

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROTEÇÃO DE PLANTAS**

**JOSEFA TATIANA DE SOUZA BARBOSA**

**GENÔMICA COMPARATIVA E FILOGEOGRÁFIA EM ESPÉCIES DO**  
**GÊNERO *Atta* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)**

**RIO LARGO - ALAGOAS**

**2018**

JOSEFA TATIANA DE SOUZA BARBOSA

GENÔMICA COMPARATIVA E FILOGEOGRÁFIA EM ESPÉCIES DO GÊNERO  
*Atta* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Proteção de Plantas da Universidade Federal de Alagoas -  
UFAL, como parte dos requisitos para obtenção do título de  
Doutora em Agronomia (Proteção de Plantas).

Orientador: Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana  
Coorientador: Prof. Dr. Cícero Carlos de Souza Almeida

RIO LARGO - ALAGOAS

2018

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias**  
Bibliotecária Responsável: Myrtes Vieira do Nascimento

B238g    Barbosa, Josefa Tatiana de Souza  
          Genômica comparativa e filogeografia em espécies do gênero *Atta*  
(HYMENOPTERA: FORMICIDAE) / Josefa Tatiana de Souza Barbosa –  
2018.  
          62 f.; il.

          Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Alagoas,  
Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2018.  
          Orientação: Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana  
          Coorientação: Prof. Dr. Cícero Carlos de Souza Almeida

          Inclui bibliografia

          1. Attini 2. DNA mitocondrial 3. Genética de populações  
I. Título.

CDU: 575.17

## Folha de Aprovação

JOSEFA TATIANA DE SOUZA BARBOSA

### GENÔMICA COMPARATIVA E FILOGEOGRÁFICA EM ESPÉCIES DO GÊNERO *Atta* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

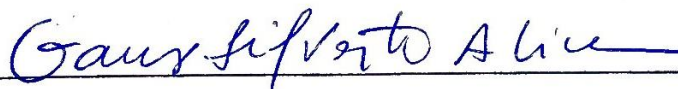
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial de avaliação para obtenção do título de Doutora em Agronomia (Proteção de Plantas).

Data de Aprovação: 28 / 02 / 2018



Prof. Dr. Cícero Carlos de Souza Almeida - Universidade Federal de Alagoas  
(Coorientador)

#### Banca examinadora:



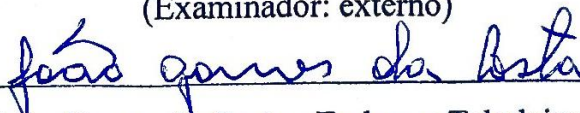
Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima - Universidade Federal de Alagoas

(Examinador: interno)



Prof. Dr. José Vieira Silva - Universidade Federal de Alagoas

(Examinador: externo)



Prof. Dr. João Gomes da Costa - Embrapa Tabuleiros Costeiros

(Examinador: externo)

À Deus, minha família e meu esposo.

**Dedico**

## **Agradecimentos**

Ao meu Deus por tudo que Ele tem me proporcionado e por toda força para chegar ao fim dessa batalha e de mais uma conquista. Obrigada Deus!

A meus pais José Edson Padilha Barbosa e Maria do Socorro Vieira Barbosa por todo amor e por acreditar em mim. As minhas irmãs Jakeline Vieira Barbosa e Priscila Vieira Barbosa por todo carinho e incentivo e a meus sobrinhos por toda alegria e descontração. Amo vocês!

Ao meu amado esposo Marcílio de Souza Barbosa, por todo incentivo e contribuição de maneira essencial, pelo exemplo de profissionalismo, confiança, amizade e pelos conselhos profissionais ou pessoais. Te amo muito!

A minha sogra Valci Francisca de Souza Santos por todo apoio e palavra de incentivo na luta desse desafio. Muito obrigada!

À coordenação e todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas por todo conhecimento transmitido.

Ao orientador Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana, pela orientação e parceria científica.

Ao coorientador Prof. Dr. Cícero Carlos Almeida pela parceria científica e por todos os ensinamentos e críticas na execução e elaboração deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior pelo auxílio financeiro na concessão de bolsa de estudos.

As amigas Márcia Daniela e Anilde Marciel, pela convivência do dia a dia, pelo carinho e gratidão.

Aos parceiros do Laboratório de Recursos Genéticos: André Marques, Gleica Martins, Kelly Maia, Eliane Paz, Suzyanne Moraes, Lydayanne Lilás, Jaqueline Terto e todos os demais membros.

Ao técnico em química Sivaldo Paulino do Laboratório de Solos, do *Campus* de Arapiraca pela ajuda concedida.

Enfim, a todos que de forma direta ou indireta possibilitaram a realização deste trabalho. **Muito obrigada!**

*“O que sabemos é uma queda, o que não sabemos é um oceano”.*

**Isaac Newton**



## RESUMO

As formigas cortadeiras do gênero *Atta* são amplamente distribuídas em toda a Região Neotropical, sendo importantes pragas de culturas agrícolas e florestais. No Brasil, estão distribuídas em todo o território nacional. A espécie *Atta opaciceps* Borgmeier, 1939 está especialmente distribuída pela Região Nordeste do país, abrangendo os Biomas Caatinga e Mata Atlântica. O trabalho teve como objetivos: sequenciar quatro genomas mitocondriais completos para as espécies *A. opaciceps*, *A. colombica*, *A. texana* e *A. sexdens rubropilosa* e analisar a estrutura populacional de *A. opaciceps* utilizando sequências do citocromo oxidase subunidade I (COI). Na montagem do genoma, os *reads* para a espécie *A. opaciceps* foi obtido a partir do sequenciamento, já para as outras espécies os *reads* foram obtidos a partir do NCBI. Para a montagem dos genomas, os *reads* das quatro espécies foram mapeadas usando o genoma mitocondrial de *A. laevigata* como referência e software Geneious para as análises filogenéticas. As análises para os espaços intergênicos mostraram que em *Atta* são maiores do que fora do grupo, concluindo que os mitogenomas de *Atta* são caracterizados por uma alta conservação na ordem e organização dos genes. Para abordagem filogeográfica baseada no gene mitocondrial COI foram amostrados 11 pontos de coleta para a espécie *A. opaciceps* distribuídos na Região Nordeste com abrangência de dois Biomas (Caatinga e Mata Atlântica). Também foi estimado o agrupamento filogeográfico usando análise bayesiana e modelagem de nichos climáticos identificando assim, cinco haplótipos distribuídos ao longo de toda a região geográfica. Revelando que os Biomas Caatinga e Mata Atlântica não influenciaram na modelagem das populações de *A. opaciceps*, e sugere que a espécie possui uma ampla capacidade de dispersão e adaptação aos distintos Biomas.

**Palavras-chave:** Attini. DNA mitocondrial. Genética de populações.

## ABSTRACT

Leaf-cutting ants of the genus *Atta* are widely distributed throughout the Neotropical Region, being important pests of agricultural and forest crops. In Brazil, they are distributed throughout the national territory. The species *Atta opaciceps* Borgmeier, 1939 is especially distributed in the Northeast of the country, covering the Caatinga and Atlantic Forest Biomes. The objective of this work was to sequence four complete mitochondrial genomes for the species *A. opaciceps*, *A. colombica*, *A. texana* and *A. sexdens rubropilosa* and to analyze the population structure of *A. opaciceps* using cytochrome oxidase I subunit (COI) sequences. In the assemblage of the genome, the reads for the species *A. opaciceps* were obtained from the sequencing, whereas for the other species the reads were obtained from the NCBI. For the assembly of the genomes, the reads of the four species were mapped using the mitochondrial genome of *A. laevigata* as reference and Geneious software for the phylogenetic analyzes. The analyzes for the intergenic spaces showed that in *Atta* they are larger than outside the group, concluding that *Atta* mitogenomas are characterized by a high conservation in the order and organization of the genes. For a phylogeographic approach based on the mitochondrial COI gene, 11 collection points were sampled for the *A. opaciceps* species distributed in the Northeast Region with two Biomes (Caatinga and Mata Atlântica). It was also estimated the phylogeographic grouping using Bayesian analysis and modeling of climatic niches thus identifying five haplotypes distributed throughout the geographic region. Revealing that the Caatinga and Atlantic Forest Biomes did not influence the modeling of the populations of *A. opaciceps*, and suggests that the species has a wide dispersion and adaptation capacity to the different Biomes.

**Keywords:** Attini. Mitochondrial DNA. Genetics of populations.



## Lista de Figuras

### Revisão de Literatura

- Figura 1. Cladograma baseado em mtDNA e nDNA mostrando que as formigas pertencentes ao gênero *Atta* estão distribuídas em quatro subgêneros, de acordo com estudo de Bacci et al. (2009)..... 17

### Capítulo I

- Figure 1. Complete gene map of *A. opaciceps* mitogenome. Genes of the circle are transcribed in the clockwise and counterclockwise directions, respectively. The protein-coding genes (green), rRNA (red) and tRNA (purple). The green ring represents the A+T contents and the blue ring shows C+G contents..... 39
- Figure 2. Genome size of the complete mitogenomes for *Atta* genus and outgroup. (A) Distribution of the genic and intergenic spacers. (B) Virtual gel showing the distribution of the intergenic spacers..... 40
- Figure 3. Organization of the *Atta* mitogenomes compared with outgroups. All coding regions displayed in the same order and direction..... 41
- Figure 4. Phylogenetic analysis using maximum likelihood, which the phylogenetic relationships are represented by complete mitogenomes (A) and coding regions (B)..... 42
- Figure 5. Principal component analysis (PCA) for five species of the *Atta* genus and three species as outgroups. (A) PCA using the complete mitogenomes and (B) PCA using the coding regions (Genes + tRNA + rRNA). The colors denote values at first two principal component (PC) axes..... 43

### Capítulo II

- Figura 1. Mapa do Brasil e detalhe da Região Nordeste com a distribuição geográfica das populações e distribuição dos haplótipos para as espécies de *Atta*. Cada local de coleta é representado por um ponto. As cores no mapa correspondem os haplótipos, conforme a legenda..... 52

- Figura 2. Análise filogenética para os haplótipos. As relações filogenéticas usando a abordagem bayesiana. Esta análise mostra o tempo de divergência entre os haplótipos em milhões de anos (Ma)..... 53
- Figura 3. Análise de cluster construída usando a abordagem Bayesiana para o agrupamento filogeográfico. As cores representam os clusters. Cores de fundo ou sombreadas indicaram incerteza quanto aos respectivos clusters. Os pontos indicam os locais de amostragem..... 54
- Figura 4. Distribuição geográfica para áreas preditas climaticamente para a ocorrência de *A. opaciceps* utilizando variáveis bioclimáticas atuais e do passado. Para o presente (agora, 0 anos BP), Last Glacial Maximum (LGM, 21,000 anos BP) e Last Interglacial (LIG, 120,000-140,000 anos BP). As cores quentes (vermelho/amarelo) representam áreas com alta probabilidade de ocorrência de *A. opaciceps*..... 55

## Lista de Tabelas

### Capítulo I

Table 1. Mitochondrial genome of the genus <i>Atta</i> and other species of the subfamily Myrmicinae utilized as the outgroup. The genome sizes in base pairs (bp) for the genome and the coding and noncoding regions. The genome annotation for tRNA (transport RNA), rRNA (ribosomal RNA), and protein-coding gene (genes) and the NCBI code for the genomes.....	44
--	----

### Capítulo II

Tabela 1. Detalhe dos locais de coleta de <i>Atta opaciceps</i> na região Nordeste do Brasil, indicando as coordenadas georeferenciadas e o grupo dos haplótipos.....	48
Tabela 2. Análise de estruturação de populações utilizando SAMOVA (Spatial Analyses of Molecular Variance).....	54

## SUMÁRIO

1 Introdução Geral.....	13
2 Revisão de Literatura.....	15
2.1 Formigas cortadeiras.....	15
2.1.1 Importância econômica .....	17
2.1.2 Estudos moleculares em formigas.....	18
2.2 Mitogenoma.....	19
2.3 Filogeografia.....	20
Referências.....	22
3 Capítulo I: Mitochondrial genomes of genus <i>Atta</i> (formicidae: myrmicinae) revealed high conservation of genes organization and giant intergenic spacers.....	26
Abstract.....	27
3.1 Introduction.....	28
3.2 Material and Methods.....	29
3.2.1 Biological sample, DNA isolation and High throughput DNA sequencing.....	29
3.2.2 Mitochondrial genome assembly and annotation.....	30
3.2.3 Genome comparison and phylogenetic analyses.....	30
3.3 Results.....	31
3.3.1 Genome assembly and mitogenome organization.....	31
3.3.2 Comparison among mitogenomes in the subfamily Myrmicinae.....	32
3.4 Discussion.....	33
Acknowledgements.....	34
References.....	35
4 Capítulo II: Filogeografia de <i>Atta opaciceps</i> Borgmeier, 1939 (Myrmicinae: Attini) revela ampla dispersão na Caatinga e Mata Atlântica.....	43
Resumo.....	44
Abstract.....	45
4.1 Introdução.....	46
4.2 Material e Métodos.....	47
4.2.1 Amostragem e extração de DNA.....	47
4.2.2 Amplificação e sequenciamento.....	48
4.2.3 Análise de haplótipos.....	48

4.2.4 Estruturação de populações.....	49
4.2.5 Modelagem de nicho ecológico.....	49
4.3 Resultados.....	50
4.3.1 Distribuição e análise de haplótipos.....	50
4.3.2 Estruturação de populações.....	51
4.3.3 Modelagem de nicho ecológico.....	51
4.4 Discussão.....	51
Agradecimentos.....	53
Referências.....	54



## 1 Introdução Geral

Formigas cortadeiras são insetos sociais altamente especializados, principalmente na divisão de trabalho e no cultivo do fungo simbiote. Pertencem à família Formicidae, sendo que, os gêneros de maior importância são *Atta* e *Acromyrmex*, os quais apresentam características relevantes e complexa organização social. A predominância das formigas nos ecossistemas terrestres, tanto pela sua constância, abundância e riqueza de espécies (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990), representa uma oportunidade para compreender as bases moleculares e como todos os aspectos da estrutura genômica, expressão gênica, fisiologia e comportamento do organismo são influenciados (ROBINSON, 2002).

