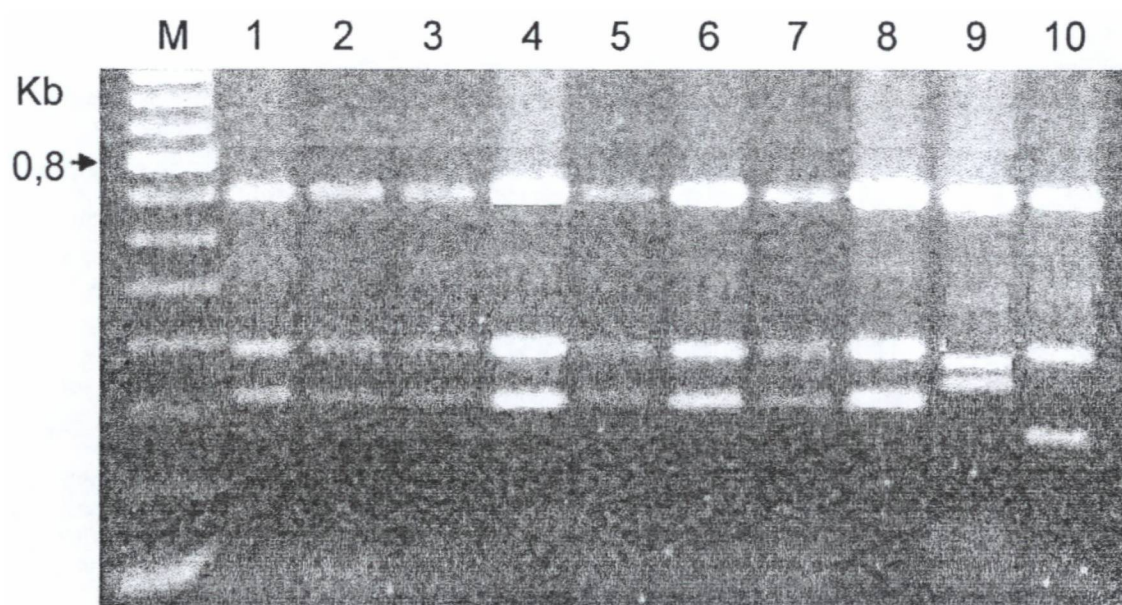


Figura 5.6. Padrão de restrição da região ITS1 + ITS 2 do rDNA de espécies de *Atta* obtido após digestão com a enzima *HaeIII*. (M) marcador 100 pb; (1) *A. sexdens sexdens*; (2) *A. sexdens rubropilosa*; (3) *A. sexdens piriventris*; (4) *A. opaciceps*; (5) *A. robusta*; (6) *A. capiguara*; (7) *A. laevigata*; (8) *A. vollenweideri*; (9) *A. cephalotes*; (10) *A. bisphaerica*.

Usando a enzima *HaeIII* para cortar o rDNA amplificado da região ITS1, região compreendida entre os primers 1 e 2, é possível diferenciar três grupos de espécies, que correspondem exatamente aos subgêneros propostos por Borgmeier (1959), ou seja, o Grupo I (*A. sexdens piriventris*, *A. sexdens rubropilosa*, *A. sexdens sexdens*, *A. opaciceps*, *A. robusta*, *A. capiguara*, *A. laevigata* e *A. vollenweideri*), corresponde ao subgênero *Neoatta*; o Grupo II (*A. cephalotes*), ao subgênero *Atta*; e o Grupo III (*A. bisphaerica*), ao subgênero *Palaeatta*. Além disso, os resultados demonstram que, através dessa enzima, as espécies *A. cephalotes* e *A. bisphaerica* podem ser facilmente diferenciadas das demais estudadas neste trabalho.

Quando se utilizou a enzima *TaqI* para cortar o rDNA amplificado da região ITS 1+2, foi possível diferenciar apenas dois grupos conforme anteriormente citados. No Grupo I, com exceção de *A. cephalotes* que pertence ao subgênero *Atta*, as demais espécies desse grupo são *Neoatta* (Borgmeier, 1959). O fato de *A. robusta* ter permanecido nesse grupo, juntamente com as *sexdens*, nos remete ao histórico dessa espécie. Inicialmente, Borgmeier (1939) havia classificado essa espécie como subespécie: *A. sexdens robusta*. Gonçalves (1942), ao instituir os subgêneros *Atta*, *Archeatta* e *Neoatta*, elevou essa subespécie à categoria de espécie e classificou-a como *Neoatta*, juntamente com as espécies *A. sexdens*, *A. bisphaerica*, *A. goiana*, *A. vollenweideri*, *A. laevigata*, *A. bisphaerica opaciceps* e *A. laevigata saltensis*. Borgmeier (1950), ao revisar o gênero *Atta*, descreveu dois novos subgêneros, *Epiatta* e *Palaeatta*, classificando *A. robusta* no subgênero *Epiatta*, juntamente com *A. laevigata*, *A. opaciceps*, *A. vollenweideri* e *A. capiguara*, deixando apenas *A. sexdens* como *Neoatta*. Ao reconhecer que

Epiatta era sinônimo de *Neoatta*, Borgmeier (1959), agrupou todas essas espécies no subgênero *Neoatta*, como já o fizera Gonçalves (1942). Com base nos resultados obtidos com a análise das regiões ITS, agrupando *A. robusta* com *A. sexdens*, acreditamos que Borgmeier (1950) cometeu um engano ao aceitar a classificação de Gonçalves (1942), classificando *A. robusta* como *Epiatta* e não como *Neotta*, juntamente com a *A. sexdens*, uma vez que havia, inicialmente, classificado-a como subespécie de *sexdens*.

