

**LIRIANA BELIZÁRIO CANTAGALLI**

**FORMIGAS CORTADEIRAS: ASPECTOS GENÉTICO-BIOQUÍMICOS DA  
CONTAMINAÇÃO COM AGROTÓXICOS E ESTRUTURA DE POPULAÇÕES**

**MARINGÁ  
PARANÁ – BRASIL  
AGOSTO – 2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**LIRIANA BELIZÁRIO CANTAGALLI**

**FORMIGAS CORTADEIRAS: ASPECTOS GENÉTICO-BIOQUÍMICOS DA  
CONTAMINAÇÃO COM AGROTÓXICOS E ESTRUTURA DE POPULAÇÕES**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de Doutor.

**MARINGÁ  
PARANÁ – BRASIL  
AGOSTO – 2009**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

C229f Cantagalli, Liriana Belizário  
Formigas cortadeiras: aspectos genético bioquímicos da contaminação com agroquímicos e estrutura de populações / Liriana Belizário Cantagalli. -- Maringá : [s.n.], 2009.  
67f. : il.

Orientadora : Prof. Dr. Maria Claudia Colla Ruvolo-Takasusuki.  
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, 2009.

1. Formiga cortadeira (*Acromyrmex niger*) - Potencial bioindicador - Avaliação. 2. Formiga cortadeira (*Atta sexdens rubropilosa*) - Variabilidade genética. 3. Formiga cortadeira (*Acromyrmex niger*) - Controle e manejo. I. Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento. II. Título.

CDD 21.ed. 595.796

Aos meus pais, José Cantagalli e Juvelina Belizário Cantagalli, por todo amor e incentivo, dedico.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que se faz presente em todos os momentos da minha vida.

Ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Estadual de Maringá, pela oportunidade da realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES, pelo apoio financeiro.

À minha família querida, sem a qual eu não seria tão feliz.

À minha orientadora, professora doutora Maria Cláudia Colla Ruvolo Takasusuki, pela sua dedicação.

À professora doutora Claudete Aparecida Mangolin, por ajudar na realização deste trabalho.

Aos professores dos Laboratórios de Genética Animal e de Cultura de Tecidos Vegetais e Eletroforese.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, pela contribuição na minha formação.

Aos membros da banca examinadora, professor doutor Odair Correa Bueno, professor doutor Rogério Pincela, professor doutor Hélio Conte e professor doutor Vagner de Alencar Arnaut Toledo, pelas contribuições.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Celular e Genética, que contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos Secretários do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, Francisco José da Cruz e Maria Valquíria Magro, pela ajuda e trabalho indispensáveis.

Aos amigos que conquistei durante o curso de pós-graduação e principalmente à Ana Lúcia Paz Barateiro Stuchi, Denise Alves Lopes e Diana Lavoratto, pelos momentos agradáveis de companheirismo. Cada amigo que conquistei representam uma parte de minhas vitórias. Obrigada a todos.

## BIOGRAFIA

LIRIANA BELIZÁRIO CANTAGALLI, filha de José Cantagalli e Juvelina Belizário Cantagalli, nasceu em Paranaguá, Estado do Paraná, no dia 04 de março de 1981.

Concluiu o Ensino Fundamental, em 1996, no Colégio Santo Inácio, em Maringá, Paraná. Em 1999, na mesma Instituição de Ensino, concluiu o Ensino Médio.

Formou-se em Ciências Biológicas, pela Universidade Estadual de Maringá, em maio de 2004.

Ainda em 2004, iniciou o Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, da Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de Análise Genética de Vertebrados e Invertebrados Sociais. Obteve o título de Mestre em dezembro de 2005.

Em março de 2006, iniciou Curso de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, da Universidade Estadual de Maringá.

## ÍNDICE

RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	vii
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	5
2.1. Estrutura de população e comportamento social.....	5
2.2. Bioindicadores da qualidade ambiental .....	8
2.3. Atividades de forrageamento .....	10
2.4. Métodos de controle de formigas cortadeiras .....	12
2.5. Isoenzimas e PCR-RAPD .....	14
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	17
CAPÍTULO I - Utilização de formigas cortadeiras <i>Acromyrmex niger</i> Smith, 1858 (Hymenoptera; Formicidae) como bioindicadores de resíduos de agrotóxicos .....	
RESUMO .....	24
ABSTRACT .....	25
1. INTRODUÇÃO .....	26
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	28
2.1. Material biológico.....	28
2.2. Eletroforese PAGE .....	28
2.3. Caracterização bioquímica .....	29
2.4. Bioensaio com inseticida .....	29
2.5. Análise dos dados .....	30
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	31
4. CONCLUSÕES .....	38
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	39
CAPÍTULO II - Estrutura de populações por meio de RAPD em <i>Atta sexdens</i> <i>rubropilosa</i> forel, 1908 (Hymenoptera, formicidae) .....	
RESUMO .....	42
ABSTRACT .....	43
1. INTRODUÇÃO .....	44
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	46
2.1. Coleta das amostras biológicas .....	46
2.2. Isolamento do DNA .....	46
2.3. Amplificação da reação PCR-RAPD, separação e visualização dos produtos.....	47
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	50
4. CONCLUSÕES .....	55
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	56
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	57

## RESUMO

CANTAGALLI, Liriana Belizário, D. Sc. Universidade Estadual de Maringá, agosto de 2009. **Formigas cortadeiras: Aspectos genético-bioquímicos da contaminação com agrotóxicos e estrutura de populações.** Professor-orientador: Dr<sup>a</sup>. Maria Claudia Colla Ruvolo-Takasusuki. Professores conselheiros: Dr<sup>a</sup>. Claudete Aparecida Mangolin e Dr. Erasmo Renesto.

O presente trabalho avaliou o potencial bioindicador da formiga cortadeira *Acromyrmex niger*, frequentemente exposta a diferentes agroquímicos usados no controle de pragas e à variabilidade genética e estrutura de população da *Atta sexdens rubropilosa*, coletadas em cinco regiões diferentes. No estudo do potencial bioindicador de *A. niger*, a técnica de eletroforese foi utilizada para caracterização bioquímica das isoenzimas esterases, aliada a alterações na expressão das isoenzimas após a contaminação com organofosforados, neonicotinóides e reguladores de crescimento. A correlação entre dose e mortalidade de *A. niger* após a contaminação com neonicotinóide thiametoxam, mostrou que a avaliação da mortalidade dessas formigas tem potencial para ser utilizado como parâmetro para detecção de resíduos desse agrotóxico. A análise das esterases não pode ser considerada um bom bioindicador de resíduos dos agrotóxicos malathion, thiametoxam e regulador de crescimento (azaractina). Para o estudo da variabilidade das formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa* coletadas em Maringá, Ivatuba, Itambé, Presidente Prudente e Dracena, foi utilizada a técnica PCR-RAPD. O valor de  $G_{ST}$  (0,2372) indicou que as populações estão moderadamente diferenciadas. O elevado valor de polimorfismo (83.11%) e a capacidade de cruzamento entre as populações presentes nas regiões estudadas indicam que essa espécie de formiga cortadeira está bem adaptada à região e que deverão ser desenvolvidos programas integrados de controle dessa praga.

Palavras-chave: *Acromyrmex niger*, bioindicador, isoenzimas, *Atta sexdens rubropilosa*, variabilidade genética, PCR-RAPD.

## ABSTRACT

CANTAGALLI, Liriana Belizário, D. Sc. Universidade Estadual de Maringá, August, 2009. **Leaf-cutting ants: Genetic biochemical aspects of contamination by the use of agrotoxics and populaton structures.** Adviser: Dr<sup>a</sup>. Maria Cláudia Colla Ruvolo-Takasusuki. Commitee members: Dr<sup>a</sup>. Claudete Aparecida Mangolin and Dr. Erasmo Renesto.

This study evaluated the bioindicator potential of leaf-cutting ants *Acromyrmex niger*, often exposed to various agrochemicals used for pest control and the genetic variability and population structure of *Atta sexdens rubropilosa*, collected in five different regions. In the study of bioindicator potential of *A.niger* the electrophoresis technique was used for biochemical characterization of esterase isozymes, combined with changes in the expression of isozymes after the contamination by organophosphates, neonicotinoids and azaracthine. The correlation between dose and mortality of *A. Niger* after contamination by neonicotinoids, showed that the evaluation of the mortality of these ants has the potential for detection of pesticide residue. The analysis of esterase can not be considered a good bioindicator of residues of the following insecticides: malathion, neonicotinoid and azaracthine. To study the variability of leaf-cutting ants *Atta sexdens rubropilosa* collected in Maringá, Ivatuba, Itambé, Presidente Prudente and Dracena, it was used the PCR-RAPD technique. The amount of  $G_{ST}$  (0.2372) indicated that the populations are moderately differentiated. The high value of polymorphism (83.11%) and the ability to cross among the populations present in the regions studied indicate that this species of leaf-cutting ant is well adapted to the area, and that integrated control programs must be developed.