Para alguns insetos foi determinada a sequência completa do genoma mitocondrial, o que tem permitido desenvolver importantes estudos moleculares, ecológicos e evolutivos (WANG et al., 2007). No entanto, a maioria dos estudos evolutivos e populacionais tem sido obtida por meio de sequência de genes mitocondriais, permitindo ampliar o conhecimento sobre os relacionamentos entre os *taxa* (AVISE, 2009).

As formigas foram um grupo promissor para a aplicação desta estratégia de sequenciamento do genoma mitocondrial, fornecendo dados básicos para compreensão dos rearranjos mitocondriais ocorridos durante a evolução. O entendimento das bases moleculares de espécies de *Atta* tem desempenhado um papel importante nos estudos de evolução molecular compreendendo como as taxas e os padrões de substituição variam em todas as sequências e ao longo do tempo (SIMON et al., 2006). De fato, o DNA mitocondrial (mtDNA) tem sido amplamente utilizado em estudos populacionais, evolutivos e filogenéticos, devido características marcantes que possui como herança exclusivamente materna, que impede a recombinação, além de alta taxa evolutiva e polimorfismos intraespecíficos, tornando assim uma molécula eficaz em estudos de filogeografia entre populações de uma espécie ou espécies próximas tornando-o promissor como marcador molecular (DOWTON et al., 2009).

Dentro das estimativas de diversidade genética e demográficas presentes entre as diversas populações, os genes têm grande influência nos processos biológicos e as variações fenotípicas que ocorrem dentro e entre as espécies é resultado das diferenças genéticas entre indivíduos e populações. A filogeografia busca identificar e compreender os processos responsáveis pela distribuição geográfica de linhagens genealógicas, que permitiram a diversificação. A utilização de marcadores moleculares

tem sido empregada para quantificar a diversidade e reconstruir padrões de dispersão nas diversas populações (GOODISMAN; KOVACS; HUNT, 2008).

A distribuição genética das espécies que resulta no isolamento das populações pode ser compreendida por meio de técnicas moleculares, analisando diferentes regiões do genoma. Essas regiões contêm informações sobre os fatores evolutivos que são responsáveis pela variação genética dentro da espécie. O entendimento e análise do mtDNA contribui para entender como os eventos históricos contribuíram para o processo de dispersão dos genes dentro das espécies e assim possibilita compreender a história evolutiva e os processos de distribuição geográfica das espécies.

Sendo assim, os principais objetivos deste estudo foram: Sequenciar os genomas mitocondriais de *A. opaciceps*, *A. colombica*, *A. texana*, *A. sexdens rubropilosa* e analisar a ordem, organização filogenômica e genética; e Analisar a filogeografia de *Atta opaciceps* Borgmeier, 1939 pertencente a ordem Hymenoptera, família Formicidae a fim de compreender a estrutura populacional e padrões demográficos da espécie.

## 2 Revisão de Literatura

### 2.1 Formigas cortadeiras

O Brasil detém a maior diversidade de formigas das Américas e uma das maiores do mundo, sendo a diversidade mirmecológica brasileira representativa da região Neotropical (BACCARO et al., 2015). As formigas estão situadas dentro do Reino Animal, Filo Arthropoda, Classe Insecta, Ordem Hymenoptera, Família Formicidae, Subfamília Myrmicinae e Tribo Attini. São consideradas formigas cortadeiras todas as espécies do gênero *Atta* (saúva) e *Acromyrmex* (quenquém) (DELLA-LUCIA et al., 2011).

São encontradas nos mais diversos biomas, destacando-se por sua grande herbivoria e distribuição pelo Novo Mundo. Os gêneros *Atta* e *Acromyrmex* são os herbívoros dominantes da região Neotropical. As saúvas ocorrem apenas nas Américas e sua dispersão compreende o sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). As quenquéns têm sua área de dispersão desde a Califórnia até a Patagônia, com exceção do Chile e das ilhas de Cuba, Trinidad e Tobago (MICHELS et al., 2001). Essa distribuição geográfica e a frequência de espécies da tribo Attini estão ligadas a fatores como condições ambientais, vegetação, tipo de solo, índices pluviométricos e do processo histórico anterior da área.

No Brasil, as espécies de maior frequência para o gênero *Atta* são *A. bisphaerica* Forel, 1908, *A. capiguara* Gonçalves, 1944, *A. cephalotes* Lineu, 1758, *A. goiana* Gonçalves, 1942, *A. laevigata* F. Smith, 1858, *A. opaciceps* Borgmeier, 1939, *A. robusta* Borgmeier, 1939, *A. sexdens piriventris* Santschi, 1919, *A. sexdens rubropilosa* Forel, 1908, *A. sexdens sexdens* Lineu, 1758, *A. silvai* Gonçalves, 1982, *A. vollenweideri* Forel, 1939 (DELLA-LUCIA et al., 2011).

Dentro da diversidade biológica, as formigas (Formicidae) se destacam sendo conhecidas atualmente 13.000 espécies de formigas, porém tal número pode representar apenas metade das espécies de Formicidae (BOLTON, 2014). Estudos estimam que as formigas tenham surgido ainda no Cretáceo à cerca de 100 milhões de anos e desde então desenvolveram uma notável gama de comportamentos sociais, hábitos de forrageamento e associações com outros organismos (WARD et al. 2014; HÖLLDOBLER; WILSON 1990).

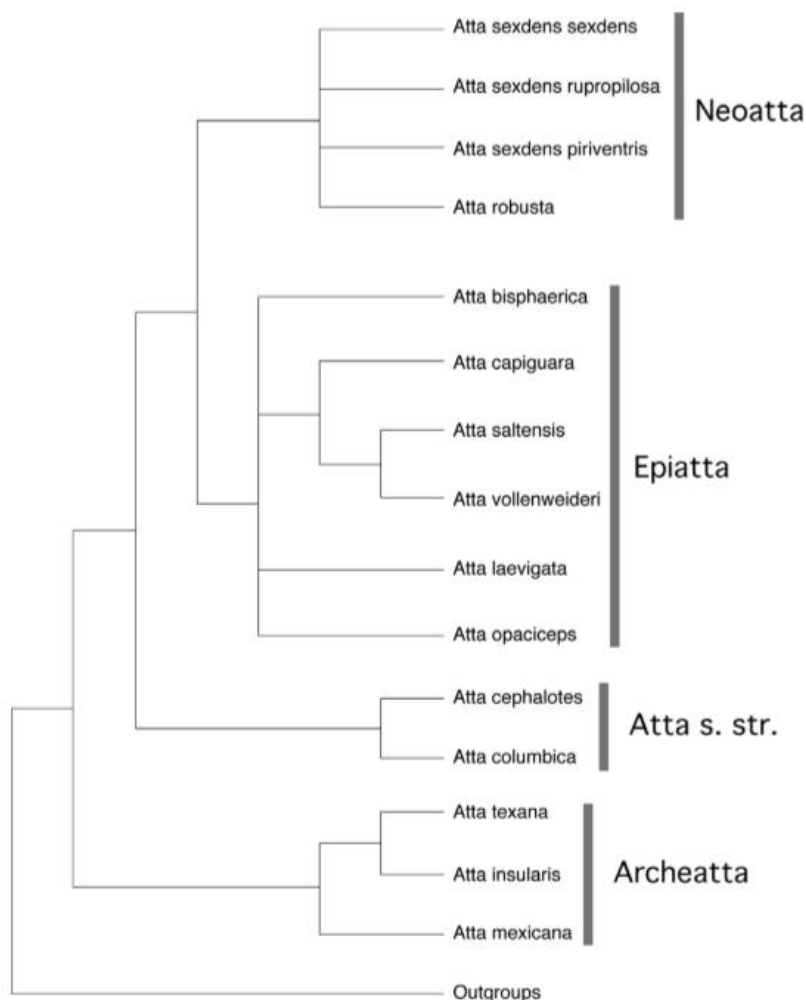
Entre os formicidae, a tribo Attini se destaca por possuírem formigas cortadeiras e representarem um grupo ecologicamente dominante em ecossistemas

terrestres mantendo uma associação obrigatória com fungos. Nessa interação, as formigas fornecem proteção e substrato vegetal para o desenvolvimento do fungo simbiote. Os gêneros mais basais ou primitivos são conhecidos como Attini inferiores, que cultivam o fungo usando como substrato matéria morta como carcaça de insetos e restos de vegetais, enquanto os gêneros derivados *Acromyrmex* e *Atta*, conhecidos como Attini superiores, cultivam o fungo usando como substrato, material vegetal fresco. A tribo Attini compreende 16 gêneros com aproximadamente 256 espécies de formigas descritas (SOSA-CALVO et al., 2013).

Os membros da tribo Attini são cultivadores de fungos da família Agaricaceae e Pterulaceae (Basidiomycota: Agaricales), que lhe serve como principal suplemento alimentar (REYNOLDS; CURRIE, 2004). Elas fornecem folhas frescas e flores como substratos de suporte ao crescimento do cultivo e promovem o crescimento de seu fungo simbiote por meio da poda e do movimento de enzimas no jardim (BASS; CHERRET, 1996). O jardim de fungo de formigas da tribo Attini é considerado uma comunidade microbiana, pois diversos microrganismos podem ser encontrados neste ambiente particular, além do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* (Möller) Singer (Basidiomycota: Agaricales) (RODRIGUES et al., 2008).

Segundo Bacci et al. (2009), após realizar estudos envolvendo genes mitocondriais e nucleares sugeriram que as formigas pertencentes ao gênero *Atta* estão distribuídas em quatro subgêneros (*Atta*, *Epiatta*, *Neoatta* e *Archeatta*) e que as espécies relacionadas estão distribuídas em subgêneros, indo do mais basal ao mais recente ou derivado (Figura 1). Algumas dessas espécies são restritas a algumas regiões, podendo assim dizer que ocorrem uma relação biogeográfica, enquanto outras têm uma distribuição mais abrangente como *A. laevigata*, *A. sexdens* e *A. cephalotes* que ocorrem em várias regiões do país como a região Sudeste e principalmente por atingirem grandes extensões da América do Sul (DELLA-LUCIA et al., 2011; WEBER, 1972).

**Figura 1.** Cladograma baseado em mtDNA e nDNA mostrando que as formigas pertencentes ao gênero *Atta* estão distribuídas em quatro subgêneros, de acordo com estudo de Bacci et al. (2009).



### 2.1.1 Importância econômica

As formigas do gênero *Atta* são consideradas pragas na agricultura em diversas regiões do Brasil e das Américas pelo hábito de cortarem folhas causando grandes perdas a diversas culturas com prejuízo econômico elevado, chegando a milhões de dólares por ano (BOARETTO; FORTI, 1997). Contudo, apesar dos prejuízos causados possuem importância em diversos ecossistemas como a participação no fluxo de energia e nutrientes, participando da aeração do solo, polinização e dispersão de sementes. Participam de processos como a simbiose com plantas, artrópodes, fungos e outros microrganismos se destacando pela evolução do comportamento que surgiu na história

evolutiva, que foi a agricultura desenvolvendo assim uma intrínseca relação de mutualismo formiga-fungo (MUELLER et al., 2005; SCHULTZ; BRADY, 2008). A alta densidade populacional e diversidade de espécies fazem desses himenópteros componentes fundamentais na caracterização e manutenção da estrutura das comunidades e na ciclagem da matéria tornando-as úteis como indicadores ambientais e ecológicos (HOLLDOBLER; WILSON, 1990)

Embora as formigas cortadeiras cortem inúmeras espécies vegetais, algumas plantas são resistentes ao seu ataque. Estudos tem mostrado um alto grau de não-preferência de formigas cortadeiras por algumas espécies de plantas que são tóxicas, às formigas ou a seu fungo. Essas espécies de plantas podem ser agregadas aos plantios como forma de proteção as plantas cultivadas (RODRIGUES et al., 2008). Também tem ocorrido o uso de plantas-armadilhas para a proteção de outras plantas que consiste em plantas que possuem certas substâncias com propriedades atraentes a insetos que podem ser consorciadas com o intuito de concentrar as pragas em uma determinada área para sua posterior destruição (SILVA; SILVIE et al., 2006).

Assim as informações básicas para que métodos de controle se tornem eficientes possibilitará identificar o indivíduo dentro da taxonomia, tornando premissa básica para que outras linhas dentro da entomologia possam contribuir de forma direta para a resolução de problemas no manejo de pragas.

### **2.1.2 Estudos moleculares em formigas**

Apesar da importância ecológica a distribuição geográfica de diversas espécies nos mais variados ambientes é resultado das mudanças climáticas. Estudos de estrutura genética em populações de insetos sociais tem sido realizados com o uso do DNA mitocondrial (mtDNA) mostrando a eficiência como marcador molecular e tornando possível o entendimento das consequências ecológicas e evolutivas destas mudanças nos estudos das relações filogenéticas intraespecífica (SCHULTZ; BRADY, 2008; BACCI et al., 2009). Esses insetos formam colônias com estrutura familiar que habitam ninhos distribuídos de maneira desigual em todo o meio ambiente. Dependendo dos sistemas sociais e reprodutores específicos, pode existir uma rede hierárquica complexa de afinidades geográficas dentro e entre ninhos (ROSS; CARPENTER 1991; CROZIER; PAMILO 1996). Os insetos sociais fornecem exemplos de como as mudanças no comportamento social podem alterar padrões locais do fluxo de genes. Assim, o conhecimento da estrutura genética em insetos sociais pode esclarecer vários

processos que são fundamentais como a de que a diferenciação social é responsável por promover a diferenciação genética.