Ainda no Grupo I, encontra-se *A. cephalotes*, uma espécie que, segundo Gonçalves (1986), juntamente com *A. colombica*, constituem as espécies mais primitivas do gênero *Atta*. Assim, a presença dessa espécie nesse grupo, juntamente com *A. robusta* e as demais *sexdens*, nos leva supor que essas espécies estariam mais próximas filogeneticamente de *A. cephalotes*. No Grupo II, com exceção de *A. bisphaerica* que pertence ao subgênero *Palaeatta*, as demais espécies são *Neoatta* (Borgmeier, 1959). Admitindo que Borgmeier (1950) estava correto ao considerar o subgênero *Palaeatta* o mais primitivo do gênero *Atta*, nesse caso também podemos supor que, com exceção de *A. opaciceps*, as demais espécies do Grupo II derivaram de *A. bisphaerica*, como observado no dendograma do capítulo anterior.

Embora, neste trabalho, tenhamos referido apenas espécimes de *A. cephalotes* coletados no município de Ilhéus-Ba, foram também analisadas amostras de *A. cephalotes* procedentes de Caracas, Venezuela. O produto da amplificação da região ITS1 e 2 do rDNA desse material, quando digerido com as enzimas *TaqI* e *HaeIII*, mostrou variação no comprimento dos fragmentos com relação às demais espécies, inclusive *A. cephalotes* de Ilhéus-Ba. Fragmentos

diferentes dos obtidos com *A. cephalotes* de Ilhéus foram observados quando clivou-se o produto da amplificação do material de Caracas com as enzimas *HaeIII* e *TaqI* (dados não apresentados). Além dessas diferenças, quando operárias maiores (soldados) desses materiais foram comparadas morfológicamente, observaram-se diferenças marcantes. *A. cephalotes* de Caracas apresenta um denso tufo de pêlos frontais que se estende até a altura do vértice e até próximo às áreas fronto-laterais; sulco occipital não aprofundado na frente; enquanto que *A. cephalotes* de Ilhéus apresenta tufo de pêlos pouco denso, apenas no meio da frente; sulco occipital mais aprofundado e lobo cefálico menos espesso que a de Caracas. Embora se possa suspeitar de tratar-se de espécies diferentes, há necessidade de analisar outras amostras provenientes de Caracas, principalmente por haver suspeita de contaminação com fungos.

5.4 Conclusões

Este trabalho permitiu demonstrar que a região ITS pode ser útil para agrupar espécies de *Atta* dentro de subgêneros, assim como para identificação de algumas espécies.

Os dados obtidos com PCR-RFLP confirmam os agrupamentos obtidos com PCR-RAPD.

Este trabalho deverá ter continuidade, incluindo as demais espécies do gênero (*A. goiana*, *A. saltensis*, *A. insularis*, *A. colombica*, *A. texana* e *A. mexicana*) e, através da clonagem e sequenciamento de fragmentos da região ITS

do rDNA de cada espécie de *Atta* para poder fazer inferências filogenéticas dentro do gênero *Atta*.

CAPÍTULO 6

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As formigas do Gênero *Atta* já foram objeto de muitas pesquisas nas mais diversas áreas do conhecimento entomológico, no entanto, até o presente não haviam sido estudadas geneticamente por meio de técnicas moleculares.

Os objetivos deste trabalho foram analisar a variabilidade genética e identificar as espécies do gênero *Atta* por meio de marcadores moleculares. Além de os objetivos propostos terem sido alcançados, os resultados obtidos possibilitaram levantar novas hipóteses a serem estudadas em futuros trabalhos envolvendo as espécies desse gênero.