Key words: *Acromyrmex niger*, bioindicator, isozymes, *Atta sexdens rubropilosa*, genetic variability, PCR-RAPD.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

As formigas são insetos sociais pertencentes à classe Insecta, Ordem Hymenoptera e Família Formicidae (Holldobler e Wilson, 1990). Seu modo de vida social é considerado um dos mais complexos conhecidos no reino animal. Algumas espécies desses diminutos insetos formam colônias que agrupam até 300 milhões de indivíduos em um só ninho, onde cada indivíduo desempenha sua tarefa específica em prol do bem estar de toda colônia (Caetano et al., 2002).

O nome formiga deriva do ácido fórmico, uma substância produzida pela glândula ácida das formigas, particularmente daquelas que pertencem à subfamília Formicinae. Seu tamanho pode variar de 1 mm a 4,5 cm. Apesar de sua ampla distribuição e abundância e, apesar de serem e terem sido conhecidas por todas as culturas humanas, pouco é o que sabemos sobre elas. A mimercologia, ciência que se encarrega de estudar as formigas, nasceu em meados do século passado e é considerada um ramo importante da Entomologia (Caetano et al., 2002).

As formigas apresentam uma variedade de funções ecológicas, entre elas, desempenham a função de predadoras de diversos artrópodes, muitos deles pragas agrícolas, além de serem predadores de outras espécies de formigas (Fowler et al, 1991). Nas regiões de pastagem, desempenham funções relevantes, pois se comportam como consumidores primários, cortando parte das plantas, e como secundários, ao preda pequenos invertebrados (Holldobler e Wilson, 1990). Apresentam, ainda, grande importância na dispersão de sementes, contribuindo para o reflorestamento de muitos ecossistemas e promovem sua germinação, pois removem as polpas das frutas (Peternelli, 2004). São, muitas vezes, responsáveis pela poda de algumas plantas, promovendo seu crescimento vegetativo e exercem importante papel na aeração do solo (Holldobler, 1990), além de incorporarem matéria orgânica na terra, tornando-a fértil (Moutinho et al., 2003).

Já foram descritas mais de 12.000 espécies de formigas, sendo que a grande diversidade e abundância deste grupo se devem, em parte, aos seus inúmeros hábitos alimentares. (Jesus e Bueno, 2007). Mas, apesar de 95% das

espécies de formigas existentes na região tropical serem consideradas benéficas ao homem e à natureza, os 5% restantes, as cortadeiras, são responsáveis por virtuosas perdas na agricultura (Forti, 2000).

As formigas cortadeiras pertencem a dois gêneros de formigas cultivadoras de fungos: as do gênero *Atta*, conhecidas popularmente como saúvas, e as do gênero *Acromyrmex*, como quenquéns. Ao contrário do que se pensa comumente, elas não comem as plantas, mas cortam os vegetais e transportam os pedaços para o formigueiro onde, em câmaras especiais, esse material é utilizado para o cultivo de um fungo simbiote, *Leucoagaricus gongylophorus* (Möller) (Singer, 1986) do qual se alimentam (Forti, 2000). Esses insetos são, portanto, responsáveis por grandes prejuízos à agricultura e distinguem-se dos demais por atacarem ampla diversidade de vegetais, incluindo plantas ornamentais e cultivadas, reflorestamentos e pastagens. Podem, ainda, produzir danos indiretos, como abalos em estruturas de pontes e prédios. Apresentam grande distribuição desde o sul dos Estados Unidos até o centro da Argentina, sendo a maior diversidade de espécies encontradas no Brasil (Augustin et al., 1999).

Das dez espécies de saúvas existentes no Brasil, apenas 5 possuem grande importância econômica para as atividades agropecuárias: saúva-limão (*Atta sexdens*) que ataca florestas de eucalipto, pinus e plantas em geral; saúva cabeça de vidro (*Atta laevigata*), que ataca pastagens e florestas cultivadas; saúva mata-pasto (*Atta bisphaerica*); saúva-da-mata (*Atta cephalotes*) e a saúva parda (*Atta capiguara*), que ataca pastagens e cana-de-açúcar. Dentre as quenquéns, o número de espécies que causam prejuízos para a agricultura é muito maior (Forti, 2000). Atualmente, estão descritas 20 espécies e nove subespécies de *Acromyrmex* (Augustin, 1999). Devido ao grande polimorfismo morfológico das espécies e à considerável variabilidade entre os indivíduos, o gênero *Acromyrmex* é considerado o mais complexo da família Formicidae (Diehl et al., 2002).

Em geral, as formigas proporcionam oportunidades únicas para a investigação de várias questões biológicas, evolutivas e populacionais. Isso porque suas colônias são altamente complexas e possuem várias castas morfológicas com diferentes funções. As formigas podem ser empregadas para

estudos de comportamento ecológicos, estrutura genética de populações além de oferecer um rico material para investigar a seleção por parentesco e o altruísmo (Brian, 1983; Sudd; Frank, 1987; Hölldobler; Wilson, 1990). As formigas são organismos haplodiplóides, pois os machos são haplóides e surgem a partir da partenogênese e as fêmeas a partir de ovos fertilizados. A ocorrência desses dois níveis de ploidia produz uma ferramenta importante para a análise genética (Dihel et al., 2002).

Alguns autores discutem que os organismos diplóides possuem maior variabilidade genética que organismos haplodiplóides (Pamilo et al., 1978; Falcão; Contel, 1990). Graur (1985) concluiu que o nível de socialidade é mais importante que a haplodiploidia na determinação da diversidade genética em himenópteros.

Existem muitos estudos sobre a biologia, fisiologia, morfologia, ecologia e métodos de controle para esses grupos de formigas cortadeiras, porém quanto à taxonomia existem poucas informações, pois cada espécie apresenta características fenotípicas próprias e o desconhecimento desses fatores tem levado muitos métodos de controle ao insucesso. Torna-se importante, portanto, a identificação desses insetos por meio de diferenças genotípicas (Dihel, 2002). Desde a década de 1960, a análise de isoenzimas, como as esterases, foi o método dominante na avaliação da variação genética em populações naturais. Atualmente, outras técnicas estão disponíveis para o estudo da diversidade genética, como o RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*) e todas apresentam vantagens e desvantagens (Ferreira e Grattapaglia, 1995).

Nesse sentido, o marcador RAPD foi utilizado no presente estudo para a análise da variabilidade genética e da estrutura de populações da formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa* (saúva limão), com o intuito de contribuir para o entendimento sobre a manutenção da socialidade nesses insetos, visando um melhor manejo dessa espécie.

Devido à importância ecológica das formigas e ao seu potencial uso como bioindicador ambiental, torna-se necessário o estudo dos efeitos subletais que os pesticidas causam nesses insetos. Portanto, outro objetivo deste trabalho foi realizar um estudo do potencial como bioindicador da *Acromyrmex niger*, que se torna praga em ambientes impactados, mas, assim como qualquer outra formiga, possui importância ecológica e está exposta aos diversos produtos químicos

utilizados na agricultura. A ferramenta utilizada para este fim foram as isoenzimas, um marcador bioquímico que permite por meio de análises eletroforéticas das esterases, verificar se há ausência de alguma região esterásica, sendo possível, assim, utilizá-la como um marcador molecular para detectar a presença de determinado pesticida no ambiente.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Estrutura de população e comportamento social

Insetos sociais exibem uma variedade de comportamentos notáveis associados ao grupo em que vivem, como cooperação na criação da prole e na divisão de membros reprodutivos entre as colônias (Wilson, 1971).

Um caráter intrigante da biologia evolutiva de formigas é a ocorrência de pares de espécies irmãs das quais umas são unicoloniais, enquanto as outras são multicoloniais. As colônias de espécies de unicoloniais são poligínicas, seus ninhos se multiplicam por fragmentação e os novos ninhos interagem com o propago do ninho mãe. Os ninhos de espécies multicoloniais, normalmente, são monogínicos ou possuem somente algumas rainhas (oligoginia) e, em geral, os enxames de ninhos diferentes não têm nenhuma interação entre si, de forma que estão freqüentemente isolados (Wilson, 1971).

De acordo com Hölldobler (1976), a grande diversidade para a organização social é responsável por tornar as formigas bem sucedidas ecologicamente. A diversidade de estratégias adaptativas também pode afetar a organização genética das populações de formigas por influenciar a estrutura de populações, ou por agir na estabilidade das condições de vida.