## 2.2 Mitogenoma

Estruturalmente, o mtDNA de insetos é uma pequena molécula de DNA com 15 a 20 kb de fita dupla e com estrutura circular, que normalmente possui 13 genes codificadores de subunidades de enzimas envolvidas na cadeia transportadora de elétrons ou síntese de ATP, dois genes de RNA ribossomal e 22 genes de RNA transportador, totalizando 37 genes, alguns pequenos espaçadores intergênicos (IGS) além de uma região rica em A+T (Origem de replicação) (MEYER, 1994). Os genes presentes no mtDNA estão associados basicamente ao desempenho das funções das mitocôndrias em produzir energia. Além de exercer outras importantes funções na apoptose e envelhecimento celular, o que significa que as mitocôndrias estão envolvidas em muitas doenças degenerativas (CAMERON, 2014).

O mitogenoma ou genoma mitocondrial (mtDNA) consiste em uma molécula de DNA utilizada em estudos moleculares e biologia evolutiva. O conhecimento e obtenção das sequências possibilita o entendimento de sequências de DNA para muitos grupos de animais para o qual nenhuma informação anteriormente existia (MEYER, 1994). Variações genéticas entre populações podem ser detectadas a nível molecular através de mudanças diretas na estrutura do DNA, ou indiretamente nas proteínas codificadas por genes específicos. Logo, o mtDNA é uma molécula de dupla fita circular e única que não sofre recombinação e são de herança unicamente materna, ao contrário do genoma nuclear que possui herança biparental (MEYER, 1994).

Devido ao uso extensivo de genes individuais em uma ampla gama de estudos, o genoma mitocondrial teve grande impacto na genética entomológica. As regiões mais comumente sequenciadas em sistemática de insetos são os genes Citocromo oxidase I (COI), Citocromo oxidase II (COII), 16 rDNA e o 12 rDNA. O DNA mitocondrial tem sido amplamente utilizado para investigar a estrutura da população em estudos evolutivos e filogeográficos nos vários níveis taxonômicos, validando sua utilidade como marcador molecular para a sistemática. A popularidade dos marcadores de mtDNA deriva em grande parte da sua relativa facilidade de isolamento e amplificação,

mesmo de amostras pouco preservadas (CATERINO; CHO; SPERLING, 2000; BACCI et al., 2009).

Estudos comparativos realizados com mitocôndrias de insetos levou à identificação das diferenças na organização do mtDNA. Indicando que, embora o mtDNA de insetos tenha conteúdo de GC diferente, os conteúdos de genes são muito semelhantes em várias ordens de insetos e essas diferenças significativas no conteúdo de GC podem sugerir múltiplos ancestrais mitocondriais, apesar de manter o conteúdo genômico similar. A semelhança cromossômica na ordem dos genes e sua orientação entre as espécies, sugerem diferenças na transcrição e na regulação de genes (CHANDRA; VIK; KAPATRAL, 2006).

No sequenciamento do genoma mitocondrial de algumas espécies é possível encontrar regiões não codificantes ou de controle. Essas regiões são compostas por uma grande região de repetição em tandem, que possui um padrão que muitas vezes não é observado e, durante a replicação é provável que novos padrões de repetições possam surgir. A reconstrução filogenética baseada em genomas mitocondriais é importante para iniciar a montagem de sequências do genoma. Contribuindo para a compreensão das relações filogenéticas e história evolutiva de muitos grupos de organismos. As formigas são um grupo de grande relevância para a aplicação de técnicas que envolvem o sequenciamento do genoma mitocondrial fornecendo dados básicos para estudos que investigam a história da população, sistemática molecular e filogeografia e também contribuem para uma melhor compreensão dos rearranjos mitocondriais ocorridos durante a evolução (LI et al., 2016; RODOVALHO et al., 2014).

### **2.3 Filogeografia**

Estudos filogeográficos tem utilizado a região do citocromo oxidase da subunidade 1 (CO1) como uma região padronizada a diversos estudos de dispersão. Isto tem permitido conhecer a estruturação da população resultante de mudanças climáticas que podem ter ocorrido entre as espécies, além de contribuir para uma compreensão mais clara dos padrões de distribuição de espécies resultantes de sucessivos ciclos climáticos durante o Pleistoceno (MAIA et al., 2016). A estruturação de indivíduos associado ao ambiente geográfico é determinado pelo movimento ou pelos padrões de dispersão a grandes distâncias. Nas populações é possível detectar as variações genéticas que ocorrem entre os indivíduos por meio de mudanças diretas na estrutura do



DNA, ou indiretamente nas proteínas codificadas por genes específicos (LABBE; LENORMAND; RAYMOND, 2005).

A adaptação ocorre por substituição de genes em um ou vários *loci*, podendo vários alelos se agregar simultaneamente em um único *locus*. A distribuição geográfica pode ocorrer pela presença de um gene de resistência que prevalece devido a melhor adaptação e se espalha localmente apenas em algumas condições do ambiente ou globalmente em todas as áreas (LABBE et al., 2005). Isto afeta a estruturação filogeográfica devido a fatores que ocorreram dentro do habitat e que causaram a desfragmentação do meio. O padrão filogeográfico entre os haplótipos podem ser causados pelo fluxo de genes que são restritos ao isolamento ou pela a distância estreitamente relacionada e detectada com mais frequência na mesma área do que os relacionados remotamente (LIU et al., 2012).

A filogeografia usa informações geográficas para compreender os processos demográficos que moldaram a evolução das populações e das espécies por meio de processos que regem as distribuições geográficas das linhagens genéticas, especialmente aquelas dentro e entre as espécies estreitamente relacionadas (AVISE, 2001). Atualmente, os métodos filogeográficos necessitam fornecer um sólido quadro estatístico para inferência de muitas metodologias existentes que proporcionem resultados estatisticamente confiáveis.

A distribuição da população pode ser explicada por um conjunto de migrações, formando clusters populacionais geograficamente estáveis com taxas iguais de migração e sem migração posterior, além de permitir a inclusão de covariáveis como as informações fenotípicas ou climáticas (MANOPOULOU et al., 2011).

## Referências

- AVISE, J. C. Evolving genomic metaphors: a new look at the language of DNA. **Science**, v. 294, p. 86-87, 2001.
- AVISE, J. C. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, v. 36, p. 3-15, 2009.
- BACARRO, F.B. et al. **Guia para os gêneros de formigas do Brasil**. Manaus: Editora INPA, 2015, 388p.
- BACCI JR, M. et al. Phylogeny of leafcutter ants in the genus *Atta* Fabricius (Formicidae: Attini) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 51, p. 427-437, 2009.
- BASS, M.; CHERRETT, J. M. Fungus garden structure in the leaf-cutting ant *Atta sexdens* (Formicidae, Attini). **Symbiosis**, Dordrecht, v. 21, p. 9-24, 1996.
- BOARETTO, M. A. C.; FORTI, L. C. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. Série Técnica IPEF, Botucatu, v. 11, p. 31-46, 1997.
- BOLTON, B. (2014). An online catalog of the ants of the world. <http://antcat.org>. (acessado em 10 outubro, 2017).
- CAMERON, S. L. Insect mitochondrial genomics: implications for evolution and phylogeny. **Annual Review of Entomology**, v. 59, p. 95-117, 2014.
- CATERINO, M. S.; CHO, S.; SPERLING, F. A. H. The current state of insect molecular systematics: a thriving Tower of Babel. **Annual Review of Entomology**, v. 45, p. 1-54, 2000.
- CHANDRA, S. B. C.; VIK, J. L.; KAPATRAL, V. Comparative insect mitochondrial genomes: differences despite conserved genome synteny. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 1308-1318, 2006.
- CROZIER, R. H.; PAMILO, P. Evolution of Social Insect Colonies. Sex Allocation and Kin Selection. **Austral Ecology**, v.22, p. 240-241, 1996.

DELLA LUCIA, T. M. C. **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2011, 421 p.

DOWTON, M. et al. Characterization of 67 mitochondrial tRNA gene rearrangements in the Hymenoptera suggests that mitochondrial tRNA gene position is selectively neutral. **Molecular Biology and Evolution**, v. 26, p. 1607-1617, 2009.

GOODISMANN, M. A. D.; KOVACS, J. L.; HUNT, B. G. Functional genetics and genomics in ants (Hymenoptera: Formicidae): the interplay of genes and social life. **Myrmecological News**, v. 11, p. 107-117, 2008.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The ants**. Cambridge: Harvard University Press. 732 p. 1990.

LABBE, P.; LENORMAND, T.; RAYMOND, M. On the worldwide spread of an insecticide resistance gene: a role for local selection. **European Society for Evolutionary Biology**. v.18, p.1471-1484. 2005.

LI, T. et al. A mitochondrial genome of Rhyparochromidae (Hemiptera: Heteroptera) and a comparative analysis of related mitochondrial genomes. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-12, 2016.

LIU, Y. et al. Phylogeography of *Camellia taliensis* (Theaceae) inferred from chloroplast and nuclear DNA: insights into evolutionary history and conservation. **BMC Evolutionary Biology**, p. 1471-2148, 2012.

MAIA, A. V. P. High-level phylogeographic structuring of *Neoleucinodes elegantalis* Guenée (Lepidoptera, Crambidae) in Brazil: an important tomato pest. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 60, p. 206-210, 2016.

MANOLOPOULOU I. et al. A Bayesian approach to phylogeographic clustering. **Interface Focus**, v. 1, p. 909-921, 2011.

MEYER, A. DNA technology and phylogeny of fish In: BEAUMONT, A. R. **Genetics and evolution of aquatic organisms**. London: Chapman and Hall, 1994, p. 219-249.

MICHELS, E. et al. Geographical and genetic distances among zooplankton populations in a set of interconnected ponds: a plea for using GIS modelling of the effective geographical distance. **Molecular Ecology**, v. 10, p. 1929-1938, 2001.

MUELLER, U. G. The evolution of agriculture in insects. **Annual Review of Ecology Evolution and Systematics**, v. 36, p. 563-595, 2005.

REYNOLDS, H. T.; CURRIE, C. R. Pathogenicity of *Escovopsis*: the parasite of the attine ant-microbe symbiosis directly consumes the ant cultivated fungus. **Mycologia**, Lawrence, v. 96, p. 955-959, 2004.

ROBINSON, G. E. Genomics and integrative analyses of division of labor in honeybee colonies. **The American Naturalist**, v. 160, p. 160-172, 2002.

RODOVALHO, C. M. et al. The mitochondrial genome of the leaf-cutter ant *Atta laevigata*: A mitogenome with a large number of intergenic spacers. **PLoS ONE**, v. 9, p. 1-9, 2014.

RODRIGUES, A. et al. Microfungal “weeds” in the leafcutter ant symbiosis. **Microbial Ecology**, Secaucus, v. 56, p. 604-614, 2008.

ROSS, K G.; CARPENTER, J. M. Population genetic structure, relatedness, and breeding systems. **Social Biology**, p. 451-479, 1991.

SCHUTZ, T. R; BRADY, S. G. Major evolutionary transitions in ants agriculture. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 105, p. 5435-5440, 2008.

SILVA, M. B. da et al. Desenvolvimento de produtos à base de extratos de plantas para o controle de doenças de plantas. In: VEZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J. de; PALLINI, A. **Controle Alternativo de Pragas de Doenças**. Viçosa: EPAMIG/CTZM/UFV, p. 221-246, 2006.

SILVIE, P. J.; RENO, A.; BADJI, C. A. Controle das pragas do algodão por práticas culturais e manipulação do habitat. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v.10, p.1183-1196, 2006.

SIMON, C. et al. Incorporating molecular evolution into phylogenetic analysis, and a new compilation of conserved polymerase chain reaction primers for animal mitochondrial DNA. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 37, p. 545-579, 2006.

SOSA-CALVO, J. et al. *Cyatta abscondita*: taxonomy, evolution, and natural history of a new fungus-farming ant genus from Brazil. **PLoS ONE**, v. 8, p. 1-20, 2013.

WARD, P.S. et al. The evolution of myrmicine ants: phylogeny and biogeography of a hyperdiverse ant clade (Hymenoptera: Formicidae). **Systematic Entomology**, v.40, p. 61-81, 2014.

WEBER, N. A. The fungus-culturing behavior of Ants. **American Zoologist**, v. 6, p. 577-587, 1972.

### 3 Capítulo I<sup>1</sup>

Mitochondrial genomes of genus *Atta* (Formicidae: Myrmicinae) reveal high gene organization and giant intergenic spacers

Josefa T. V. Barbosa<sup>2</sup>, Marcílio S. Barbosa<sup>1</sup>, Antônio E. G. Santana<sup>2</sup>, Cicero Almeida<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Genetics Resources, Campus Arapiraca, Universidade Federal de Alagoas, Brazil;

<sup>2</sup>Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas.

Short running title: Mitochondrial genomes of *Atta*

Corresponding author:

Cícero Almeida

Campus de Arapiraca

Universidade Federal de Alagoas

Avenida Manoel Severino Barbosa s/n, Rodovia AL 115, km 6,5. Bairro Bom Sucesso

Arapiraca, AL, Brazil

Phone number: 55 823482-1831

E-mail: [cicerocarlos@pesquisador.cnpq.br](mailto:cicerocarlos@pesquisador.cnpq.br)

<sup>1</sup>Capítulo I está escrito de acordo com as normas de submissão do periódico Genetics and Molecular Biology. A submissão foi realizada no dia 03/04/2018.