Assim, no experimento para comparar métodos de armazenamento de espécimes de *Atta*, visando posteriores análises de PCR-RAPD, observou-se que por um período de até sete meses o armazenamento pode ser feito em qualquer um dos sistemas avaliados. Espécimes armazenados em etanol 95% à temperatura ambiente, por períodos superiores a 210 dias, apresentam DNA de baixa qualidade para análises PCR-RAPD, o que pode levar a resultados não confiáveis. Para um período de até 12 meses, com exceção da preservação em etanol 95% à temperatura ambiente, o armazenamento deve ser efetuado preferencialmente a -70°C, em etanol 95% a -20°C ou em etanol 95% a 4°C. Quando a preservação a baixas temperaturas não for possível, ou quando o transporte do material em etanol não for permitido, a utilização de sílica gel ou da solução tampão são alternativas eficientes, uma vez que elas mantêm o DNA com qualidade satisfatória para as análises de PCR-RAPD, além de não conterem

substâncias de riscos. A realização desse estudo foi muito importante para a condução dos demais trabalhos, uma vez que a utilização de DNA extraído de espécimes armazenados inadequadamente poderia ter levado a falsas conclusões. Além disso, comparando-se os resultados aqui obtidos com os alcançados por outros autores, verifica-se que a extrapolação de métodos de armazenamento de uma espécie de inseto para outra, em muitos casos, não é viável, o que justifica a condução deste tipo de experimento para cada caso.

Considerando que um conjunto de condições de amplificação pode não ser adequado para todas as situações devido à complexidade de interações entre os componentes da reação de PCR, estabeleceram-se *a priori* as condições ótimas de reação para que os fragmentos amplificados de DNA de *Atta* pudessem ser reproduzíveis. Normalmente, para investigar a influência de diversos fatores sobre uma reação, dois métodos têm sido utilizados. O mais tradicional é aquele em que apenas um fator é testado a cada experimento, sendo os demais fatores fixados e trocados em sucessivos experimentos. O outro método, mais efetivo e mais eficiente, permite modificar diversos fatores a cada vez, possibilitando detectar a interação entre vários parâmetros. Nesse método utilizando-se os delineamentos Fatorial Fracionado (DFF) e o Central Composto (DCC), mesmo que o número de variáveis seja alto, pode-se obter resposta individual para cada fator, com um limitado número de experimentos. O uso desses delineamentos permitiu, de uma maneira fácil, rápida e econômica a otimização dos fatores para cada as reações de PCR-RAPD realizadas nos trabalhos subsequentes. Assim, as condições estabelecidas para as reações foram: 25 µl de solução contendo 10 mM Tris-HCl

(pH 9,0), 3,0 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 100 µM de cada dNTP, 0,2 µM de primer, 1,0 U de *Taq* polimerase, 25 ng DNA (extraído pelo método ME₂) e BSA 0,05%, utilizando-se o programa de amplificação P₂: 3 min a 94°C, 3 min a 35°C, 2 min a 72°C, seguidos de 40 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 36°C e 2 min a 72°C, com extensão final de 5 min a 72°C.

A análise da diversidade genética das espécies de *Atta* permitiu agrupá-las, em quase sua totalidade, dentro dos subgêneros estabelecidos por Borgmeier(1950). A separação das subespécies de *A. sexdens* em três núcleos distintos, evidenciada nessa análise, sustenta a classificação de Gonçalves (1963) que revalidou as três subespécies (*A. sexdens piriventris*, *A. sexdens rubropilosa* e *A. sexdens sexdens*), mas contraria Bolton (1995) que sinonimizou as três subespécies. Frente a esses resultados julgamos pertinente manter as três subespécies. Ainda com relação às subespécies de *A. sexdens*, dentro do núcleo das *A. sexdens sexdens*, a amostra de Mundo Novo-BA, por ter apresentado baixa similaridade genética com relação às demais amostras e por ter distribuição parapátrica com *A. sexdens rubropilosa*, no sul da Bahia, sugere a existência de um novo núcleo (nova subespécie) dentro desta espécie. Também, a baixa similaridade observada entre algumas amostras de *A. laevigata* mostra a necessidade de estudos mais aprofundados, para verificar a existência de novos táxons. Entre as amostras de *A. capiguara* analisadas, a de Nova Olímpia-PR, apesar de ser classificada por meio de características morfológicas como pertencente a esta espécie, provavelmente constitui novo táxon, tendo em vista

sua baixíssima similaridade genética com relação às demais amostras dessa e das outras espécies.

Além de possibilitar a análise da variabilidade genética entre as espécies e subespécies, a técnica PCR-RAPD permitiu a identificação das mesmas através da presença de fragmentos polimórficos, utilizados como caracteres distintos para cada espécie. Assim, a identificação das dez espécies/subespécies analisadas poderá ser feita utilizando-se apenas os primers OPA-03, OPA-07 e OPA-10. Pode-se concluir que essa técnica representa uma valiosa ferramenta em estudos genéticos e taxonômicos das espécies do gênero *Atta*.