O desenvolvimento de muitas dessas características surgiu via seleção parental, da qual a efetividade dependeu de padrões da estrutura genética das populações. Conseqüentemente, muitos estudos têm investigado a estrutura genética de populações de insetos sociais para entender melhor os fatores que afetam a evolução da sociabilidade. Porém, a maioria desses estudos focalizou membros eussociais da ordem Hymenoptera (todas as formigas, algumas abelhas e algumas vespas). A ênfase nessa ordem pode influenciar nossa compreensão sobre quais circunstâncias os comportamentos sociais evoluem, são mantidos e porque os himenópteros possuem características distintas que podem ter desenvolvido um papel na evolução da socialidade deste grupo (Hamilton, 1964b).

Modelos teóricos baseados na neutralidade e seleção predizem que a probabilidade de polimorfismo genético é menor em populações haplodiplóides do

que em populações diplóides. Na ausência de heterozigotos em um dos sexos, a seleção influenciará a frequência alélica para a fixação. Processos estocásticos ou deriva ao acaso possuem um efeito similar (Mayo, 1976). Partenogênese e haplodiploidia determinam a forma básica de reprodução em Hymenoptera. Isso tem mostrado que o nível de variabilidade gênica enzimática é realmente menor em espécies de Hymenoptera do que em insetos diplóides (Pamilo et al., 1978).

Uma colônia de formigas é formada por indivíduos adultos e em desenvolvimento ou cria, constituída de ovos, larvas e pupas. Os adultos, com raras exceções, são fêmeas e estão divididos em pelo menos duas castas básicas: as fêmeas férteis ou rainhas, cuja função primordial é a postura de ovos; e as fêmeas estéreis ou operárias, que realizam todas as demais atividades da colônia, tais como: coleta de água e alimento, alimentação da cria e da rainha, construção e defesa do ninho. Por sua vez, as operárias podem apresentar formas diferentes, duas ou mais, que se denomina polimorfismo (Wilson, 1976). As operárias não apresentam asas e as formas aladas correspondem aos indivíduos responsáveis pela reprodução: gine e machos. Os machos constituem uma casta adicional e, geralmente, aparecem apenas uma vez por ano, na época do acasalamento, que se dá através da realização do vôo nupcial. Conseqüentemente, uma colônia de formigas é constituída exclusivamente de fêmeas ápteras (Hölldobler e Wilson, 1990).

As colônias de formigas cortadeiras maduras, após o terceiro ano de idade, produzem, anualmente, as formas aladas: fêmeas (içás ou tanajuras) e machos (bitus), que abandonam o ninho onde foram gerados para fundarem novas colônias e perpetuar a espécie. Comumente, a dispersão em vôo nupcial se dá, nas Regiões Sudeste e Centro-Oeste, de setembro a dezembro e, no Sul do Brasil, de junho a dezembro, períodos que coincidem com o início das chuvas e também com a época mais quente do ano (Forti, 2000).

A içá, depois de fecundada em vôo nupcial por três a oito machos, desce ao solo e retira suas asas. Depois do acasalamento, o macho morre e a rainha começa a perfurar o solo para construir uma câmara inicial, hemisférica, cujo canal situa-se a uma profundidade que varia de 8 a 25 cm, que é vedado por terra pela própria rainha. A construção dessa câmara, onde a rainha fica enclausurada por aproximadamente 100 dias, dura cerca de 10 horas (Forti, 1982).

Antes de sair da “colônia mãe” para o vôo nupcial, a içá aloja uma pelota de fungo em uma cavidade dentro da boca, que é regurgitado no chão da nova colônia e cultivado com suas próprias fezes e secreções. Durante a clausura, as rainhas colocam ovos grandes de alimentação, que servirão para nutrição das larvas, e ovos pequenos, que dão origem a operárias que cuidam do fungo, das larvas e promovem a limpeza mútua e da rainha. As rainhas podem viver até 15 anos em condições de campo e 22 anos em laboratório. Já, a vida da operária dura poucos meses. Cerca de três meses após a fundação da câmara inicial, a colônia é reaberta e as formigas começam então trazer folhas para servir de substrato ao fungo. O segundo “olheiro” é aberto depois de 421 dias, a partir de quando o sauveiro se expande rapidamente (Forti, 1982).

O ciclo de vida de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* não possui muitos registros. Diehl-Fleig e Lucchese (1992) relatam que as rainhas de *A. niger*, logo após a revoada, perdem suas asas e iniciam a escavação do ninho. Após quatro ou seis horas elas fecham os olheiros. Essas rainhas reabrem os olheiros, saindo para forragear, e o obstruem novamente.

Em formigas, as colônias podem ter uma única rainha, fenômeno denominado de monoginia, ou várias rainhas funcionais, poliginia (Hölldobler e Wilson, 1990). A poliginia aumenta a chance de sobrevivência da colônia, que na ausência de uma reprodutora tem na fertilidade das demais a garantia de manutenção da estrutura genética do grupo (Wilson, 1971).

Nos ninhos adultos, a população é composta de indivíduos morfologicamente diferentes. As operárias ocorrem em maior número e dividem-se em quatro categorias: soldados, as maiores, relacionadas com a defesa; cortadeiras, de tamanho médio, que cortam e transportam os fragmentos de folhas; as generalistas e jardineiras, ainda menores e que estão envolvidas no cultivo e inoculação do fungo, alimentação das larvas e da rainha e limpeza do ninho (Forti, 2000).

Os feromônios foram um dos fatores que possibilitaram a organização das formigas em sociedades, possibilitando o reconhecimento individual e a cooperação na execução das múltiplas atividades da colônia. Os feromônios conhecidos nas formigas cortadeiras são, principalmente, os de alarme,

reconhecimento individual, da rainha, marcação de trilhas e recrutamento, marcação de folhas e territórios.

O feromônio de alarme, que desencadeia o comportamento de defesa na colônia, é composto por substâncias voláteis, principalmente heptanonas e octanonas (Crewe e Blum, 1972), produzidas e armazenadas nas glândulas mandibulares das operárias. Quando uma formiga é alarmada, ela libera uma pequena quantidade desse feromônio, que provoca de imediato um aumento na taxa de locomoção e a abertura das mandíbulas das companheiras ao redor e, numa segunda etapa, o recrutamento de novas formigas para a defesa da colônia.

O feromônio responsável pelo reconhecimento individual é formado por odores impregnados sobre a cutícula da formiga, denominado "odor da colônia" (Wilson, 1971). A composição destes odores é dependente da espécie e da colônia, ou seja, varia de acordo com as características genéticas e alimentares da espécie, de tal modo a lhe conferir especificidade. Segundo Jaffé (1984), os componentes do feromônio de alarme, produzidos pelas glândulas mandibulares, contribuem para a composição do "odor da colônia". Estes componentes seriam, inclusive, responsáveis pelo reconhecimento entre as formas sexuadas (alados) (Bento, 1993). Assim, as formigas cortadeiras dispõem de uma linguagem química que lhes permite identificar as companheiras de ninho e, mais ainda, as formas sexuadas (içás e bitús) produzidas pela espécie.

Quanto ao feromônio da rainha, suspeita-se que ele contribua para a formação do "odor da colônia" e seja decisivo na indução da alimentação, proteção e limpeza do corpo da rainha, interferindo ainda em muitos outros comportamentos do formigueiro (Della-Lúcia e Vilela, 1993).

## **2.2. Bioindicadores da qualidade ambiental**

Bioindicadores são espécies, grupos de espécies ou comunidades biológicas cuja presença, quantidade e distribuição indicam a magnitude de impactos ambientais em um ecossistema (Callisto e Gonçalves, 2002). Sua utilização permite a avaliação integrada dos efeitos ecológicos causados por

múltiplas fontes de poluição. Além disso, o uso dos bioindicadores é mais eficiente do que as medidas instantâneas de parâmetros físicos e químicos (p.ex. temperatura, pH, quantidade de oxigênio, teores totais e dissolvidos de nutrientes).

Vários estudos têm demonstrado que dentro de uma variedade de taxa de insetos, as formigas podem potencialmente ser utilizadas como bioindicadores de qualidade ambiental (Marinho et al., 2002; Araújo et al., 2004; Bickel e Watanasit 2005). Isso ocorre porque as formigas apresentam alta abundância e riqueza de espécies, possuem taxas especializadas, apresentam distribuição geográfica ampla, podem ser facilmente amostradas e com relativa facilidade, podem ser separadas em nível de morfo-espécies e, também, por serem sensíveis às mudanças das condições ambientais (Hölldobler e Wilson 1990).

As formigas têm sido utilizadas no monitoramento de vários tipos de impactos ambientais, como, por exemplo, recuperação de áreas após atividades de mineração (Ottonetti et al., 2006), fogo (Ratchford et al., 2005), poluição industrial (Nummelin et al., 2006), práticas agrícolas (Gómez et al., 2003), retirada de vegetação (Dunn, 2004) e outros usos da terra (Schnell et al., 2003).