## Abstract

The ants of the genus *Atta* are considered an important pest to agriculture in Latin América, although, *Atta* species are important contributors to ecosystem functions in the various habitats in which they occur. Next-generation sequencing product millions or billions of short reads, however, is necessary to applied methods for assembly of the genomes. The aim of this study was to assembly four complete mitochondrial genomes of the genus *Atta*, construct the phylogenomic tree and analyze the gene content, order and organization. The mitogenomes of *A. colombica*, *A. opaciceps*, *A. texana*, and *A. sexdens rubropilosa* contained 18,392; 19,257; 19,709 and 17,061 bp, respectively. For *A. opaciceps*, *A. colombica* and *A. texana*, the mitogenomes showed a typical genome for an insect, which showed 13 protein-coding genes, 21–22 tRNA, and 2 rRNA, which the genes displayed in the same order. Analysis for intergenic spacer regions showed that *Atta* intergenic spacers are larger than those of the outgroups. The phylogenomic analyses showed similar topologies with previous phylogenetic analyses using partial genes cytochrome oxidase I, of which sowed high clade support values. We conclude that *Atta* mitogenomes are characterized by high conservation in gene order and have giant intergenic spacers in the genus *Atta*.

Keywords: ants, evolution, mitogenomes

### 3.1 Introduction

The ants of the genus *Atta* are leafcutters belonging to the tribe Attini (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae) and are considered an important pest to agriculture in Latin America, although *Atta* species are important contributors to ecosystem functions in the various habitats in which they occur. The species widespread in Brazil are *A. bisphaerica* Forel, 1908, *A. capiguara* Gonçalves, 1944, *A. cephalotes* Lineu, 1758, *A. goiana* Gonçalves, 1942, *A. laevigata* F. Smith, 1858, *A. opaciceps* Borgmeier, 1939, *A. robusta* Borgmeier, 1939, *A. sexdens piriventris* Santschi, 1919, *A. sexdens rubropilosa* Forel, 1908, *A. sexdens sexdens* Lineu, 1758, *A. silvai* Gonçalves, 1982 and *A. vollenweideri* Forel, 1939.

Phylogenetic analyses have used partial genes cytochrome oxidase I, tRNA leucine, and cytochrome oxidase II and revealed four clades: (1) *A. texana*, *A. mexicana*, and *A. insularis* in the Archeatta clade; (2) *A. colombica* and *A. cephalotes* in the *Atta* s. str. clade; (3) *A. opaciceps*, *A. laevigata*, *A. capiguara*, *A. bisphaerica*, *A. vollenweideri* Forel 1939 and *A. saltensis* in the Epiatta clade and (4) *A. sexdens* and *A. robusta* in the Neoatta clade (Bacci et al., 2009). These phylogenetics relationships showed some clade with low branches supports and the phylogenetic analysis using the complete mitogenomes provides robust inferences. Additionally, the complete mitogenomes allowing to analyze the rearranges as deletion, duplication and inversion among mitogenomes. However, the complete mitogenomes for the genus *Atta* have been described only for *A. laevigata* (Rodvalho et al., 2014) and *A. cephalotes* (Suen et al., 2011). For other species of the subfamily Myrmicinae, the mitogenomes are available for *Pristomyrmex punctatus* (Hasegawa et al., 2011), three species of *Solenopsis* (Gotzek et al., 2010), *Vollenhovia emeryi* (Liu et al., 2016), *Wasmannia auropunctata* (Duan et al., 2016) and *Myrmica scabrinodis* (Babbuci et al., 2014).



In this study, four complete mitochondrial genomes of the genus *Atta* were assembled. The mitogenomes were utilized for phylogenomic analyses, gene content and order for exploring the evolution of this genus *Atta*. For development of the mitogenomes the reads of *A. opaciceps* were sequenced and the reads of *A. colombica*, *A. texana* and *A. sexdens rubropilosa* were downloaded from NCBI and utilized to assemble the complete mitogenomes.

## 3.2 Materials and Methods

### 3.2.1 Biological sample, DNA isolation, and high-throughput DNA sequencing

For *A. opaciceps*, the biological sample was collected in the state of Alagoas, Brazil, and DNA extraction was performed using the cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) extraction method (Doyle and Doyle, 1987). The quality and quantity of the extracted DNA were verified by visualization on 1% agarose gel and spectrophotometer, respectively. The DNA sample was fragmented by sonication into 500–600 bp to construct the sequencing library, and the fragments were ligated with adapters using the “Nextera DNA Sample Preparation” (Illumina) kit and sequencing the paired-end reads with a size of 100 nt based on the Illumina HiSeq2500 platform. Sequencing was performed at the Central Laboratory for High Performance Technologies in Life Sciences (LacTad - *Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida*) at the State University of Campinas - UNICAMP, São Paulo.

For *A. colombica* (SRR3187022 and SRR3168931), *A. texana* (SRR5438011), and *A. sexdens rubropilosa* (SRR5651498), the short reads were obtained from public data from the NCBI, for which the SRA files were unpacked into FASTQ using the FASTQ-DUMP executable from the SRA Toolkit. The FASTQ files were then filtered

with a minimum quality of 10 and converted into FASTA files and utilized for genome assembly. Were utilized 30 million reads of *A. colombica*, 24 million reads of *A. opaciceps*, 3.3 million reads of *A. texana* and 4.2 million reads for *A. sexdens rubropilosa*.

### 3.2.2 Mitochondrial genome assembly and annotation

To obtain the mitochondrial genome of the four species, the reads were mapped using the mitochondrial genome of *A. laevigata* as the reference, using the software Geneious R9 (<http://www.geneious.com>). The draft mitogenomes were checked using contigs *de novo* assembling generated by Ray software (Boisvert et al. 2012), performed using parameter kmer 31 and the largest contig was analyzed using BLAST for mitochondrial identification. The genome annotation was achieved using the MITOS (Bernt et al., 2013) and conferred with Geneious software using the mitochondrial genome of *A. laevigata* as the reference. The annotations were checked and, where necessary, were manually corrected. A graphic representation of the mitochondrial genome of *A. opaciceps* was created using Geneious.

### 3.2.3 Genome comparison and phylogenetic analyses

Six mitochondrial genomes for the genus *Atta* and the other three genomes from Myrmicinae subfamily were utilized for phylogenetic inferences (Table 1). The mitogenomes for *A. cephalotes*, *A. laevigata*, *M. scabrinodis*, *P. punctatus*, and *S. richteri* were obtained from the NCBI and the mitogenomes of the *A. colombica*, *A. opaciceps*, *A. texana* and *A. sexdens rubropilosa* were assembled in this study. The mitogenome sequences were aligned using the program MAFFT v7.017 (Kato and Standley, 2013) implemented as the “Multiple align” tool in Geneious R9, and the evolutionary history was inferred using the maximum likelihood (ML) method based on the GTR+I+G nucleotide substitution model (Nei and Kumar, 2000),

and branch support was assessed with 1,000 bootstrap replicates. The nucleotide substitution model and ML analysis were conducted in MEGA7 (Kumar et al., 2016). The genetic relationships among species were also investigated through a principal component analysis (PCA) using the function *glPca* in *R* package *ade4* (Jombart and Ahmed, 2011).

### 3.3 Results

#### 3.3.1 Genome assembly and mitogenome organization

The mitogenomes of *A. colombica*, *A. opaciceps*, *A. texana*, and *A. sexdens rubropilosa* contained 18,392, 19,257, 19,709, and 17,061 bp, respectively (Table 1). For *A. opaciceps*, *A. colombica*, and *A. texana*, the mitogenomes showed a typical genome for an insect, which showed 13 protein-coding genes, 21–22 tRNA, and 2 rRNA as well as the noncoding region (Figure 1 and Table 1), of which the genes displayed in the same order and orientation as present in the hypothesized ancestral mitogenome (Figure S1). For *A. sexdens rubropilosa*, a deletion of the six tRNAs and the NAD2 gene was observed (Table 1 and Figure S1).

The A + T contents of the mitogenomes were high, displaying an A + T content ranging from 72.7% (*A. sexdens rubropilosa*) to 82.5% (*A. texana*). For the coding region, the lowest A + T content was in COXI, COX3, and ATP6, whereas the highest A + T content was between ND5 and ND3. The A + T contents between the coding and noncoding regions were different, for which the coding regions displayed an A + T content ranging from 77.6% (*A. cephalotes*) to 78.5% (*A. texana*), whereas the noncoding regions showed an A + T content ranging from 84.1% (*A. sexdens rubropilosa*) to 90.3% (*A. texana*).

The size of the whole non-coding (intergenic spacers) regions showed that *Atta* species have large intergenic spaces when compared with the outgroup (Figure 2A), wherein the genus *Atta* displayed spacers ranging from 3,655 to 4,880 bp, whereas the

outgroup showed spacers ranging from 738 to 1,550 bp (Table 1). The large intergenic spacers in genus *Atta* are distributed in all intergenic spacers (Figure 1B). For the coding region, the sequences displayed similar length in *Atta* and the outgroup (Table 1).

### 3.3.2 Comparison among mitogenomes

The mitogenome arrangement for the genus *Atta* was identical, wherein the protein-coding genes and the rRNA displayed the same order and orientation. For tRNA, additional tRNA was observed between ATP4 and COX2 in *A. cephalotes*, but it was not detected between ND4 and ND5 in *A. colombica* (Figure S1). Remarkably, *A. sexdens rubropilosa* displayed a deletion of six tRNAs + NAD2 (Figure S1).

The phylogenetic analysis showed *A. texana* as the basal clade, whereas other species as the derived clade (Figure 3). The topologies obtained with the complete mitogenome (Figure 3A) and the coding regions (Figure 3B) showed no differences. In both phylogenetic analyses, the branch-support values were high, with a bootstrap value of >96% for *Atta* clades. The results of PCA for the complete genomes and the coding regions were different, wherein PCA using the complete genomes show clear support for species delimitation in *Atta* (Figure S2A), whereas using only the coding regions, *A. colombica* and *A. cephalotes* species displayed in one group and *A. laevigata* and *A. opaciceps* also showed one group (Figure S2B). In the PCA for the complete genome, the first principal component separated *A. laevigata*, *A. opaciceps*, and *A. sexdens rubropilosa* from the other species, and the second principal component separated *A. colombica* and *A. cephalotes* from *A. texana*.

### 3.4 Discussion

The nucleotide compositions in all analyzed *Atta* mitogenomes are characterized by a high frequency of A + T. The same result was reported previously for *A. laevigata* by Rodovalho et al. (2014) and the gene order and orientation are the same in all *Atta* mitogenomes as in the ancestral insect mitochondrial genome (Cameron et al., 2014). However, it was observed that *Atta* mitogenomes are larger than the other outgroup mitogenomes, suggesting a phylogenetic signal. The size variation is influenced by expansions in intergenic spaces, which was detected by the larger intergenic spacers in *Atta* mitogenomes, and the expansions in the intergenic spaces do not affect the gene functions and thus can be considered selectively neutral. The intergenic spaces from other insect mitogenomes have been reported to range from 216 bp in *Naupactus xanthographus* (Song et al., 2010) to 5,654 bp in *Protaetia brevitarsis* (Kim et al., 2014), suggesting that *Atta* mitogenomes are characterized by larger intergenic spacers.

Mitogenomes have had an impact on insect genetics, due to which genes have been utilized for phylogenetic studies. Regarding the genus *Atta*, Bacci et al. (2009) utilized partial mitochondrial genes (COI, tRNA leucine, and COII) for phylogenetic analysis; however, the advent of next-generation sequencing technologies has resulted in the complete sequencing of mitogenomes, allowing obtaining the robust phylogenetic analysis using the complete mitogenomes. This approach allows a phylogenetic reconstruction using complete mitogenomes and only coding regions or noncoding regions (intergenic spaces). In the present study, two phylogenetic analyses were conducted, using the complete genomes and only the coding regions. The result showed that phylogenetic analysis using the complete mitogenomes was more informative in both ML and PCA analyses than that using the coding regions, wherein the rate of

substitution in the complete mitogenome was larger than that in the coding regions and the principal component separated the *Atta* species.

The topologies using the complete mitogenomes were similar to the phylogeny using partial COI-tRNA-COII (Bacci et al., 2009), of which *A. texana* in the basal clade, whereas *A. cephalotes* and *A. colombica* in the second clade; *A. laevigata* and *A. opaciceps* in the third clade and *A. sexdens rubropilosa* in the fourth clade, however, the bootstrap values using the mitogenomes were larger than partial COI-tRNA-COII, indicating robust phylogenetic inference with mitogenomes.

Curiously, the mitogenome of *A. sexdens rubropilosa* (fourth clade) showed deletion of six tRNAs + NAD2 gene, suggesting that deletion can be typical for this clade. However, for the clade of *A. sexdens rubropilosa*, there are *A. sexdens sexdens*, *A. sexdens piriventris*, and *A. robusta* (Bacci et al., 2009), and genomes identified in the future will be able to clarify whether deletions are frequent in this clade. We conclude that *Atta* mitogenomes are characterized by high conservation in gene order and organization and the mitogenomes have giant intergenic spacers.