A amplificação da região ITS (Internal Transcribed Spacer) do DNA ribossômico através da técnica PCR, utilizando-se os primers ITS1 e ITS2 e posteriormente clivando-se os segmentos amplificados com enzimas de restrição *HaeIII* e *TaqI*, permitiu que as espécies fossem agrupadas conforme os subgêneros estabelecidos por Borgmeier (1959), confirmando os agrupamentos obtidos por meio de PCR-RAPD. Através da amplificação dessa região é possível também identificar inequivocamente *A. bisphaerica* e *A. cephalotes*. As amostras de *A. cephalotes* oriundas de Caracas, Venezuela, e de Ilhéus-BA apresentaram variação no comprimento dos fragmentos de DNA, o que levou à suposição de tratar-se de espécies diferentes. Tal suposição é sustentada pelas marcantes diferenças morfológicas observadas entre as operárias maiores desses materiais. *A. cephalotes* de Caracas apresenta um denso tufo de pêlos frontais que se estende até a altura do vértice e até próximo às áreas fronto-laterais; sulco occipital não aprofundado na fronte; enquanto que *A. cephalotes* de Ilhéus apresenta tufo de pêlos pouco denso, apenas no meio da fronte; sulco occipital

mais aprofundado e lobo cefálico menos espesso que a de Caracas. Dado que existe suspeita de serem espécies diferentes, há necessidade de se analisar maior número de amostras provenientes destas localidades para elucidar a questão.

Os resultados alcançados são os primeiros obtidos dentro do gênero *Atta* empregando-se as técnicas de marcadores moleculares e atingiram plenamente os objetivos propostos neste trabalho. Ainda assim, eles indicam a necessidade da continuidade dos estudos, para que diversas dúvidas possam ser esclarecidas. Em continuidade, pretende-se clonar e seqüenciar fragmentos de DNA da região ITS das espécies, com o objetivo de estabelecer as relações filogenéticas dentro do gênero *Atta*, incorporando-se às análises a espécie *A. goiana* Gonçalves, 1942 e as espécies que não ocorrem no Brasil (*A. colombica* Guérin, 1845; *A. mexicana* (F. Smith, 1858); *A. texana* (Buckely, 1860); *A. insularis* Guérin, 1845 e *A. saltensis* Forel, 1913).

LITERATURA CITADA

- Aljanabi, S.M., M.S. Loiacono, R.T. Lourenço, M. Borges & M.S.Tigano. 1998. RAPD analysis revealing polymorphism in egg parasitoids of soybean stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* **27** (3): 413:420.
- Antolin, M.F., D.S. Guertin & J.J. Petersen. 1996. The origin of gregarious *Muscidifurax* (Hymenoptera: Pteromalidae) in North America: an analysis using molecular markers. *Biological Control* **6**: 76-82.
- Baur, A., M. Sanetra, N. Chalwatzis, A. Buschinger & F.K. Zimmermann. 1996. Sequence comparison of the internal transcribed spacer region of ribosomal genes support close relationships between parasitic ants and their respective host species (Hymenoptera: Formicidae). *Insectes Sociaux* **43**: 53-67.
- Bernal, M., M.I. Baquero-Mezence, F. Provost, F. Laurent, G. Martinez-Machin & P. Boiron. 1997. A one-step *Candida albicans* DNA extraction method using "Chelex® 100 Resin" suitable for DNA amplification (PCR). *Journal of Mycologie Medicale* **7** (1): 53-54.
- Black IV, W.C., N.M. Du Teau, G.J. Puterka, J.R. Nechols & J.M Pettorini. 1992. Use of the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction

(RAPD-PCR) to detect polymorphisms in aphids (Homoptera: Aphididae).

Bulletin of Entomological Research **82**: 151-159.

Boiteaux, L.S., M.E.N. Fonseca & P.W. Simon. 1999. Effects of plant tissue and DNA purification method on randomly amplified polymorphic DNA – based genetic fingerprinting analysis in carrot. *Journal of the American Society of Horticultural Science* **124** (1): 32-38.

Boleda, M.D., P. Briones, J. Ferrés, L. Tyfield & R. Pi. 1996. Experimental design: A useful tool for PCR optimization. *BioTechniques* **21**: 134-140.

Bolton, B. 1995. A new general catalogue of the ants of the world. Cambridge, Harvard University. 504 p.

Borgmeier, T. 1939. Nova contribuição para o conhecimento das formigas neotropicais (Hym. Formicidae). *Revista de Entomologia* **10** (2): 403-428.

Borgmeier, T. 1950. Estudos sobre *Atta* (Hym. Formicidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **48**: 239-263.

Borgmeier, T. 1959. Revision der Gattung *Atta* Fabricius (Hymenoptera, Formicidae). *Studia Entomologica* **2** (1-4): 321-390.

- Carvalho, A.O.R. & L.G.E. Vieira. 1999. Análise da variabilidade genética em *Atta laevigata* (Hymenoptera: Formicidae) por meio de PCR-RAPD. *Naturalia* **24** (n. esp.): 203-205.
- Carvalho, C.J.B. 1998. Taxonomistas de insetos, uma espécie em extinção no Brasil. *Informativo da Sociedade Entomológica do Brasil* **23** (1): 1 e 5.
- Cenis, J.L. 1994. Aplicacion de la tecnica RAPD-PCR (ADN polimorfico amplificado al azar) a la identificacion de insectos. *Investigacion Agraria Produccion Y Proteccion Vegetales* **9** (2):289-297.
- Cenis, J.L., P. Perez & A. Fereres. 1993. Identification of aphid (Homoptera: Aphididae) species and clones by random amplified polymorphic DNA. *Annals of the Entomological Society of America* **86** (5): 545-550.
- Chapco, W., N.W. Ashton, R.K.B. Martel & N. Antonishyn. 1992. A feasibility study of the use of random amplified polymorphic DNA in the population genetics and systematics of grasshoppers. *Genome* **35**: 569-574.
- Cheung, W.Y., N. Hubert & B.S. Landry. 1993 A simple and rapid DNA microextraction for plant, insect suitable for RAPD and other PCR analyses. *PCR Methods and Applications* **3**: 69-70.