A riqueza de espécies de formigas tem sido relacionada a fatores ambientais, como a quantidade de recursos, a complexidade estrutural e a heterogeneidade ambiental (Ribas et al., 2003). Esses fatores têm sido estimados através de medidas que levam em conta a densidade e a diversidade de árvores, a cobertura vegetal em diferentes extratos (herbáceo, arbustivo e arbóreo), a profundidade de serrapilheira e a variação da fisionomia entre tipos vegetacionais.

Lapola e Fowler (2008) realizaram um trabalho de coleta de formigas em três fragmentos de Mata Atlântica e na vizinha Floresta Estadual Edmundo Navarro de Andrade (FEENA), um reflorestamento de eucaliptos em Rio Claro, interior de São Paulo. Os resultados demonstraram que as comunidades de formigas dos fragmentos de floresta nativa são mais parecidas entre si do que com a da FEENA. Desse modo fica evidente que além da clara diferença no segmento vegetacional, outros componentes da biota (como as formigas) podem ser diferentes entre a FEENA e os fragmentos de floresta nativa. Os resultados, portanto, oportunamente serviram como base para discussão sobre a proposta de se unir através de um corredor ecológico a FEENA a esses fragmentos de floresta

nativa. Tais fragmentos são importantes para fins de conservação uma vez que representam as maiores áreas de vegetação nativa da região.

Carvalho et al. (2004) estudaram a comunidade de formigas epígeas do ecótono, mata de cipó da Mata Atlântica, município de Jequié, Bahia, Brasil (130 54' S; 400 01' W), de fevereiro a agosto de 2001, a fim de verificar o nível de conservação do ambiente. Os pesquisadores marcaram 50 pontos amostrais a intervalos de 50 m, distribuídos numa área de 12,5 ha. Em cada ponto, extraíram uma amostra de serapilheira de 1 m<sup>2</sup> e instalaram uma armadilha por 24 horas. Foram coletadas 55 espécies distribuídas em 23 gêneros. A abundância de *Wasmannia auropunctata*, formiga oportunista e com grande capacidade de adaptação e multiplicação em meios antropizados, *Ectatomma edentatum*, espécie que ocorre em área aberta, assim como a presença de gêneros como *Pheidole* e *Solenopsis*, que aumentam sua riqueza específica quando há alguma alteração na estrutura da vegetação da mata original, refletem o grau de perturbação do ambiente estudado. No entanto, a presença de espécies mais especializadas do ponto de vista nutricional, como *Cephalotes pusillus* ou como *Pyramica eggersi*, juntamente com a diversidade encontrada, refletem a composição em espécies de formigas, inerente da mata de cipó. Uma segunda alternativa pode mostrar que o ecótono estudado está se regenerando.

Apesar da literatura relativamente ampla em relação à utilização de formigas como bioindicadoras de impactos ambientais, em alguns trabalhos, há uma carência em explicar o motivo das respostas das formigas aos diferentes impactos ambientais. Geralmente, apenas um parâmetro da comunidade de formigas é analisado, por exemplo, a riqueza de espécies. Dessa forma, a bioindicação de impactos ambientais através de formigas fica restrita à descrição de respostas das comunidades, não promovendo generalizações e avanço no entendimento dos processos que causam as respostas observadas (Ribas et al., 2007).

### **2.3. Atividades de forrageamento**

A atividade de forrageamento consiste em um conjunto de atos ou estratégias comportamentais que levam os organismos a encontrar e utilizar as

fontes de energia e nutrientes para sua sobrevivência. As formigas possuem um vasto repertório de estratégias, podendo ser saprófagas, predadoras de diversos tipos de animais, coletoras de secreções açucaradas e cultivadoras de fungo como as formigas cortadeiras, tanto do gênero *Atta* e *Acromyrmex* (Schilindwein, 1996).

Segundo Fowler et al. (1990), a distância, a quantidade e a qualidade dos recursos determinam sua maior ou menor seletividade pelas formigas. Estudos sobre a dinâmica de forrageamento permitem a criação de modelos teóricos. Esses modelos são construídos a partir das seguintes observações: os itens escolhidos para coleta, as pequenas áreas de coleta denominadas “manchas”; o tempo gasto na procura, coleta dos itens escolhidos e a velocidade de forrageamento (Hölldobler e Wilson, 1990).

O modelo de manchas palatáveis vê as formigas como predadores oportunistas que identificam a fonte de recursos e a exploram, passando a outra fonte quando esta se torna pouco rentável em termos de energia (Simas et al., 2003).

Fowler (1981) sugere que as formigas de uma determinada colônia sejam condicionadas a dar preferência de coleta para os recursos vegetais com que foram criadas. Em razão de terem ninhos especialmente fixos, as formigas realizam a coleta de material ao redor do mesmo, utilizando uma estratégia denominada forrageamento central (Simas et al., 2003).

A seleção do material coletado depende da existência de compostos tóxicos à formiga ou ao fungo, da presença de compostos tanínicos que reduzem a digestibilidade, do valor nutricional relativo a proteínas, carboidratos e lipídios, das propriedades físicas das plantas e do teor de umidade das mesmas (Simas et al., 2003). Segundo Forti (1985), foi constatado que esses insetos têm preferência por folhas jovens em várias espécies coletadas.

Com relação aos horários de atividade, há uma grande heterogeneidade já comprovada por Amante (1972) e por Lewis et al. (1974) de que essa variação decorre do período do ano e das condições climáticas.

Em geral, no inverno, as coletas são diurnas com maior intensidade entre 12 e 14 horas. Em temperaturas amenas, ocorre em dois períodos, ou seja, das 09h30min às 10h30min e das 16 às 17 horas. No verão, a atividade é noturna,

com maior intensidade em torno de 21 horas (Schilindwein, 1996). Após um período de estiagem quando diminui a atividade de forrageamento, a primeira chuva forte proporciona um grande aumento do forrageamento (Simas et al. 2003).

Segundo Vitório (1996), as variações de temperatura, umidade do ar, precipitação pluviométrica, período de insolação e velocidade do vento têm efeitos significativos na composição química e física das gramíneas, afetando também o forrageamento e transporte das mesmas pelas formigas.

#### **2.4. Métodos de controle de formigas cortadeiras**

As formigas cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* apresentam sistema de vida com organização social semelhante, vivem em ninhos subterrâneos e são as principais pragas florestais e de pastagem na América (Della Lúcia, 1993). Trata-se de um grupo de insetos cujo controle é difícil, mesmo quando se utilizam iscas formicidas eficazes. Isso se deve em parte, ao grande número de pequenos formigueiros espalhados por extensas áreas, muitas vezes difíceis de serem localizados. Esses ninhos são formados por uma ou mais câmaras, onde se encontram o jardim de fungo, a rainha e a prole dessas formigas (Zanetti et al., 2002).

As câmaras ou painelas são interligadas por canais ou galerias e a saída para a superfície do solo, que são denominadas de olheiros. Esses olheiros podem localizar-se sobre os montes de terra solta formados pelo acúmulo de solo extraído das câmaras, mas, também como saídas fora deles, os quais são chamados olheiros de abastecimento, de carregamento ou de ventilação (Della Lúcia, 1992).

As formigas cortadeiras de folhas podem ser controladas através de métodos mecânicos, culturais, biológicos e químicos. O controle mecânico manual praticamente não é utilizado, em virtude de ser de viabilidade restrita a pequenas áreas e ninhos com até 4 meses de idade (Boaretto e Forti, 1997).

Os métodos químicos para controle de formigas cortadeiras são os mais utilizados. Apesar de várias formulações estarem disponíveis, como pós secos,

concentrados emulsionáveis, gases liquefeitos, produtos para termonebulização, as iscas formicidas têm sido as mais amplamente empregadas no controle desses insetos. (Valério, 2005). Nas colônias, as iscas a base de sulfluramida, são transportadas e distribuídas uniformemente, atingindo as câmaras de fungo, onde os pellets são hidratados pelas operárias, fragmentados e, finalmente, incorporados. A incorporação dos fragmentos ao jardim de fungo ocorre num período de 6 h a 18 h após a oferta das iscas. Nos processos de limpeza, hidratação e incorporação dos pellets, 50 a 70% das operárias tornam-se contaminadas (Forti et al., 1993; Pretto, 1996). Decorrido três dias, a atividade forrageira cessa, ocorrendo grande mortalidade de operárias mínimas e generalistas. Após o quarto dia, constata-se desorganização da colônia, embora a rainha possa sobreviver até 40 dias.