### **Acknowledgements**

Federal University of Alagoas for the laboratories and scientific support and the Fundação de Apoio à Pesquisa de Alagoas (FAPEAL) for funding this Project

## References

- Babbucci M, Basso A, Scupola A, Patarnello T and Negrisolo E (2014) Is it an ant or a butterfly? Convergent evolution in the mitochondrial gene order of Hymenoptera and Lepidoptera. *Genome Biol Evol* 6:3326–3343. doi: 10.1093/gbe/evu265
- Bacci M, Solomon SE, Mueller UG, Martins VG, Carvalho AOR, et al. (2009) Phylogeny of leafcutter ants in the genus *Atta* Fabricius (Formicidae: Attini) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol* 51: 427–437
- Bernt M, Donath A, Jühling F, Externbrink F, Florentz C, et al. (2013) MITOS: Improved *de novo* Metazoan Mitochondrial Genome Annotation. *Mol Phyl Evol* 69: 313–319
- Boisvert S, Raymond F, Godzaridis E, Laviolette F, Corbeil J (2012) Ray Meta: scalable de novo metagenome assembly and profiling. *Genome Biol* 13:R122. doi: 10.1186/gb-2012-13-12-r122
- Cameron SL (2014) Insect mitochondrial genomics: implications for evolution and phylogeny. *Annu Rev Entomol* 59:95–117. doi: 10.1146/annurev-ento-011613-162007
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15.
- Duan XY, Peng XY and Qian ZQ (2016) The complete mitochondrial genomes of two globally invasive ants, the Argentine ant *Linepithema humile* and the little fire ant *Wasmannia auropunctata*. *Conserv Genet Resour* 8:275–277. doi: 10.1007/s12686-016-0555-6
- Gotzek D, Clarke J, Shoemaker D (2010) Mitochondrial genome evolution in fire ants (Hymenoptera: Formicidae). *BMC Evol Biol* 10: 300

- Hasegawa E, Kobayashi K, Yagi N, Tsuji K (2011) Complete mitochondrial genomes of normal and cheater morphs in the parthenogenetic ant *Pristomyrmex punctatus* (Hymenoptera: Formicidae). *Myrmecol News* 15: 85–90
- Hebert, P.D.N., Penton, E.H., Burns, J.M., Janzen, D.H. & Hallwachs, W. (2004) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 14812-14817.
- Jombart T. and Ahmed I. (2011) adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics*. doi:10.1093/bioinformatics/btr521
- Katoh K, Standley DM (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol* 30:772–780. doi: 10.1093/molbev/mst010
- Kim MJ, Im HH, Lee KY, Han YS and Kim I (2014) Complete mitochondrial genome of the whiter-spotted flower chafer, *Protaetia brevitarsis* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Mitochondrial DNA* 25:177–178. doi: 10.3109/19401736.2013.792064
- Kumar S, Stecher G, and Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874.
- Liu N, Duan XY, Qian ZQ, Wang XY, Li XL and Ding MY (2016) Characterization of the complete mitochondrial genome of the myrmicine ant *Vollenhovia emeryi* (Insecta: Hymenoptera: Formicidae). *Conserv Genet Resour* 8:211–214. doi: 10.1007/s12686-016-0535-x
- Nei M. and Kumar S (2000) *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York



- Rodvalho CDM, Lyra ML, Ferro M and Bacci M (2014) The mitochondrial genome of the leaf-cutter ant *Atta laevigata*: A mitogenome with a large number of intergenic spacers. PLoS One 9:1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0097117
- Song H, Sheffield NC, Cameron SL, Miller KB, Whiting MF (2010) When phylogenetic assumptions are violated: base compositional heterogeneity and among-site rate variation in beetle mitochondrial phylogenomics. Syst Entomol. 35:429–448.
- Suen G, Teiling C, Li L, Holt C, Abouheif E, et al. (2011) The Genome Sequence of the Leaf-Cutter Ant *Atta cephalotes* Reveals Insights into its Obligate Symbiotic Lifestyle. Plos Genet 7: e1002007

## Legend figure

Figure 1. Complete gene map of *Atta opaciceps* (A), *Atta colombica* (B), *A. texana* (C) and *Atta sexdens rubropilosa* (D) mitogenomes. Genes of the circle are transcribed in the clockwise and counterclockwise directions, respectively. The protein-coding genes (green), rRNA (red) and tRNA (purple). The green ring represents the A+T contents and the blue ring shows C+G contents.

Figure 2. Genome size of the complete mitogenomes for *Atta* genus and outgroup. (A) Distribution of the genic and intergenic spacers. (B) Virtual gel showing the distribution of the intergenic spacers.

Figure 3. Phylogenetic analysis using maximum likelihood, which the phylogenetic relationships are represented by complete mitogenomes (A) and coding regions (B).

Figure S1. Organization of the *Atta* mitogenomes compared with outgroups. All coding regions displayed in the same order and direction.

Figure S2. Principal component analysis (PCA) for five species of the *Atta* genus and three species as outgroups. (A) PCA using the complete mitogenomes and (B) PCA using the coding regions (Genes + tRNA + rRNA). The colors denote values at first two principal component (PC) axes.

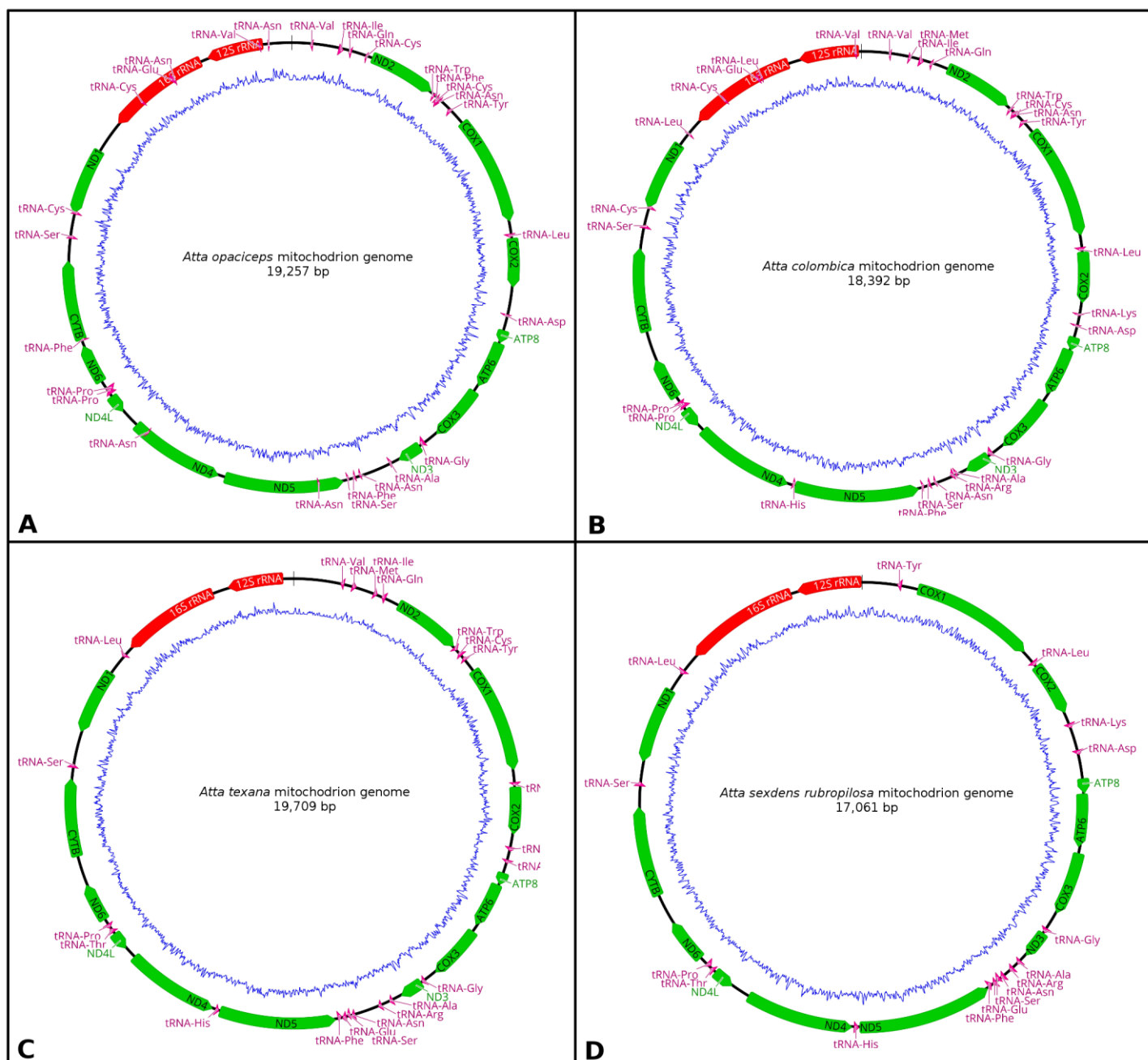


Figure 1. Complete gene map of *Atta opaciceps* (A), *Atta colombica* (B), *A. texana* (C) and *Atta sexdens rubropilosa* (D) mitogenomes. Genes of the circle are transcribed in the clockwise and counterclockwise directions, respectively. The protein-coding genes (green), rRNA (red) and tRNA (purple). The green ring represents the A+T contents and the blue ring shows C+G contents.

180x166mm (100 x 100 DPI)

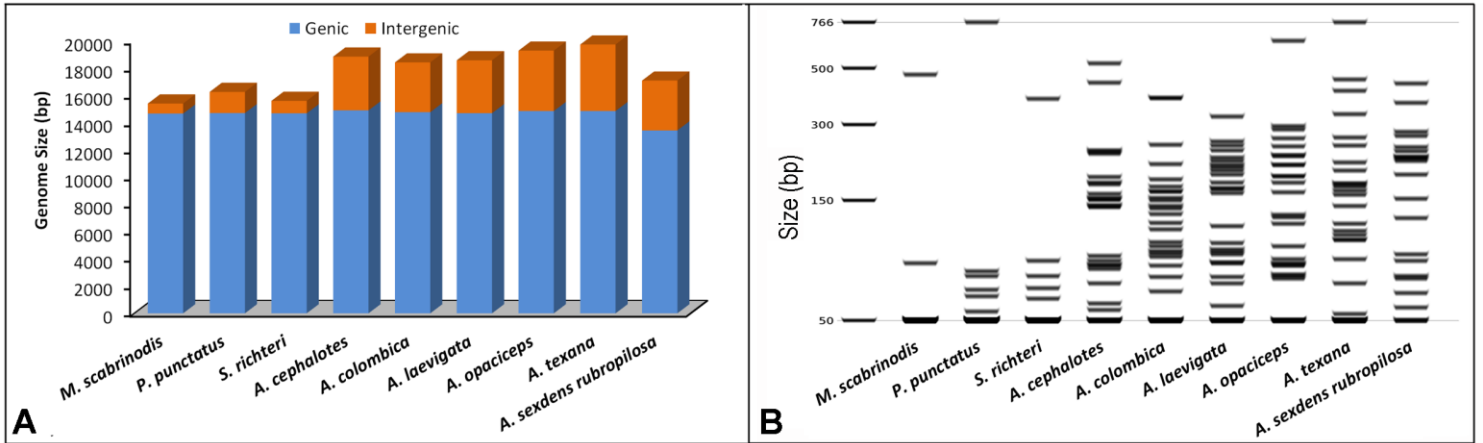


Figure 2. Genome size of the complete mitogenomes for *Atta* genus and outgroup. (A) Distribution of the genic and intergenic spacers. (B) Virtual gel showing the distribution of the intergenic spacers.

209x64mm (300 x 300 DPI)

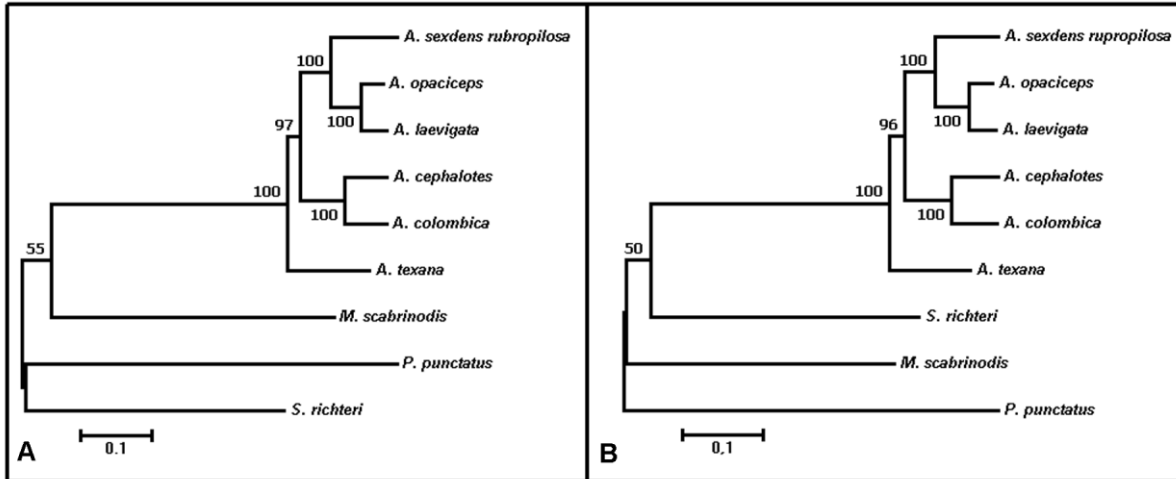


Figure 3. Phylogenetic analysis using maximum likelihood, which the phylogenetic relationships are represented by complete mitogenomes (A) and coding regions (B).

209x34mm (300 x 300 DPI)



Figure S1. Organization of the *Atta* mitogenomes compared with outgroups. All coding regions displayed in the same order and direction.