- Cockburn, A.F. & G.A. Fritz. 1995. Isolation and purification of insect DNA. *Methods in Molecular Biology* **50**: 15-23.
- Cognato, A.L., S.O. Rogers & S.A. Teale. 1995. Species diagnosis and phylogeny of the *Ips grandicollis* group (Coleoptera: Scolytidae) using random amplified polymorphic DNA. *Annals of the Entomological Society of America* **85** (4): 397-405.
- Collins, F.H. & S.M. Paskewitz. 1996. A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. *Insect Molecular Biology* **5** (1): 1-9.
- De Barro, P.J. & F. Driver. 1997. Use of RAPD-PCR to distinguish the B biotype from other biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Australian Journal of Entomology* **36**: 149-152.
- Debrunner, B.A. 1996. Restriction analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer region of the *Culex restuans* and mosquitoes in the *Culex pipiens* complex. *Journal of the American Mosquito Control Association* **12** (3): 477-482.
- Delabie, J.H.C. 1997. Biogeografia das formigas cortadeiras (Hymenoptera; Formicidae; Myrmicinae; Attini) de importância econômica no leste da Bahia e nas regiões periféricas dos estados vizinhos. *Agrotrópica* **9** (2): 49-58.

- Delabie, J.H.C. 1998. *Atta silvai* Gonçalves, sinônimo júnior de *Atta laevigata* (Fred. Smith) (Hymenoptera, Formicidae, Attini). *Revista Brasileira de Entomologia* **41** (2-4): 339-341.
- Della Lucia, T.M.C. 1993. As formigas cortadeiras. Viçosa. Ed. Folha de Viçosa. 262 p.
- Demeke, T., R.P. Admas & R. Chibbar. 1992. Potential taxonomic use of random amplified polymorphic DNA (RAPD): A case study in *Brassica*. *Theoretical and Applied Genetics* **84**: 990-994.
- Dessauer, H.C., C.J. Cole & M.S. Hafner. 1990. Collection and storage of tissues, pp. 25-41. In: Hillis, D.M. & Moritz, C. (eds.) *Molecular Systematics*. Sinauer, Massachusetts.
- Deverno, L.L., G.A. Smith & K.J. Harrison. 1998. Randomly amplified polymorphic DNA evidence of introgression in two closely related sympatric species of coniferophagous *Choristoneura* (Lepidoptera: Tortricidae) in Atlantic Canada. *Annals of the Entomological Society of America* **91** (3): 248-259.
- Dillon, N., A.D. Austin & E. Bartowsky. 1996. Comparison of preservation techniques for DNA extraction from hymenopterous insects. *Insect Molecular Biology* **5** (1): 21-24.

- Dowdy, A.K. & W.H. McGaughey. 1996. Using random amplified polymorphic DNA to differentiate strains of the Indianmeal Moth (Lepidoptera: Pyralidae). *Environmental Entomology* **25** (2): 396-400.
- Doyle, J.J. & J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**: 13-15.
- Edwards, O.R. & M.A. Hoy. 1993. Polymorphism in two parasitoids detected using random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. *Biological Control* **3**: 243-257.
- Edwards, O.R. & M.A. Hoy. 1995. Monitoring laboratory and field biotypes of the walnut aphid parasite, *Trioxys pallidus*, in population cages using RAPD-PCR. *Biocontrol Science and Technology* **5**: 313-327.
- Emery, C. 1913. Études sur les Myrmicinae. *Annales de la Societe Entomologique* **57**: 250-262.
- Emery, C. 1922. Hymenoptera. Fam. Formicidae. Subfam. Myrmicinae. *Genera Insectorum* (174-B): 397 p.

- Ferreira, M.E. & D. Grattapaglia. 1996. Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética. 2 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 220 p. (EMBRAPA-CENARGEN Documento 20).
- Figueroa, C.C., J.C. Simon, J.F. Gallie & H.M. Niemeyer. 1999. Molecular markers to differentiate two morphologically-close species of the genus *Sitobion*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **92** (2): 217-225.
- Frey, J.E. & B. Frey. 1995. Molecular identification of six species of scale insects (*Quadraspidiotus* sp.) by RAPD-PCR: assessing the field-specificity of pheromone traps. *Molecular Ecology* **4**: 777-780.
- Fungaro, M.H.P. 2000. PCR na micologia. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* **III** (14): 12-16.
- Garner, K.J. & J.K. Slavicek. 1996. Identification and characterization of a RAPD-PCR marker for distinguishing Asian and North American gypsy moths. *Insect Molecular Biology* **5** (2): 81-91.
- Gonçalves, C.R. 1942. Contribuição para o conhecimento do gênero *Atta* Fabr., das formigas saúvas. *Boletim da Sociedade Brasileira de Agronomia* **5** (3): 333-358.