Um estudo realizado por Zanetti et al. (2003) testou a aplicação de iscas granuladas à base de sulfluramida (0,3%) em olheiros localizados sobre o monte de terra solta com o objetivo de comparar a aplicação dessas mesmas iscas em olheiros de abastecimento fora desses montes (método convencional). Os resultados demonstraram que esse método é tão eficiente no combate às formigas cortadeiras quanto o convencional. Por isso, recomenda-se o uso dessa metodologia, com o cuidado de que essa isca granulada seja aplicada no lado contrário aquele em que as formigas estejam depositando a terra escavada, para evitar que ela seja coberta por terra.

Nas áreas de reflorestamento, como eucalipto, os tipos de combate às formigas cortadeiras mais comuns são o localizado (aplicação de formicida diretamente sobre os ninhos) e o sistemático (as iscas formicidas são distribuídas de forma sistemática na área, independente da localização dos ninhos das formigas-cortadeiras). Este último método tem sido pouco estudado, apesar de ser prática comum em muitas empresas reflorestadoras brasileiras, em áreas de implantação, de reforma ou de regeneração, para o controle de saúveiros iniciais e, principalmente, de quenquenzeiros, que podem provocar danos severos à brotação e às mudas recém plantadas (Oliveira et al., 1993).

O controle biológico certamente é uma área promissora de pesquisa, como estratégia de controle das formigas cortadeiras. A resistência do ambiente é responsável pela mortalidade de 99,95% das rainhas dessas formigas, antes

mesmo que tenham fundado seus ninhos. O controle biológico natural, através de predadores, parasitóides e microrganismos patogênicos, sem dúvida é importante fator de regulação das populações destes insetos. As aves silvestres e domésticas, principalmente as espécies insetívoras e onívoras, são importantes elementos dentre os inimigos naturais. Porém, a supressão do sub-bosque é uma prática que afeta negativamente as populações de aves e outros organismos benéficos, enquanto que a presença de áreas de reserva de vegetação natural favorece a concentração das populações de aves, as quais se dispersam para os talhões vizinhos (Almeida et al., 1983).

O controle dessas formigas deve ser conduzido permanentemente e o ideal é que não fosse restrito à propriedade, mas fosse conduzido por toda a comunidade (Valério, 2005).

## **2.5. Isoenzimas e PCR-RAPD**

As isoenzimas, também referidas como isozimas, foram definidas por Markert e Möller (1959) e representam formas múltiplas de uma mesma enzima, que atuam sobre um mesmo substrato, mas podem acrescentar seqüências polipeptídicas, cargas elétricas, pesos moleculares, especificidades e cinéticas diferentes dentre outras variáveis. Como as frações polipeptídicas, as frações de proteínas totais e as isozimas representam os produtos primários dos genes (DNA → mRNA → polipeptídeos: transcrição e tradução). Geneticamente, esse tipo de caracterização tem um significado: é mais refinado que as caracterizações morfológicas como, forma, cor, tamanho, peso, que geralmente são produtos de mais de um gene associado (interação gênica) a mecanismos diferenciais de expressão e de regulação e a fatores ambientais (Machado et al., 1999).

A eletroforese de isoenzimas é uma técnica bioquímica versátil para detectar variação genética e auxiliar no estudo da genética de populações. Em 1957, Hunter e Markert ampliaram a técnica de eletroforese desenvolvida na década de 50 por Smithies, acoplando procedimentos bioquímicos de coloração para identificar a atividade enzimática sobre o suporte eletroforético.

A partir de então, a técnica de eletroforese, desenvolvida por Smithies (1955), foi amplamente usada em estudos populacionais para vários tipos de organismos, com a finalidade de quantificar a variação genética em populações de um modo geral (Hunter e Markert, 1957). No entanto, para alguns organismos, essa técnica não é a mais apropriada por detectar pouca variabilidade como, por exemplo, em Hymenoptera (Garnery et al., 1992).

Os marcadores isoenzimáticos geralmente fornecem ampla informação genética para várias aplicações. A técnica de isoenzimas é relativamente barata e tecnicamente acessível e, embora em número limitado, vários locos podem ser analisados rápida e simultaneamente (Augustin, 1999).

Com o advento de técnicas modernas de biologia molecular, surgiram diversos métodos de detecção de polimorfismo genético de DNA. Inicialmente, com o desenvolvimento da técnica de RFLP (do inglês “Restriction Fragment Length Polymorphism”) por Grodzicker et al. (1974), utilizando enzimas de restrição de DNA, surgiu um novo marcador amplamente utilizado em diversos tipos de estudos, inclusive populacionais (Ferreira e Grattapaglia, 1998). A primeira metade da década de 80 assistiu ao desenvolvimento de um método de amplificação de seqüência de DNA que revolucionou a análise genética: a reação de polimerase em cadeia (PCR - Polymerase Chain Reaction) (Saiki et al., 1988). Posteriormente, o desenvolvimento da PCR levou à descrição de outras classes de marcadores moleculares (RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA*, microssatélites, AFLP - *Amplified fragment length polymorphism*) que podem ser empregados em vários tipos de estudos, como de estrutura de população, sistemática e relações evolutivas entre organismos.

O interesse em utilizar marcadores RAPD está na sua rapidez, baixo custo e simplicidade da técnica (Harry et al., 1998). A tecnologia de PCR-RAPD que utiliza *primers* de seqüência arbitrária abriu uma nova perspectiva para a análise genômica de indivíduos e populações, eliminando a necessidade do conhecimento prévio das seqüências de nucleotídeos que flanqueiam a seqüência de DNA de interesse (Suazo et al., 1998). Marcadores RAPD, em geral, apresentam um bom conteúdo informativo, isto é, amostram o genoma em vários locos ao mesmo tempo, identificam um bom número de locos polimórficos por

reação, embora discriminem um baixo número de alelos por loco (dois alelos, amplificado e não-amplificado) (Borowsky, 2001).

Como esta técnica pode ser aplicada quando pequenas quantidades de DNA estão disponíveis (Rabouam et al., 1999) permite, dessa maneira, a análise individual de pequenos animais como os insetos.

Grutzmacher et al. (2007) empregaram as técnicas de PCR-RAPD e AFLP com o objetivo de testar a possibilidade dessas ferramentas de biologia molecular para auxiliar na identificação das espécies de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* que ocorrem no Estado do Rio Grande do Sul (RS). O estudo foi realizado com seis espécies de formigas do gênero *Acromyrmex* coletadas em quatro regiões do RS. Embora os 13 *primers* selecionados tenham produzido fragmentos que permitem várias alternativas de seu uso para a identificação das espécies *A. heyeri*, *A. ambiguus*, *A. crassispinus*, *A. striatus*, *A. laticeps* e *A. aspersus*, a identificação dessas formigas pode ser realizada utilizando-se apenas os *primers* UBC 354, UBC 348 e UBC 356, que apresentaram fragmentos bem visíveis e permitem uma identificação segura. Os resultados obtidos com o dendograma e as características morfológicas analisadas mostram que as espécies *A. striatus* e *A. laticeps* são menos relacionadas com as demais espécies estudadas, enquanto maior proximidade genética foi observada entre as espécies *A. ambiguus* e *A. crassispinus*. Através deste trabalho, pode-se concluir que a identificação das espécies de *Acromyrmex* pode ser realizada de maneira segura pelas técnicas RAPD e AFLP.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A.F.; ALVES, J.E.M.; MENDES FILHO, J.M.A.; LARANJEIRO, A.J. A avifauna e o sub-bosque como fatores auxiliares no controle biológico das saúvas em florestas implantadas. **Silvicultura**, 8:145-150, 1983.

AMANTE, E. **Influência de alguns fatores microclimáticos sobre a formiga saúva *A. laevigata* (F. Smith, 1858), *A. sexdens rubropilosa* Forel, 1908, *Atta bisphaerica* Forel, 1908 e *Atta capiguara* Gonçalves. 1944. (Hymenoptera: Formicidae) em formigueiros localizados no Estado de São Paulo.** Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1972. 175p. Tese (Doutorado em Agronomia).

ARAÚJO, M.S.; DELLA LUCIA, T.M.C.; NASCIMENTO, I.C.; VEIGA, C.E. O fogo como agente de distúrbio em comunidade de formigas. **Ecologia Austral**, 14:191-200, 2004.

AUGUSTIN, E.; LOECK, A.E.; STORCH, G.; GRÜTZMACHER, D.D.; AFONSO, A.P.S.; GUSMÃO, L.G. Identificação de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae) através de isoenzimas. **Revista Brasileira de Agrociências**, 5:217-220, 1999.

BENTO, J.M.S. **Condições climáticas para o vôo nupcial e reconhecimento dos indivíduos em *Atta sexdens rubropilosa* (Hym.: Formicidae).** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1993. 98p. Tese (Mestrado em Entomologia).