158x66mm (300 x 300 DPI)

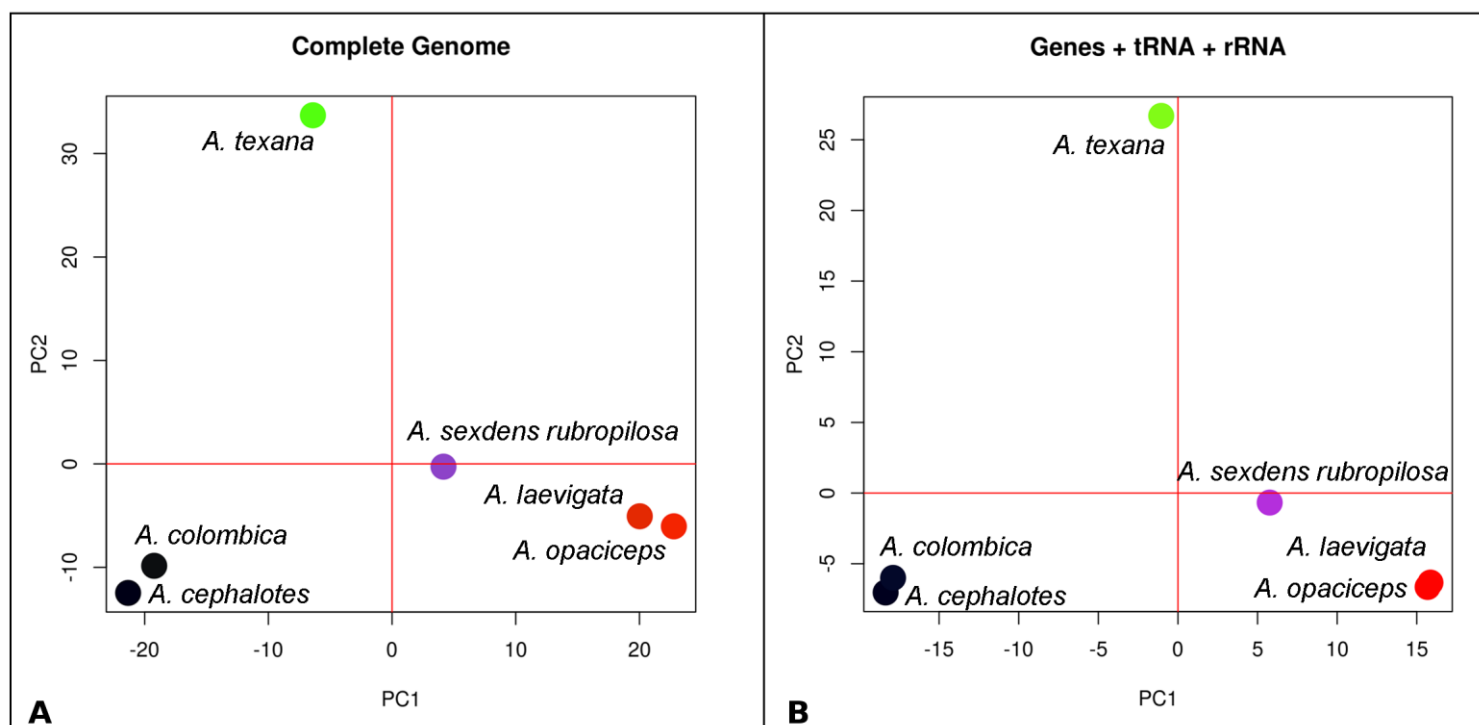


Figure S2. Principal component analysis (PCA) for five species of the *Atta* genus and three species as outgroups. (A) PCA using the complete mitogenomes and (B) PCA using the coding regions (Genes + tRNA + rRNA). The colors denote values at first two principal component (PC) axes.

197x96mm (300 x 300 DPI)

Table 1. Mitochondrial genome of the genus *Atta* and other species of the subfamily Myrmicinae utilized as the outgroup. The genome sizes in base pairs (bp) for the genome and the coding and noncoding regions. The genome annotation for tRNA (transport RNA), rRNA (ribosomal RNA), and protein-coding gene (genes) and the NCBI code for the genomes.

Species	Size (pb)			Annotations			NCBI	References
	Genome	coding	no-coding	tRNA	rRNA	Genes		
<i>M. scabrinodis</i>	15310	14655	738	21	2	13	LN607806	Babbucci et al., 2014
<i>P. punctatus</i>	16180	14693	1550	22	2	13	AB556947	Hasegawa et al., 2011
<i>S. richteri</i>	15560	14673	915	23	2	13	HQ215539	Gotzer et al., 2010
<i>A. cephalotes</i>	18815	14888	3946	23	2	13	HQ415764	Suen et al., 2011
<i>A. colombica</i>	18392	14756	3655	21	2	13	KY950644	This study
<i>A. laevigata</i>	18729	14684	3881	22	2	13	KC346251	Rodvalho et al., 2014
<i>A. opaciceps</i>	19257	14840	4433	22	2	13	KY950643	This study
<i>A. texana</i>	19709	14844	4880	22	2	13	MF417380	This study
<i>A. sexdens rubropilosa</i>	17061	13422	3656	16	2	12	MF591717	This study

#### 4 Capítulo II<sup>2</sup>

Filogeografia de *Atta opaciceps* Borgmeier, 1939 (Myrmicinae: Attini) revela ampla dispersão na Caatinga e Floresta atlântica

Josefa T. V. Barbosa<sup>2</sup>, Marcílio S. Barbosa<sup>1</sup>, Antônio E. G. Santana<sup>2</sup>, Cicero Almeida<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Recursos Genéticos, Campus Arapiraca, Universidade Federal de Alagoas, Brasil;

<sup>2</sup>Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas.

Título de curta duração: Filogeografia de *Atta opaciceps*

Autor correspondente:

Cícero Almeida

Campus de Arapiraca

Universidade Federal de Alagoas

Avenida Manoel Severino Barbosa s/n, Rodovia AL 115, km 6,5. Bairro Bom Sucesso

Arapiraca, AL, Brasil

Número de telefone: 55 823482-1831

E-mail: [cicerocarlos@pesquisador.cnpq.br](mailto:cicerocarlos@pesquisador.cnpq.br)

<sup>2</sup> Capítulo II está escrito de acordo com as normas de submissão do periódico Genetics and Molecular Biology. A submissão foi realizada no dia 26/04/2018.

## Resumo

*Atta opaciceps* Borgmeier, 1939 (Myrmicinae: Attini) é uma espécie de ocorrência no Nordeste do Brasil e possui distribuição nos biomas Caatinga e Floresta atlântica. Esses biomas possuem processos de expansão e retração ao longo das oscilações climáticas, que podem ter modelado a estruturação populacional de *A. opaciceps*. O Objetivo do presente trabalho foi analisar a estrutura populacional de *A. opaciceps* utilizando sequências do citocromo oxidase subunidade I (COI). Foram coletadas 127 amostras, extraído o DNA, amplificada a região do COI por PCR e sequenciada usando Bigdye 3.1. As sequências foram alinhadas e utilizadas para obter uma filogenia usando análise bayesiana e estruturação das populações por meio de simulação usando método bayesiano. Foram obtidas sequências de 468 pb, compreendendo cinco haplótipos distribuídos ao longo de toda a região geográfica. A estruturação populacional resultou em três grupos, com a presença de haplótipos distribuídos ao longo de toda a área de ocorrência. Os resultados indicam que os biomas Caatinga e Floresta atlântica caracterizam-se como refúgios e recente dispersão da espécie promoveram uma homogeneização das populações, sugerindo a espécie possui ampla resiliência as mudanças climáticas aos distintos biomas.

Palavras-chave: Caatinga; Floresta atlântica; genética de populações; formigas cortadeiras.



## Abstract

*Atta opaciceps* Borgmeier, 1939 (Myrmicinae: Attini) is a species of occurrence in northeastern Brazil and is distributed in the Caatinga and Atlantic Forest biomes. These biomes have expansion and retraction processes along the climatic oscillations, which can be modeled in a population planning of *A. opaciceps*. The objective was to analyze the population structure of *A. opaciceps* using sequences of the cytochrome oxidase I subunit (COI). A total of 127 samples were collected from the DNA, amplified in the CO 1 region by PCR and sequenced using Bigdye 3.1. Sequences were separated and used for analysis using Bayesian technique and structuring of expression facilities using the Bayesian method. Sequences of 468 bp were sequenced, comprising five haplotypes throughout a geographic region. The population structuring lasted for three groups, with the presence of haplotypes throughout the area of occurrence. The results are the Caatinga and Atlantic Forest biomes characterized as refuges and are the dispersion of the species that promotes the homogenization of the populations, suggesting a broad response capacity as the alteration of the target to the different biomes.

Keywords: Caatinga; Atlantic Forest; population genetics; cutting ants.

#### 4.1 Introdução

A estrutura da diversidade genética das espécies é resultado de processos demográficos históricos decorrentes de variações climáticas que afetam a compreensão evolutiva das espécies e a dispersão biológica (Hewitt, 2004; Thomé et al., 2010). As recorrentes oscilações climáticas nos últimos milhões de anos têm modificado o processo de evolução causando extinção, dispersão e mudanças na estrutura genética das populações (Hewitt, 2004). No Brasil, os biomas Caatinga e Floresta atlântica possui grandes diferenças ecológicas, em que a Floresta atlântica possui alta precipitação e grande biodiversidade e endemismo (Morellato and Haddad, 2000), enquanto a Caatinga apresenta baixa precipitação e vegetação heterógena com áreas geomorfológicas diferentes que podem atuar como fluxo gênico e importante contribuição para entendimento da estrutura gene de espécies endêmicas (Moro et al., 2015). A Floresta atlântica tem sido reportado como biomas climaticamente estável, enquanto a Caatinga com alta instabilidade (Costa et al., 2017).

*Atta opaciceps* Borgmeier, 1939 (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae) é uma espécie de formiga cortadeira pertencente a tribo Attini. *Atta opaciceps* pertence a um grupo de formigas que causam danos econômicos, pois atacam intensamente e constantemente as plantas em qualquer estágio de desenvolvimento, tornando assim um dos principais insetos-praga dos cultivos florestais. Possui importante papel nos diversos ecossistemas em que habitam, como participando no fluxo de energia e nutrientes, aeração do solo, bem como a manutenção da diversidade vegetal (Schultz e Brady, 2008).

No Brasil a distribuição das formigas do gênero *Atta* apresenta uma ampla distribuição geográfica, porém a espécie *Atta opaciceps* Borgmeier, 1939 (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae) é uma espécie restrita a região nordeste. *Atta*

*opaciceps* pertence a um grupo de formigas que causam danos econômicos, pois atacam intensamente e constantemente as plantas em qualquer estágio de desenvolvimento, tornando assim um dos principais insetos-praga dos cultivos florestais. Possui importante papel nos diversos ecossistemas em que habitam, como participando no fluxo de energia e nutrientes, aeração do solo, bem como a manutenção da diversidade vegetal (Schultz e Brady, 2008). Estudos populacionais em *A. opaciceps* se limitam a a morfologia e distribuição geográfica (Della-Lucia et al., 2011). A espécie está distribuída nos biomas Caatinga e Floresta atlântica e que as diferenças entre os biomas podem ter modelado a estrutura genética da espécie, podemos assim investigar as seguintes questões: (1) Qual é o bioma ancestral de *A. opaciceps*? (2) A expansão e retração da Floresta atlântica contribuiu para distribuição de *A. opaciceps*? (3) Quais as barreiras de fluxo gênico? Para responder a essas questões, o presente trabalho analisou a estrutura filogeográfica de *A. opaciceps* usando sequências do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade I (COI).

## **4.2 Material e Métodos**

### **4.2.1 Amostragem e extração de DNA**

Foram coletas 137 formigas em ninhos de *A. opaciceps*, distribuídos em nove localidades da região Nordeste do Brasil. As localidades foram registradas com georeferenciamento (Tabela 1). Para cada ponto de coleta realizada, foram coletados mínimo de 30 indivíduos. A extração de DNA foi realizada utilizando Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (Doyle and Doyle, 1987). A quantidade e a qualidade do DNA foram analisadas utilizando um espectrofotômetro e 1% em gel de agarose, respectivamente.

#### 4.2.2 Amplificação e sequenciamento

O DNA foi utilizado para amplificação por PCR de parte do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade I (COI). As amplificações por PCR foram realizadas utilizando 5  $\mu$ l (tampão de reação), 0,2 U (Taq DNA polimerase), dNTPs (0,5 mM cada), primers (0,1  $\mu$ M cada) e 1  $\mu$ L de DNA (100-300 ng), em um volume final de 50  $\mu$ L. As condições para a amplificação incluíram uma etapa de desnaturação inicial a 94 °C durante 3 min, seguidos de 35 ciclos de 30 s a 94 °C para desnaturação do DNA, anelamento de 30 s a 48 °C, 72 °C por 1 min para extensão e uma etapa de extensão final a 72 °C por 10 min. As reações de PCR foram conduzidas em um termociclador BioCycler e os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a

Fonte: Autora, 2018. Amplificação. Os produtos da PCR foram sequenciados usando um BigDye® Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®) com eletroforese em um analisador genético ABI 3500 (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, EUA).

#### 4.2.3 Análise de haplótipos

As sequências foram alinhadas usando MAFFT v7.017 (Katoh e Standley, 2013). O número de haplótipos, diversidade de haplótipos ( $h$ ), diversidade de nucleotídeos ( $\pi$ ) e os testes de neutralidade ( $F_s$ ):  $D$  de Tajima (1989),  $F_u$  e  $L_i$  (1993) e  $F_u$  (1997) foram calculados utilizando o software DnaSP 5.10.01 (Librado e Rozas, 2009).

O relacionamento genealógico entre os haplótipos foram estimados usando o método median-joinig implementado no software Network 4.613 (Bandelt et al., 1999). A reconstrução filogenética entre os haplótipos foi obtida usando o método bayesiano por meio do modelo HKY utilizando o software Beast v1.8.0 (Drummond e Rambaut,

2007) e posterior distribuição foi analisada usando Markov Chain Monte Carlo (MCMC) para 10 milhões de etapas. A convergência dos parâmetros foi verificada usando o software Tracer 1.5 (Rambaut, 2009). O modelo de substituição HKY foi obtido utilizando o método Bayesian Information Criterion Evolutionay, implementado no software Mega 7 (Tamura et al., 2016).