- Gonçalves, C.R. 1944. Descrição de uma nova saúva brasileira. *Revista Brasileira de Biologia* **4** (2): 233-2238.
- Gonçalves, C.R. 1963. Nota sobre a sistemática de *Atta sexdens* (L., 1758) e de suas sub-espécies. (Hym., Formicidae). *Boletim Fitossanitário IX* (1 e 2): 1-3.
- Gonçalves, C.R. 1982. *Atta silvai*, nova espécie de formiga saúva (Hymenoptera, Formicidae). *Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro* **5** (2):173-178.
- Gonçalves, C.R. 1986. Filogenia do gênero *Atta* Fabricius (Hymenoptera, Formicidae). *Publicações Avulsas do Museu Nacional do Rio de Janeiro* **65**: 13-17.
- Graham, G.C., P. Mayers & R.T. Henry. 1994. A simplified method for the preparation of fungal genomic DNA for PCR and RAPD analysis. *BioTechniques* **16**: 48-50.
- Guirao, P., F. Beitia & J.L. Cenis. 1994. Aplicación de la técnica RAPD-PCR a la taxonomía de moscas blancas (Homoptera, Aleurodidae). *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas* **20**: 757-764.
- Hammond, J.B.W., G. Spanswick & J.A. Mawn. 1996. Extraction of DNA from preserved animal specimens for use in randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Analytical Biochemistry* **240**: 298-300.

- Hardrys, H., M. Balick & B. Schierwater. 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology* **1**: 55-66.
- Harry, M., S. Robin & D. Lachaise. 1998. Use of polymorphic genetic markers (RAPDs) in evolutionary and applied entomology. *Annales de la Societe Entomologique de France* **34**: 9-32.
- Haymmer, D.S. & D.O. McInnis. 1994. Resolution of populations of the Mediterranean fruit fly at the DNA level using random primers for the polymerase chain reaction. *Genome* **37**: 244-248.
- He, Q., M.K. Viljanen & J. Mertsola. 1994. Effects of thermocyclers and primers on the reproducibility of banding patterns in randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Molecular and Cellular Probes* **8**: 155-160.
- Hidayat, P., T.W. Phillips & R.H. Ffrench-Constant. 1996. Molecular and morphological characters discriminate *Sitophilus oryzae* and *S. zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and confirm reproductive isolation. *Annals of the Entomological Society of America* **89** (5): 645-652.
- Hillis, D.M. & M.T. Dixon. 1991. Ribosomal DNA: Molecular evolution and philogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology* **66** (4):411-453.

- Honda, J.Y., Y. Nakashima, T. Yanase, T. Kawarabata & Y. Hirose. 1998. Use of internal transcribed spacers (ITS-1) region to infer *Orius* (Hemiptera: Anthocoridae) species phylogeny. *Applied Entomology Zoology* **33** (4): 567-571.
- Infante-Malachias, M.E., K.S.C. Yotoko & A.M.L. Azeredo. 1999. Random amplified polymorphic DNA of screwworm fly populations (Diptera: Calliphoridae) from southeastern Brazil and northern Argentina. *Genome* **42** (4): 772-779.
- Jutras, E.M., R.M. Miller & I.L. Pepper. 1995. Optimization of arbitrarily primed PCR for the identification of bacterial isolates. *Journal of Microbiological Methods* **24**: 55-63.
- Kambhampati, S., W.C. Black IV & K.S. Rai. 1992. Random amplified polymorphic DNA of mosquito species and populations (Diptera: Culicidae): Techniques, statistical analysis, and applications. *Journal of Medical Entomology* **29** (6): 939-945.
- Klein-Lankhorst, R.M., A. Vermut, R. Weide, R. Liharska. & P. Zabel. 1991. Isolation of molecular markers for tomato (*L. esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Theoretical and Applied Genetics* **83**: 108-114.

- Koch, D.A., G.A. Duncan, T.J. Parsons, K.P. Pruess & T.O. Powers. 1998. Effects of preservation methods, parasites, and gut contents of Black Flies (Diptera; Simuliidae) on polymerase chain reaction products. *Journal of Medical Entomology* **35** (3): 314-318.
- Kraus, B. & G. Hunt. 1995. Differentiation of *Varroa jacobsoni* Oud populations by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Apidologie* **26**: 283-290.
- Kuperus, W.R. & W. Chapco. 1994. Usefulness of internal transcribed spacer regions of ribosomal DNA in Melanopline (Orthoptera: Acrididae) systematics. *Entomological Society of America* **87** (6): 751-754.
- Landry, B.S., L. Dextraze & G. Boivin. 1993. Random amplified polymorphic DNA markers for DNA fingerprinting and genetic variability assessment of minute parasitic wasp species (Hymenoptera: Mymaridae and Trichogrammatidae) used in biological control programs of phytophagous insects. *Genome* **36**: 580-587.
- Laulier, M., E. Pradier, Y. Bigot & G. Périquet. 1995. An easy method for preserving nucleic acids in field samples for later molecular and genetic studies without refrigerating. *Journal of Evolutionary Biology* **8**: 657-663.