BICKEL, T.O.; WATANASIT, S. Diversity of leaf litter ant communities in Ton Nea Chang Wildfire Sanctuary and nearby rubber plantations, Songkhla, Southern Thailand, Songklanakarin. **Journal Science Technology**, 27:943-955, 2005.

BOARETTO, M.A.; FORTI, L.C. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras, **IPEF**, 11:31-46, 1997.

BOROWSKY, R.L. Estimating nucleotide diversity from random amplified polymorphic DNA and amplified fragment length polymorphism data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 18:143-148, 2001.

- BRIAN, M.V. **Social Insects**: ecology and behavioral biology. New York: Chapman and Hall, 1983. 377p.
- CAETANO, F.H.; JAFFÉ, K.; ZARA, F.J. **Formigas**: biologia e anatomia. Rio Claro: Topázio, 2002. 132p.
- CALLISTO, M.; GONÇALVES, J.F.Jr. A vida nas águas das montanhas. **Ciência Hoje**, 31:68-71. 2002.
- CARVALHO, K.S.; SOUZA, A.L.B.; PEREIRA, M.S.; SAMPAIO, C.P.; DELABIE, J.H.C. Comunidade de formigas epígeas no ecótono mata de cipó, domínio da Mata Atlântica, Ba, Brasil. **Acta Biológica Leopoldensia**, 26:249-257, 2004.
- CREWE, R.M.; BLUM, M.S. Alarm pheromones of the Attini: their phylogenetic significance. **Journal of Insect Physiology**, 18:31-42, 1972.
- DELLA-LÚCIA, T.M.C. Biotecnologia e controle de formigas cortadeiras. In: REUNIÃO SOBRE PRAGAS SUBTERRÂNEAS DOS PAÍSES DO CONE SUL. Sete Lagoas, 1992. **Resumos...** Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS, 1992, p. 35-45.
- DELLA-LÚCIA, T.M.C. **As formigas cortadeiras**. Viçosa: Folha de Viçosa, 1993. 262p.
- DELLA LUCIA, T.M.C.; VILELA, E.F. Métodos atuais de controle e perspectivas. In: DELLA LUCIA, T.M.C. (ed.). **As formigas cortadeiras**. Viçosa: Folha de Viçosa, 1993. p. 163-190.
- DIEHL, E.; CAVALI-MOLINA, S.; ARAÚJO, A.M. Isoenzyme variation in the leaf-cutting ants *Acromyrmex hayeri* and *Acromyrmex striatus* (Hymenoptera, formicidae). **Genetic and Molecular Biology**, 25:173-178, 2002.
- DIEHL-FLEIG, E.; LUCHESE, M.E.P. Nests foundation by *Acromyrmex striatus* (Hymenoptera: Formicidae). In: BILLEN, J. (ed). **Biology and evolution of social insects**. Leven: University Press, 1992. p. 51-54.
- DUNN, R.R. Recovery of faunal communities during tropical forest regeneration. **Conservation Biology**, 18:302-309, 2004.

FALCÃO, T.M.M.A.; CONTEL, E.P.B. Genetic variability in natural populations of Brazilian social bees. I. Isozyme patterns and polymorphism for esterases and total protein. **Brazilian Journal Genetics**,13:731-754, 1990.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1995. 220p.

FORTI, L.C. **Ecologia da saúva, *Atta capiguara* Gonçalves, 1944 (Hymenoptera: Formicidae) em pastagens**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1985. 234p. Tese (Doutorado em Ciências).

FORTI, L.C. Se o produtor vacilar, o exército das formigas invade a lavoura. **A Granja**, 56:12-17, 2000.

FOWLER, H.G.L. Subtropical seasonality and the forage activity of a grass-cutting ant, *Acromyemex landolti fraticornis* (Formicidae: Attini). **Ciência e Cultura**, 33:252-257, 1981.

FOWLER, H.G.L.; FORTI, C.; BRANDÃO, C.R.F.; DELABIE, J.H.C.; VASCONCELOS, H.L. "Ecologia Nutricional de formiga". In: PAZZINI, A.R.; PARRA, J.R.P. (org.). **Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas**. São Paulo: Manole/CNPq, 1991. p. 131-223.

GARNERY, L.; CORNUET, J.M.; SOLIGNAC, M.I. Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. **Molecular Ecology**, 1:145-154, 1992.

GÓMEZ, C.; CASELLAS, D.; OLIVERAS, J.; BAS, J.M. Structure of ground foraging ant assemblages in relation to land-use change in the northwestern Mediterranean region. **Biodiversity and Conservation**, 12:2135-2146, 2003.

GRAUR, D. Gene diversity in *Hymenoptera*. **Evolution**, 39:190-199, 1985.

GRODZICKER, T.; WILLIAMS, J.; SHARP, P.; SAMBROOK, J. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. **Biology**, 39:439-446, 1974.

GRUTZMACHERI, D.D.; LOECK, A.E.; OLIVEIRA, A.C.; ZIMMER, P.D.; MALONE, G. Variabilidade genética interespecífica em formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* que ocorrem no estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, 37:921-927, 2007.

HAMILTON, W.D. The genetic evolution of social behavior. **Journal of Theoretical Biology**, 71:17-32, 1964b.

HARRY, M.; ROBIN, S.; LACHAISE, D. Use of polymorphic genetic markers (RAPDs) in evolutionary and applied entomology. **Societe Entomologique de France**, 34:9-32, 1998.

HÖLDOBLER, B. Recruitment behavior, home range orientation and territoriality in harvester ants, *Pogonomyrmex*. **Behavior Ecology Sociobiology**, 1:3-44, 1976.

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

HUNTER, R.L.; MARKERT, C.L. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. **Science**, 125:1294-1295, 1957.

JAFFÉ, K. Evolución de los sistemas de comunicación química en hormigas (Hym.: Formicidae). **Folha Entomologica Mexicana**, 61:189 -203, 1984.

JESUS, C.M.; BUENO, O.C. Utilização de alimentos em diferentes espécies de formigas. **Instituto Biológico**, 69:107-110, 2007.

LAPOLA, D.M.; FOWLER, H.G. Questionando a implementação de corredores de habitat: um estudo de caso no interior de São Paulo usando formigas como bioindicadores. **Brazilian Journal of Biology**, 68:11-20, 2008.

LEWIS, T.G.; POLLARD, V.; DIBLEY, C.G. Rhythmic foraging in the leaf-cutting ant *cephalotes* (Linnaeus) (Formicidae: Attini). **Journal of Animal Ecology**, 43:9-141, 1974.

MACHADO, M.F.P.S.M.; COLLET, S.A.O.; MANGOLIN, C.A. **Expressão gênica no desenvolvimento de tecidos vegetais *in vitro***. Maringá: EDUEM, 1999. 95p.

MARINHO, C.G.S.; ZANETTI, R.; DELABIE, J.H.C.; SCHLINDWEIN, M.; RAMOS, L.S. Diversidade de formigas (Hymenoptera: Formicidae) da serapilheira em eucaliptais (Myrtaceae) e área de cerrado de Minas Gerais. **Neotropical Entomology**, 31:187-195, 2002.

MARKET, L.; MÖLLER, F. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic and species specific patterns. **Proceedings of the National Academy Science of the United States of America**, 45:753-763, 1959.

MAYO, A. Neutral alleles at X-linked loci: cautionary note. **Human Heredity**, 26:263-266, 1976.

MOUTINHO, P.; NEPSTAD, D.C.; DAVIDSON, E.A. "Influence of leaf-cutting ant nests on secondary Forest growth and soil properties in Amazônia". Washington: **Ecology**, 84:1265-1276, 2003.

NUMMELIN, M.; LODENIUS, M.; TULISALO, E.; HIRVONEN, H.; ALANKO, T. Predatory insects as bioindicators of heavy metal pollution. **Environmental Pollution**, 145:339-347, 2007.

OLIVEIRA, A.C.; BARCELOS, J.A.V.; MORAES, E.J.; FREITAS, G.D. Um estudo de caso: o sistema de monitoramento e controle de formigas cortadeiras na Mannesmann Fi-EI Florestal Ltda. In: Della Lúcia, T.M.C. (ed.). **As formigas cortadeiras**. Viçosa: UFV, 1993. p. 242-255.

OTTONETTI, L.; TUCCI, L.; SANTINI, G. Recolonization patterns of ants in a rehabilitated lignite mine in central Italy: potential for the use of Mediterranean ants as indicators of restoration processes. **Restoration Ecology**, 14:60-66, 2006.

PAMILO, P.; ROSENGREN, R.; VEPSALAINEN, K.; VARVIO-AHO, S.; PISARSKI, B. Population genetics of *Formica* ants. I. Patterns of enzymes gene variation. **Hereditas**, 89:233-248, 1978.