#### 4.2.4 Estruturação das populações

A estruturação das populações foi realizada usando o software SAMOVA (spatial analysis of molecular variance) (Dupanloup et al., 2002). Este software usa simulações para identificar grupos de populações ( $k$ ) que são geograficamente homogêneas e que maximizam as diferenças entre os grupos, permitindo obter a variação entre grupos ( $F_{CT}$ ), entre localidades dentro de cada grupo ( $F_{SC}$ ) e entre os grupos em relação a amostra total ( $F_{ST}$ ). A análise de SAMOVA foi conduzida com 1000 interações para  $k = [2, \dots, 9]$  grupos. A análise de cluster foi construída usando uma abordagem bayesiana para agrupamento filogeográfico, implementando o pacote Bayesian Phylogeographic and Ecological Clustering (BPEC) (Manolopoulou et al., 2011) em software R (R Development Core Team, 2005), usando os parâmetros  $ds = 2$ , número máximo de migração = 5 e 10 milhões de etapas no MCMC.

#### 4.2.5 Modelagem de nicho ecológico

A modelagem de nichos ecológicos foi realizada utilizando o MAXENT (Versão 3.3.3K, Phillips et al., 2006). Os nichos climáticos utilizados foram as 19 variáveis BIOCLIM disponíveis no Banco de dados WorldClim (<http://www.worldclim.org>). Os dados ambientais contêm três períodos diferentes: Biolim Camadas para o período 1950-2000 em uma resolução de 30 segundos de arco; O último máximo glacial (LGM: ~ 21,000 anos BP), as condições climáticas em 2.5 arc de resolução e a última

interglacial (LIG: ~ 120,000-140,000 anos BP), em uma resolução de 30 segundos de arco. Para construir os nichos ecológicos, as corridas foram realizadas com os parâmetros: limiar de convergência (0.00001), máximo Iterações (500) e prevalência padrão (0,5). Os resultados foram analisados e as figuras obtidas usando o pacote raster implementado no software estatístico R.

### 4.3 Resultados

#### 4.3.1 Distribuição e análise de haplótipos

A análise das sequências mostrou a presença de cinco diferentes haplótipos que foram nomeados de A, B, C, D e E (Figura 1A). Entre os haplótipos, o haplótipo A foi encontrado em maior proporção e maior dispersão dentro da região de ocorrência de *A. opaciceps*. A diversidade de nucleotídeos ( $\pi$ ) foi 0,00168 e a diversidade haplótipos 0,643. O teste de Fu e Li foi  $D=0,91429$  ( $P>10$ ), sendo não significativo e o teste de Tajima foi  $D= 0,14619$  ( $P>0,10$ ) também não significativo. Os cinco haplótipos encontrados são separados somente por uma ou duas substituições (Figura 1B) e que ao longo de toda a sequência foram detectados somente quatro sítios polimórficos (Figura 1B). Os resultados mostraram uma ampla distribuição dos haplótipos ao longo de toda a região de ocorrência da espécie, no entanto, o haplótipo A foi mais frequente na Floresta Atlântica, enquanto os haplótipos C, D e E foram encontrados somente na Caatinga. Para a Floresta Atlântica a análise filogenética entre os haplótipos mostrou que o haplótipo B é o mais relacionado com o ancestral, sugerindo que a partir do haplótipo B tenham surgido os demais (Figura 2). Deve-se enfatizar que o suporte para o clado que contém o haplótipo B apresentou 100% em relação aos demais haplótipos.

#### 4.3.2 Estruturação de populações

A análise de estruturação de populações utilizando SAMOVA detectou quatro grupos populacionais, com  $FCT = 0.82$  ( $P < 0.0001$ ), com 88,16% da variação entre os grupos (Tabela 2). Foi observado que as localidades da Floresta Atlântica ou da borda Floresta Atlântica com a Caatinga formaram um grupo (Grupo 4), no entanto, contendo localidade da região central da Caatinga. Esse grupo é caracterizado por apresentar o haplótipo mais frequente (Haplótipo A). Os demais grupos foram correspondentes aos demais haplótipos (Tabela 1). A análise de cluster usando a abordagem BPEC detectou dois grupos: um localizado na região Floresta Atlântica e outro grupo localizado na região central da Caatinga (Figura 3).

#### 4.3.3 Modelagem de nicho ecológico

A projeção do modelo sobre os parâmetros paleoclimáticos para o presente, LGM e o LIG sugeriram áreas comparativamente adequadas à distribuição de *A. opaciceps* (Figura 4). Comparando as previsões para o presente e o LGM, observamos um maior aumento da população no presente, em que está se expandindo aumentando a sua concentração. Comparando a distribuição atual com LIG, também observamos uma alta distribuição e expansão da espécie presente nesse período.

### 4.4 Discussão

Os resultados obtidos no presente estudo fornecem evidências que contribuem para a compreensão da história evolutiva e os padrões de variabilidade genética da espécie *A. opaciceps*, associados à região Nordeste do Brasil, mostrando a dispersão da espécie ao longo dos biomas Caatinga e Floresta Atlântica. As populações de *A. opaciceps* apresentaram estrutura genética, no entanto, foi observado ampla dispersão e elevado fluxo gênico entre a Caatinga e Floresta Atlântica, sugerindo que as barreiras

biogeográficas atuais não são suficientes para configurar os biomas como específicos para grupos populacionais. Essa interpretação é corroborada pela simulação de nicho ecológico, em que desde o último máximo glacial (LGM) *A. opaciceps* tem se expandido tanto na Caatinga como na Floresta Atlântica.

Possivelmente, entre o último interglacial e último máximo glacial, *A. opaciceps* pode ter se limitado na região próxima de Prata (PB) e que posteriormente tenha se expandido para os demais locais da região Nordeste do Brasil. Ao certo não se sabe que tipo de barreira geográfica ou mesmo biológica determinou a distribuição e expansão de *A. opaciceps*. Observou-se que as diferenças entre os haplótipos são bastante pequenas, com somente uma ou duas substituições, indicando que a diversificação da espécie no Bioma é recente e que no Bioma Caatinga foi observado a maioria dos haplótipos, sugerindo ser a Caatinga o centro de origem da espécie e o bioma ancestral da espécie. Assim, podemos aceitar que a distribuição espacial está relacionada com questões de adaptação para cada ambiente. Os biomas Caatinga e Floresta Atlântica apresentam características distintas, sendo a Floresta Atlântica um bioma climaticamente estável, enquanto a Caatinga é um bioma instável com diversas eco-regões (Costa et al., 2017), no entanto, *A. opaciceps* tem se mostrado bastante resiliente quanto as diferenças climáticas e geomorfológicas, apresentando elevada aptidão aos diferentes ambientes. Adicionalmente, a expansão e retração da Floresta Atlântica não tem promovido a mistura de indivíduos de ambos os biomas. A expansão e retração da Floresta Atlântica tem sido demonstrada por simulação (Costa et al., 2017) e tem contribuído para explicar a dispersão de algumas espécies.

As evidências do presente trabalho mostram a Caatinga como o bioma ancestral e possivelmente tenha sido um refúgio durante as oscilações climáticas, como proposto por simulação para a Floresta Atlântica (Carnaval e Moritz, 2008) e para a Caatinga



(Werneck et al., 2011). Esses modelos sugerem que durante os processos de flutuação climática a diversidade genética ficou restrita a pequenas regiões. No entanto, a distribuição de *A. opaciceps* ocorre ao longo de dois refúgios propostos, sugerindo elevado nível de dispersão da espécie nos atuais biomas. Esse comportamento de dispersão de formigas pode estar relacionado com a ausência de barreiras, facilitado pela rápida dispersão da revoada (voo de fêmeas na época de reprodução) (Seal et al., 2011).

O padrão de distribuição de *A. opaciceps* difere de outros organismos: tanto animal (Werneck et al., 2015) como em vegetal (Gonçalves-Oliveira et al., 2017) em que as diferenças nos biomas atuam como barreiras ao fluxo gênico. Concluímos que *A. opaciceps* apresenta uma estruturação filogeográfica distribuída nos biomas da Floresta Atlântica e da Caatinga, sendo o bioma Caatinga o provável bioma ancestral e que as diferenças climáticas e geomorfológicas não atuam como barreira ao fluxo gênico.

#### Agradecimentos

Universidade Federal de Alagoas pelo laboratório e suporte científico e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por financiar este projeto.

## Referências

- Bandelt H J, Forster P, Rohl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16:37-48. doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036
- Carnaval A C e Moritz C (2008) Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Biogeography* 35:1187-1201. doi.org/10.1111/j.1365-2699.2007.01870.x
- Della Lucia T M C et al (2011) Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo. Viçosa, MG: Editora UFV, 421 p.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15.
- Dupanloup I, Schneider S, Excoffier L (2002) A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology* 11:2571-258. doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01650.x
- Drummond A. J e Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7:1-8. doi.org/10.1186/1471-2148-7-214
- Fu Y X (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics Society and America* 147:915-925.
- Fu Y X e Li W H (1993) Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133:693-709.
- Hewitt G M (2004) Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 359:183-195. doi: 10.1098/rstb.2003.1388

- Katoh K e Standley DM (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol* 30:772–780. doi: 10.1093/molbev/mst010
- Librado P e Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451-1452. doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187
- Manolopoulou I, et al (2011) A Bayesian approach to phylogeographic clustering. *Interface Focus* 1: 909-921. doi: 10.1098/rsfs.2011.0054
- Morellato L P C e Haddad C F B (2000) Introduction: the Brazilian Atlantic Forest. *Biotropica* 32:786-792. doi.org/10.1646/0006-3606.
- R CORE TEAM (2005). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rambaut A D A (2017) Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology: Tracer v1.5. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer>. Acesso em: 15 ago. 2017.
- Schutz T R e BRADY S G (2008) Major evolutionary transitions in ants agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences, Washington* 105:5435-5440. doi.org/10.1073/pnas.0711024105
- Seal J N et al (2011) Phylogeography of the parthenogenic ant *Platythyrea punctata*: highly successful colonization of the West Indies by a poor disperser. *Journal of Biogeography* 38:868-882. doi.org/10.1111/j.1365-2699.2010.02447.x
- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics Society of America* 123:585-595.
- Werneck F P et al (2011) Revisiting the historical distribution of seasonally dry tropical forests: new insights based on palaeodistribution modelling and palynological

evidencegeb. Global Ecology and Biogeography 20:272-288.  
[doi.org/10.1111/j.1466-8238.2010.00596.x](https://doi.org/10.1111/j.1466-8238.2010.00596.x)

### Legenda de Figuras

Figura 1. Mapa do Brasil com a distribuição geográfica das populações e distribuição dos haplótipos para as espécies de *Atta*. Cada local de coleta é representado por um ponto. As cores no gráfico de torta correspondem a haplótipos seguindo a lista na legenda.

Figura 2. Análise filogenética para os haplótipos. As relações filogenéticas usando a abordagem bayesiana. Esta análise mostra o tempo de divergência entre os haplótipos em milhões de anos (Ma).

Figura 3. Análise de cluster construída usando a abordagem Bayesiana para o agrupamento filogeográfico. As cores representam os clusters. Cores de fundo ou sombreadas indicaram incerteza quanto aos respectivos clusters. Os pontos indicam os locais de amostragem.

Figura 4: Distribuição geográfica para áreas preditas climaticamente para a ocorrência de *A. opaciceps* utilizando variáveis bioclimáticas atuais e do passado. Para o presente (agora, 0 anos BP), Last Glacial Maximum (LGM, 21,000 anos BP) e Last Interglacial (LIG, 120,000-140,000 anos BP). As cores quentes (vermelho/amarelo) representam áreas com alta probabilidade de ocorrência de *A. opaciceps*.

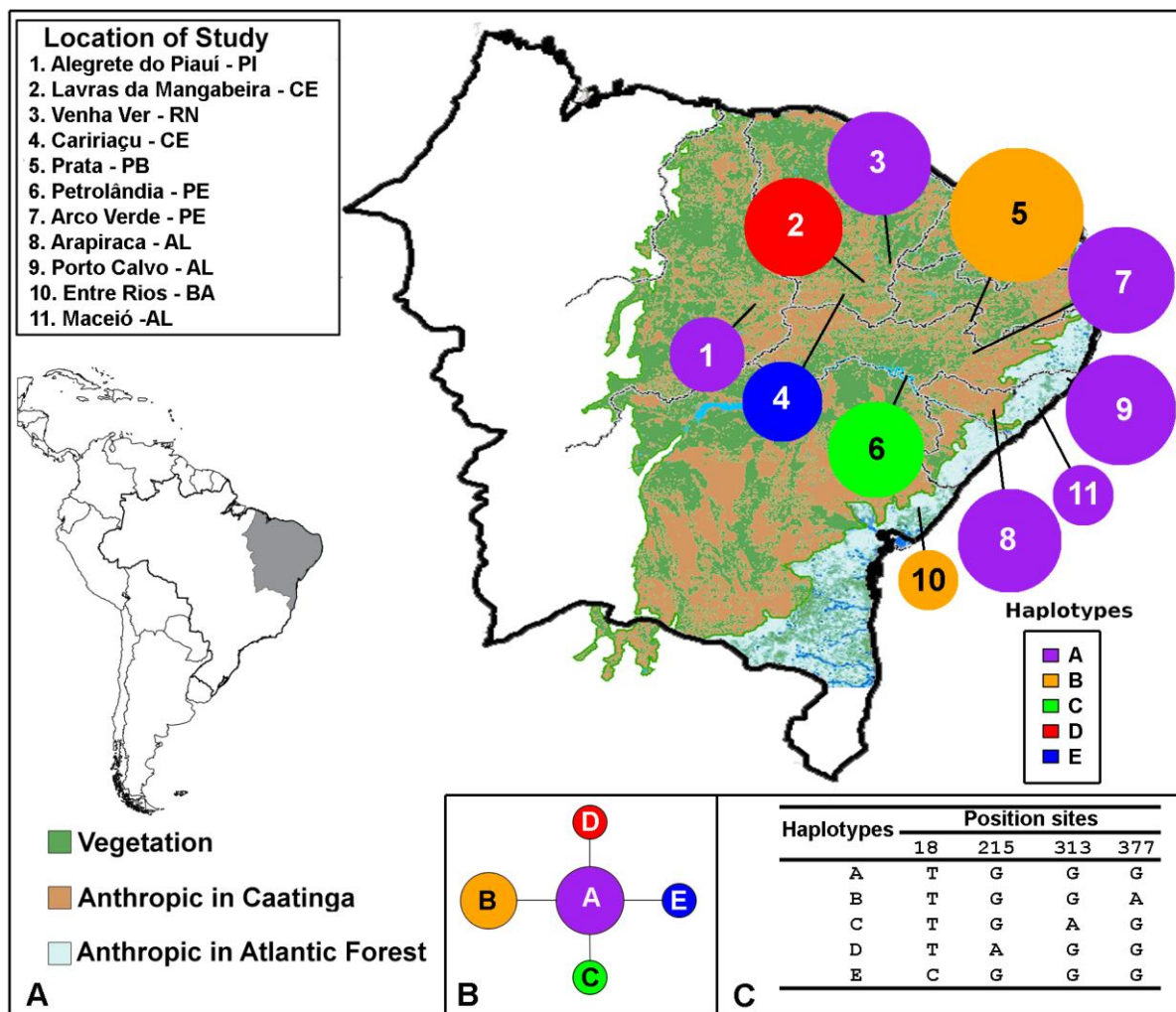


Figura 1. Mapa do Brasil com a distribuição geográfica das populações e distribuição dos haplótipos para as espécies de *Atta*. Cada local de coleta é representado por um ponto. As cores no gráfico de torta correspondem a haplótipos seguindo a lista na legenda.