- Levi, A., L.J. Rowland & J.S. Hartung. 1993. Production of reliable randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers from DNA of wood plants. *HortScience* **28** (2): 1188-1190.
- Liu, J. & R.E. Berry. 1995. Determination of PCR conditions for RAPD analysis in entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae). *Journal of Invertebrate Pathology* **65**: 79-81.
- Margaritopoulos, J.T., Z. Mamuris & J.A. Tsitsipis. 1998. Attempted discrimination of *Myzus persicae* and *Myzus nicotianae* (Homoptera: Aphididae) by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction technique. *Annals of Entomological Society of America* **91** (5): 602-607.
- Mariconi, F. A. M. 1970. As saúvas. São Paulo, Ed. Agronômica Ceres. 167 p.
- Martins, U.R. 1978. Elementos de Entomologia Sistemática. (mimeografado). Piracicaba, ESALQ/USP. 73 p.
- Meunier, J.R. & P.A.D. Grimont. 1993. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Research in Microbiology* **144**: 373-379.
- Narang, S.K., R.A. Leopold, C.M. Krueger & J.D. De Vault. 1994. Dichotomous RAPD-PCR key for identification of four species of parasitic Hymenoptera, p.

53-67. In: Narang, S.K.; Bartlett, A.C. & Faust, R.M. (eds.) *Applications of Genetics to Arthropods of Biological Control Significance*. CRC Press, Boca Raton.

Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York, Columbia University Press.

Paskewitz, S.M., D.M. Wesson & F.H. Collins. 1993. The internal transcribed spacers of ribosomal DNA in five members of the *Anopheles gambiae* species complex. *Insect Molecular Biology* **2** (4): 247-257.

Perring, T. M., A.D. Cooper, R.J. Rodriguez, C.A. Farrar & T.S. Bellows Jr. 1993. Identification of a whitefly species by genomic and behavioral studies. *Science* **259**: 74-77.

Persson, Y., S. Erland & H.B. Jansson. 1996. Identification of nematode-trapping fungi using RFLP analysis of the PCR-amplified ITS region of ribosomal DNA. *Mycological Research* **100** (5): 531-534.

Petersen, D.J., C. Zijlstra, J. Wishart, V. Blok & T.C. Vrain. 1997. Specific probes efficiently distinguish root-knot nematode species using signature sequences in the ribosomal intergenic spacer. *Fundamental and Applied Nematology* **20** (6): 619-625.

- Philips, A.J. & C. Simon. 1995. Simple, efficient, and nondestructive DNA extraction protocol for arthropods. *Annals of the Entomological Society of America* **88** (3): 281-283.
- Pornkulwat, S., S.R. Skoda, G.D. Thomas & J.E. Foster. 1998. Random amplified polymorphic DNA used to identify genetic variation in ecotypes of the European Corn Borer (Lepidoptera: Pyralidae). *Annals of the Entomological Society of America* **91**: 719-725.
- Post, R.J., P.K. Flook & A.L. Millest. 1993. Methods for the preservation of insects for DNA studies. *Biochemical Systematics and Ecology* **21** (1): 85-93.
- Post, R.J., P.K. Flook & M.D. Wilson. 1992. DNA analysis in relation to insect taxonomy, evolution and identification, pp. 21-34. *In*: Crampton, J.M. & Eggleston, P. (eds.) *Insect Molecular Science*. Royal Entomological Society London and Academic Press.
- Quintero, C., C. Cardona, D. Ramirez & N. Jimenez. 1998. First report of biotype B of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) in Colombia. *Revista Colombiana de Entomologia* **24** (1-2): 23-28.
- Reiss, R.A., D.P. Schwert & A.C. Ashworth. 1995. Field preservation of coleoptera for molecular genetic analyses. *Environmental Entomology* **24** (3): 716-719.

- Roehrdanz, R.L. & R.V. Flanders. 1993. Detection of DNA polymorphisms in predatory coccinellids using polymerase chain reaction and arbitrary primers (RAPD-PCR). *Entomophaga* **38** (4): 479-491.
- Roehrdanz, R.L. 1994. Simple method for monitoring dispersal of *Heliothis* (Lepidoptera:Noctuidae) backcross sterility genes. *Journal of Economic Entomology* **87** (3): 676-679.
- Roehrdanz, R.L. 1997. Identification of tobacco budworm and corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae) during early developmental stages by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *Annals of the Entomological Society of America* **90** (3): 329-332.
- Roehrdanz, R.L., D.K. Reed & R.L. Burton. 1993. Use of polymerase chain reaction and arbitrary primers to distinguish laboratory-raised colonies of parasitic hymenoptera. *Biological Control* **3**: 199-206.
- Rohlf, F.J. 1993. NTSYS-pc v. 1.8. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Applied Biostatistics Inc. Setauket, NY, 191p.
- Sales, F.J.M. & N.G. Gomes. 1984. Ação da terra solta de saueiros sobre o desenvolvimento de soja tropical. *X Congresso Brasileiro de Entomologia*, Londrina, Resumos, p. 77.