PETERNELLI, E.F.O.; DELLA LUCIA, T.M.C.; MARTINS, S.V. "Espécies de formigas que interagem com as sementes de *Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae)". **Revista Árvore**, 28:733-738, 2004.

proteins of normal human adults. **Biochemical Journal**, 61:620-641, 1955.

RABOUAM, C.; COMES, A.M.; BRETAGNOLLE, V.; HUMBERT, J.; PERIQUET, G.; BIGOT, Y. Features of DNA fragments obtained by random amplified polymorphic DNA (RAPD) assays. **Molecular Ecology**, 8:493-503, 1999.

RATCHFORD, J.S.; WITTMAN, S.E.; JULES, E.S.; ELLISON, A.M.; GOTELLI, N.J.; SANDERS, N.J. The effects of fire local environment and time on ant assemblages in fens and forests. **Diversity and Distributions**, 11:487-497, 2005.

RIBAS, C.R.; S. CHOEREDER, J.H.; PIC, M.; SOARES, S.M. Tree heterogeneity, resource availability and larger scale process regulating arboreal ant species richness. **Austral Ecology**, 28:305–314, 2003.

RIBAS, C.R.; SCHMIDT, F.A.; SOLAR, R.R.C.; SCHOEREDER, J.H.; VALENTIM, C.L.; SANCHES, A.L.P.; ENDRINGER, F.B. Formigas podem ser utilizadas como bioindicadoras de recuperação após impactos ambientais? In: XVIII SIMPÓSIO DE MIRMERCOLOGIA. São Paulo, 1997. **Resumos...** São Paulo: Instituto Biológico, 2007, p. 57-60.

SAIKI, R.K.; SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S. Primer-directed enzymatic amplification of a DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, 239:487-491, 1988.

SCHLINDWEIN, M.N. **Avaliação das estratégias de forrageamento de *Atta sexdens rufopilosa* Forel, 1908. (Hymenoptera: Formicidae) com o uso de manipulação espaço-temporal de recursos vegetais.** Rio Claro: Universidade Estadual de São Paulo, 1996.100p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)

SCHNELL, M.R.; PIK, A.J.; DANGERFIELD, J.M. Ant community succession within eucalypt plantations on used pasture and implications for taxonomic sufficiency in biomonitoring. **Austral Ecology**, 28:553-565, 2003.

SIMAS, V.R.; COSTA, E.C.; SIMAS, C.A. Principais espécies vegetais herbáceas em locais forrageados e não forrageados por *Atta vollenweideri* Forel, 1983 (Hymenoptera: Formicidae). **Revista da Faculdade de Zootecnia e Veterinária**, 10:202-213, 2003.

SMITHIES, O. Zone electrophoresis in starch gels: group variation in the serum proteins of normal human adults. **Biochemical Journal**, 61:620-641, 1955.

SUDD, J.H.; FRANKS, N.R. **The behavioral ecology of ants**. New York: Chapman and Hall, 1987. 206p.

VALERIO, J.R. Insetos-praga em pastagens tropicais. **Revista Informe Agropecuário**, 26:98-119, 2005.

VITÓRIO, A.C. **Avaliação da seletividade a *Atta capiguara* Gonçalves, 1944 (Hymenoptera: Formicidae) por diferentes gramíneas forrageiras**. Botucatu: Universidade Estadual de São Paulo, 1996. 103p. Dissertação (Mestrado em Agronomia)

WILSON, E.O. **The insect societies**. London: Harvard University, 1976. 136p.

WILSON, E.O. **The insect societies**. London: Harvard University, 1971. 548p.

ZANETTI, R. **Manejo integrado de formigas cortadeiras**. Lavras: UFLA, 2002. 16p.

ZANETTI, R.; ZANUNCIO, J.C.; SOUZA-SILVA, A.; ABREU, L.G. Eficiência de iscas aplicada sobre o monte de terra solta de ninhos de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Revista Árvore**, 27:407-410, 2003.

## CAPÍTULO I

### **Utilização de formigas cortadeiras *Acromyrmex niger* Smith, 1858 (Hymenoptera; Formicidae) como bioindicadores de resíduos de agrotóxicos**

#### RESUMO

Apesar da condição de praga das formigas cortadeiras em agroecossistemas, não se pode negar os benefícios que elas podem trazer em determinadas situações ou ambientes. As formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex niger* atacam principalmente folhas de hortaliças e frutíferas expondo-se não só aos agroquímicos utilizados para seu controle como também àqueles utilizados no controle de outras pragas. Devido ao potencial bioindicador da qualidade ambiental das formigas e sua frequente exposição aos agrotóxicos, como organofosforados, neonicotinóides e reguladores de crescimento, utilizados no controle de pragas, torna-se necessário o estudo dos efeitos subletais que esses agrotóxicos podem causar. A técnica de eletroforese foi utilizada para o estudo da caracterização bioquímica das isoenzimas esterases, envolvidas no metabolismo de xenobióticos de *A. niger*, aliada a alterações na expressão das isoenzimas após a contaminação com pesticidas. *Acromyrmex niger* apresentou 8 regiões de atividade esterásica, as quais foram denominadas de EST-1, EST-2, EST-3, EST-4, EST-5, EST-6, EST-7 e EST-8 de acordo com a mobilidade eletroforética. Quanto à especificidade aos substratos  $\alpha$  e  $\beta$ -naftil acetato, as Est-7 e Est-8 são classificadas como  $\alpha$ -esterase e as demais  $\alpha\beta$  esterases. EST-5 é considerada uma enzima do tipo colinesterase II e as demais são carboxilesterases. A análise eletroforética apresentou inibição parcial para todas as esterases submetidas ao contato com malathion nas concentrações  $1 \times 10^{-3} \%$  e  $5 \times 10^{-3} \%$ , que pode ser considerado um biomarcador para a presença de resíduos desse inseticida no ambiente. A análise de regressão para o efeito subletal dos pesticidas testados demonstrou correlação entre dose e mortalidade somente para o pesticida neonicotinóide thiametoxam.

Palavras-chave: *Acromyrmex niger*, esterases, bioindicadores.

**Leaf-cutting ants *Acromyrmex niger* Smith, 1858 (Hymenoptera; Formicidae)  
used as bioindicators of agrotoxics residues**

**ABSTRACT**

Despite the condition of leaf-cutting ant pests in agroecosystems, it is undeniable the benefits they can bring in certain situations or environments. The leaf-cutting ants of the genus *Acromyrmex niger* attack mainly leaves of vegetables and fruit trees exposing not only to the agrochemicals used for their control as well as to those used for the control of other pests. Due to the bioindicator potential of environmental quality of the ants and their frequent exposure to agrochemicals such as organophosphates, neonicotinoids and growth regulators insecticide used for pest control, it is necessary to study the sublethal effects that these pesticides may cause. The electrophoresis technique was used to study the biochemical characterization of esterase isozymes involved in the metabolism of xenobiotics of *Acromyrmex niger*, combined with changes in the expression of isozymes after contamination by pesticides. *A. niger* showed 8 regions of esterase activity, which were called EST-1, EST-2, EST-3, EST-4, EST-5, EST-6, EST-7 and EST-8 according to the electrophoretic mobility. As the specificity to  $\alpha$  and  $\beta$ -naphthyl acetate substrates, the Est-7 and Est-8 may be classified as  $\alpha$ -esterase and the others as  $\alpha\beta$  esterases. EST-5 is considered an enzyme of the type cholinesterase II and the others are of the type carboxylesterase. The electrophoretic analysis showed partial inhibition to all esterases subjected to the contact with Malathion organophosphate at the concentrations  $1 \times 10^{-3}$  % and  $5 \times 10^{-3}$ %, which may be considered as a biomarker for the presence of residues of this insecticide in the environment. The regression analysis for sublethal effects of the tested pesticides demonstrated correlation between dose and mortality only for thiametoxam neonicotinoid pesticide.

Key words: *Acromyrmex niger*, esterases, bioindicators.

## 1. INTRODUÇÃO

De acordo com Emery (1922) e Santschi (1925), as formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* são representantes da tribo Attini, cujas operárias se caracterizam principalmente por apresentarem num mesmo ninho um polimorfismo acentuado, com exemplares de diversos tamanhos, que podem medir de 10,5 mm a pouco menos de 2 mm, com caracteres diferentes de um tamanho para outro, embora sejam irmãs. Devido a esse grande polimorfismo morfológico das espécies e a considerável variabilidade entre os indivíduos, o gênero *Acromyrmex* é considerado o mais complexo da família Formicidae (Diehl et al., 2002).