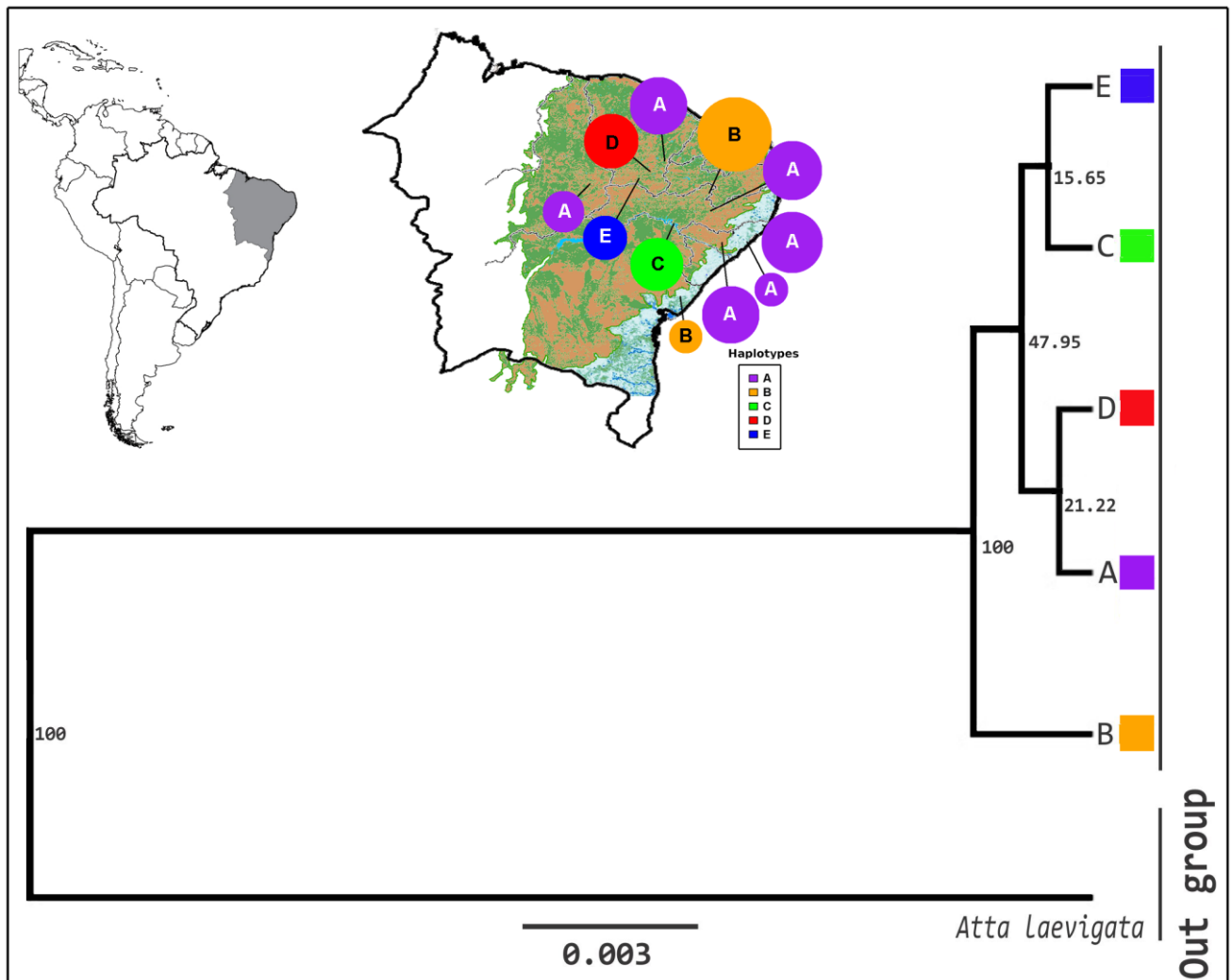


Figura 2. Análise filogenética para os haplótipos. As relações filogenéticas usando a abordagem bayesiana. Esta análise mostra o tempo de divergência entre os haplótipos em milhões de anos (Ma).

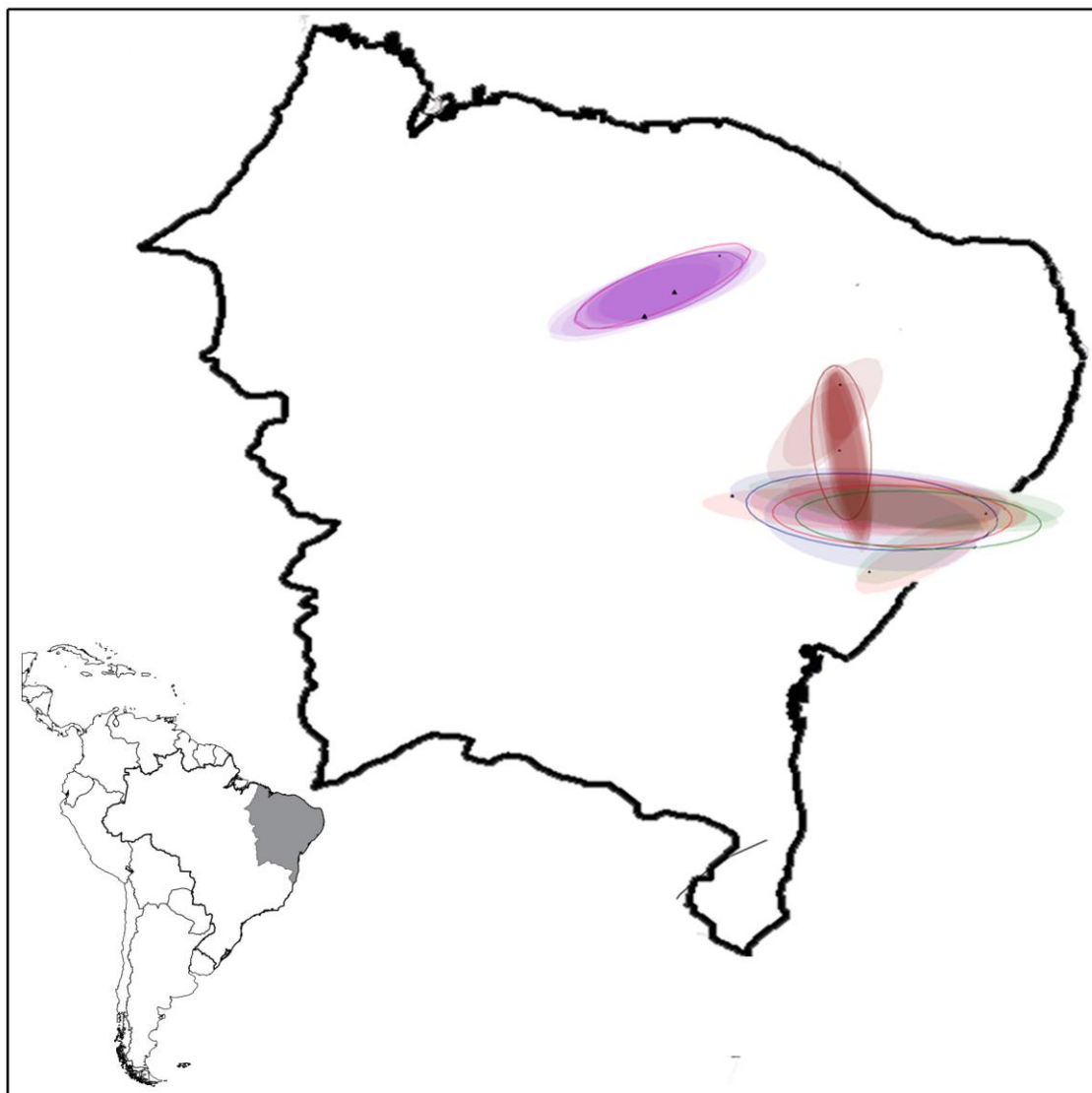


Figura 3. Análise de cluster construída usando a abordagem Bayesiana para o agrupamento filogeográfico. As cores representam os clusters. Cores de fundo ou sombreadas indicaram incerteza quanto aos respectivos clusters. Os pontos indicam os locais de amostragem.



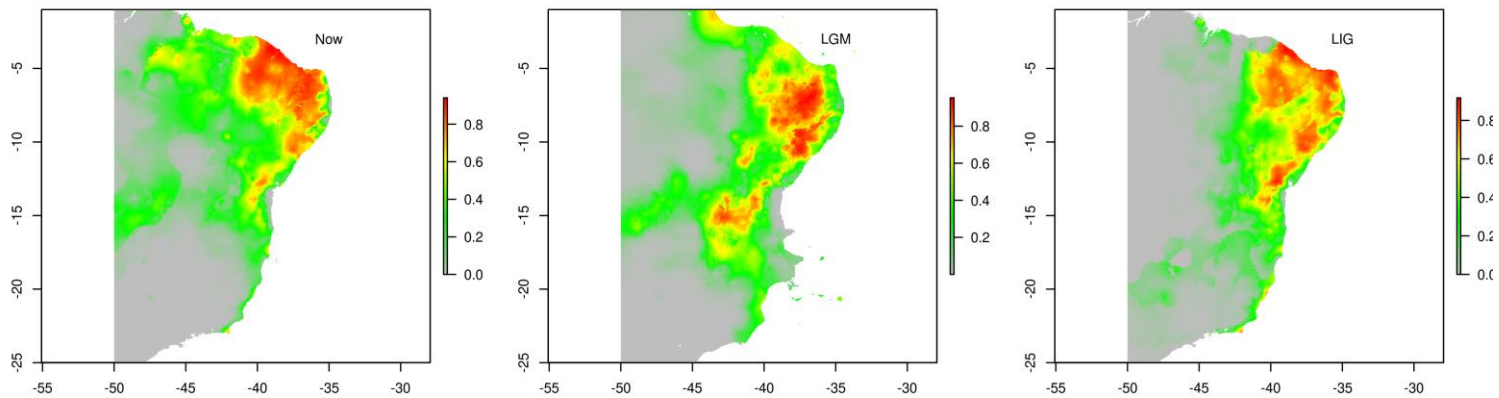


Figura 4. Distribuição geográfica para áreas preditas climaticamente para a ocorrência de *A. opaciceps* utilizando variáveis bioclimáticas atuais e do passado. Para o presente (agora, 0 anos BP), Last Glacial Maximum (LGM, 21,000 anos BP) e Last Interglacial (LIG, 120,000-140,000 anos BP). As cores quentes (vermelho/amarelo) representam áreas com alta probabilidade de ocorrência de *A. opaciceps*.

Tabela 1: Detalhe dos locais de coleta de *Atta opaciceps* na região Nordeste do Brasil, indicando as coordenadas georeferenciadas e o grupo dos haplótipos.

Localidade	Coordenadas		Haplótipos	SAMOVA
	Latitude	Longitude		Grupos
Alegrete do Piauí (PI)	7°14'S	40°51'W	A	G4
Venha Ver (RN)	6°19'S	38°29'W	A	G4
Arco Verde (PE)	8°25'S	37°03'W	A	G4
Arapiraca (AL)	9°45'S	36°39'W	A	G4
Porto Calvo (AL)	9°02'S	35°23'W	A	G4
Maceió (AL)	9°39'S	35°44'W	A	G4
Prata (PA)	7°41'S	37°04'W	B	G2
Entre Rios (BA)	11°56'S	38°05'W	B	G2
Petrolândia (PE)	8°58'S	38°13'W	C	G4
Lavras da Mangabeira (CE)	6°45'S	38°57'W	D	G3
Caririaçu (CE)	7°02'S	39°17'W	E	G1

Tabela 2: Análise Espacial da Variação Molecular (SAMOVA)

Causa de variação	d.f.	Porcentagem de variação	P-valor	
Entre os grupos	3	82,16	$F_{CT} = 0.82$	$P < 0.0001$
Entre as localidades dentro de grupos	5	17,84		
Dentro de localidades	126	00,00		
Total	136	100.00		

Grupo 1 (Caririaçu); Grupo 2 (Prata, Entre Rios); Grupo 3 (Lavras), Grupo 4 (Alegrete, Arapiraca, Arco-verde, Petrolândia, Porto Calvo, Venha Ver, Maceió)