- Sales, F.J.M. 1998. Saúvas: Comportamento, Domesticação e Aleloquímicos. Fortaleza, Ed. Ediatta. 325 p.
- Sappal, N.P., R.S. Jeng, M. Hubbes & F. Liu. 1995. Restriction fragment length polymorphisms in polymerase chain reaction amplified ribosomal DNAs of three *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) species. *Genome* **38**: 419-425.
- Schlötterer, C., M.T. Hauser, A. Haeseler & D. Tautz. 1994. Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS region in *Drosophila*. *Molecular Biology and Evolution* **11** (3): 513-522.
- Schreiber, D.E., K.J. Garner & J.M. Slavicek. 1997. Identification of three random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction markers for distinguishing asian and north american gypsy moths (Lepidoptera: Lymantriidae). *Annals of the Entomological Society of America* **90**: 667-674.
- Shoemaker, D.D., K.G. Ross & M.L. Arnold. 1994. Development of RAPD markers in two introduced fire ants, *Solenopsis invicta* and *S. richteri*, and their application to the study of a hybrid zone. *Molecular Ecology* **3**: 531-539.
- Silveira, E.B., S.M. Al-Janabi, B.P. Magalhães, J.C.B. Carvalho & M. Tigano. 1998. Polymorphism of the grasshopper *Schistocerca pallens* (Thunberg) (Orthoptera: Acrididae) and its natural pathogens *Metarhizium flavoridiae* Gams

& Rozyspal (Hyphomycetes), revealed by RAPD analysis. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* **27** (1): 91-99.

Sneath, P.A. & R.R. Sokal. 1973. *Numerical Taxonomy*. Freeman, San Francisco, 573p.

Sokal, R.R. & F.J. Rohlf. 1962. The comparison of dendograms by objective methods. *Taxon* **11**: 33.

Staub, J., J. Bacher & K. Poetter. 1996. Sources of potential errors in the application of random amplified polymorphic DNA in cucumber. *HortScience* **31** (2): 262-266.

Stevens, J. & R. Wall. 1995. The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for studies of genetic variation in populations of the blowfly *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) in southern England. *Bulletin of Entomological Research* **85**: 549-555.

Stevens, J. & R. Wall. 1997. Genetic variation in populations of the blowflies *Lucilia cuprina* and *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). Random amplified polymorphic DNA analysis and mitochondrial DNA sequences. *Biochemical Systematics and Ecology* **25** (2): 81-97.

- Sttapien, V.J., S.V. Campenhout, S.G. Lopez & G. Volckert. 1998. Sequencing of the internal transcribed spacer region ITS1 as a molecular tool detecting variation in the *Stylosanthes guianensis* species complex. *Theoretical and Applied Genetics* **96**: 869-877.
- Troppmair, H. 1973. Estudo zoogeográfico e ecológico das formigas do gênero *Atta* (Hymenoptera) com ênfase sobre a *Atta laevigata*, (Smith, 1858), no Estado de São Paulo. Tese de Livre Docência. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Rio Claro. Rio Claro. 186 p.
- Turbeville, J.M., D.M. Pfeifer, K.G. Field & R.A. Raff. 1991. The phylogenetic status of arthropods as inferred from 18S rRNA sequences. *Molecular Biology Evolution* **8**: 669-686.
- Vanlerberghe-Masutti F., 1994. Detection of genetic variability in *Trichogramma* populations using molecular markers. *Norwegian Journal of Agricultural Sciences*. Supplement **16**: 171-176.
- Waldschmidt, A.M., T.M.F. Salomão, E.G. Barros & L.A.O. Campos. 1997. Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). *Brazilian Journal of Genetics* **20** (3): 421-423.

- Walsh, P.S., D.A. Metzger & R. Higuchi. 1991 Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* **10** (4):506-513.
- Weber, N. A. 1958. Evolution in fungus-growing ants. *Proceedings of the X International Congress of Entomology Behavior*. p. 459-473.
- Williams, J.G.K., A.R. Kublik, K.L. Livak, J.A. Rafalski & S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* **18** (22): 6531-6535.
- Wolff, K., E.D. Schoen & J. Peters-Van Rijn. 1993. Optimizing the generation of random amplified polymorphic DNAs in chrysanthemum. *Theoretical and Applied Genetics* **86**: 1033-1037.
- Yu, K. & K.P. Pauls. 1993 Identification of a RAPD marker associated with somatic embryogenesis in alfafa. *Plant Molecular Biology* **22**: 269-277.