Atualmente, estão descritas 20 espécies e nove subespécies de *Acromyrmex* (Zanetti, 2002). Sua distribuição geográfica é própria da América e sua área de distribuição começa na Califórnia (Estados Unidos), seguindo pelo México e continuando pela América central e por todos os países da América do Sul (exceto o Chile) até a Patagônia (Argentina). Ocorre também em Cuba e Trinidad (Antilhas) e no Brasil existe em todos os estados (Gonçalves, 1961).

Apesar da condição de praga dessas formigas em agroecossistemas, o que demanda a necessidade de controle químico para reduzir os prejuízos econômicos, não se pode negar os benefícios que elas podem trazer em determinadas situações ou ambientes. Segundo Moutinho et al. (1993), as formigas cortadeiras podem ter impactos positivos quanto à estrutura química e física do solo e potencialmente beneficiar a vegetação, favorecendo seu crescimento, pois em áreas com ninhos o solo é menos resistente à penetração das raízes e a matéria orgânica presente nas câmaras de lixo favorecem a fertilidade dos solos.

Poluentes como os agrotóxicos são constituídos por várias substâncias químicas com diferentes grupos funcionais, cada uma com um modo particular de ação sobre os alvos biológicos e ação danosa sobre outros organismos e o ambiente (Colborn, 2006). A presença de resíduos de pesticidas é usualmente determinada por métodos físicos, químicos e biológicos e a simplicidade dos bioensaios contribui para a aceitação da análise de resíduos no campo.

Teoricamente, qualquer organismo que seja susceptível a um inseticida pode ser usado nestes bioensaios em qualquer amostra ambiental servindo como bioindicador para a detecção de certos poluentes (Mansour, 1987).

No presente trabalho, foram utilizadas formigas cortadeiras da espécie *Acromyrmex niger* (Smith, 1858), conhecidas popularmente como quenquém mineira que cortam principalmente folhas de hortaliças e frutíferas. Essas formigas expõem-se não só aos agrotóxicos utilizados para seu controle como também àqueles utilizados no controle de outras pragas como os organofosforados, neonicotinóides e reguladores de crescimento.

Portanto, devido ao potencial bioindicador da qualidade ambiental das formigas e sua frequente exposição aos agrotóxicos, torna-se necessário o estudo dos efeitos subletais que eles podem causar. Para avaliar esse potencial bioindicador foi utilizada a técnica de eletroforese para o estudo da caracterização bioquímica das isoenzimas esterases, envolvidas no metabolismo de xenobióticos de *A. niger*, aliada a alterações na expressão das isoenzimas após a contaminação com pesticidas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Material biológico

As operárias de *A. niger* foram coletadas de um único ninho no campus da Universidade Estadual de Maringá (23° 26' de latitude sul, 51° 56' de longitude oeste) em diferentes estações do ano. Após a coleta, foram expostas aos inseticidas e mantidas no laboratório por 24h à temperatura ambiente ( $\pm 27^\circ \text{C}$ ), umidade relativa do ar de 45% e ausência de luz.

### 2.2. Eletroforese PAGE

As operárias de *A. niger* foram sacrificadas e homogeneizadas individualmente em tubos de propileno 1,5 mL contendo 35 $\mu\text{L}$  da solução de extração preparada com 2- mercaptoetanol e glicerol a 10 %. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 56.000 xg por 10 min a 4° C.

As eletroforeses verticais foram realizadas utilizando géis de poliacrilamida a 10% de concentração e gel de empilhamento com concentração de 5%. O tampão de corrida utilizado foi o Tris-Glicina 0,1 M pH 8,3. Os géis foram submetidos à eletroforese em uma voltagem de aproximadamente 200V por 5 horas.

Para a coloração, o gel foi incubado em estufa à temperatura de  $\pm 37^\circ \text{C}$ , por 30 min em 50 mL da solução tampão fosfato (0,1M pH 6,2). Após o período de incubação, essa solução foi descartada e acrescentou-se a solução de coloração preparada com 50 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 6,2; 0,03g de  $\alpha$ -naftil acetato; 0,02g de  $\beta$ -naftil acetato; 0,06g do corante Fast Blue RR Salt. O gel foi novamente incubado até o aparecimento das bandas.

Posteriormente, os géis foram mantidos em solução conservante (ácido acético a 75% e glicerol a 10 %, dissolvidos em água destilada) por pelo menos 24 horas. Em seguida, foram embebidos em gelatina a 5% e colocados entre

duas folhas de papel celofane molhados, esticados, prensados e mantidos em temperatura ambiente até secagem completa (Ceron et al., 1992).

### **2.3. Caracterização bioquímica**

A caracterização bioquímica foi realizada por meio da análise de inibição como descrito por Healy et al. (1991).

As amostras homogeneizadas e centrifugadas foram aplicadas no gel de poliacrilamida e para a coloração ele foi cortado em duas partes iguais. Uma metade do gel foi destinada ao controle e a outra ao teste de inibição. Os inibidores utilizados foram o organofosforado malathion (20 $\mu$ L), o reagente sulfidril paracloromercuriobenzoato ou p-CMB (0,08g) e o sulfato de eserina (0,08g), diluídos em 100 mL da solução tampão fosfato de sódio (0,1 M pH 6,2) e testados separadamente. A metade reservada para controle foi incubada por 30 min em 50 mL da solução tampão fosfato de sódio (0,1 M pH 6,2) e a metade reservada ao teste de inibição foi incubada em 50 mL do tampão fosfato com o inibidor a ser testado. Após o período de incubação com o tampão, a coloração ocorreu normalmente para o controle, porém, para o teste, foram utilizados os 50 mL restantes do tampão que continha o inibidor diluído. Após a visualização das bandas, foi realizada a comparação entre os géis do controle e do teste.

### **2.4. Bioensaio com inseticida**

As formigas foram coletadas em garrafas plásticas e levadas ao freezer por aproximadamente 1 minuto, apenas para provocar um atordoamento, o qual facilitou a contagem exata de indivíduos por placa de Petri (15 cm diâmetro). O bioensaio possuía 4 placas de Petri, para cada um dos três inseticidas a serem testados. Cada uma das placas continha 20 indivíduos, sendo uma placa controle e as demais referentes às repetições das concentrações dos inseticidas testados. Na placa controle, os 20 indivíduos ficaram em contato com papel filtro embebido apenas em água, por 24h. Nas três placas referentes às repetições os 20

indivíduos de cada placa ficaram em contato com papel filtro embebido com 2mL da solução dos agrotóxicos a serem testados. Esses agrotóxicos diluídos em água nas seguintes concentrações expressas em porcentagem: malathion 1; 2; 3; 4; 5; 7; 8 e  $10 \times 10^{-3}$  %, thiametoxam 0,2; 0,5; 1; 2; 3 e  $4 \times 10^{-3}$  % e 0,5; 1; 5; 7; 5; 8 e  $10 \times 10^{-3}$  %. Após 24 horas foi realizada a contagem das formigas mortas e as vivas foram sacrificadas para análise eletroforética. Os inseticidas utilizados foram o organofosforado malathion, o neonicotinóide thiametoxam e o regulador de crescimento azaractina.

## **2.5. Análise dos dados**

Os resultados foram avaliados utilizando o programa SPSS 13.0, para a análise da  $CL_{50}$  e para a correlação entre a concentração do inseticida e a mortalidade dos indivíduos.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise eletroforética das amostras de *Acromyrmex niger* homogenizadas individualmente, foram detectadas 8 regiões de atividade esterásica, as quais foram denominadas de EST-1, EST-2, EST-3, EST-4, EST-5, EST-6, EST-7 e EST-8 de acordo com a mobilidade eletroforética (Figura1).



Figura 1 - Perfil eletroforético das esterases de extratos de *Acromyrmex niger* (números de 1 a 6). Coloração com alfa e beta-naftil acetato. A seta indica o sentido da migração.

Quanto à especificidade aos substratos  $\alpha$ -naftil acetato e  $\beta$ -naftil acetato, podemos classificar EST-7 a EST-8 como  $\alpha$ -esterases e as demais como  $\alpha\beta$ -esterases. Podemos ainda salientar que as EST-7 e EST-8 podem ser consideradas marcadores para a identificação de *Acromyrmex niger*, pois outra espécie importante de formigas cortadeiras, a *Atta capiguara*, possui apenas as 6 regiões esterásicas (Cantagalli et al., no prelo).

Nos insetos, as esterases têm sido classificadas em 4 classes baseadas na sensibilidade aos inibidores organofosforados, sulfato de eserina e reagentes sulfidrílica. Conforme a classificação proposta por Healy et al. (1991), as

carboxilesterases são inibidas pelos organofosforados, mas são insensíveis ao sulfato de eserina; as colinesterases são sensíveis aos organofosforados e ao sulfato de eserina; as arilesterases não são inibidas pelos organofosforados, mas são sensíveis aos reagentes sulfidrílica e as acetilesterases não são inibidas pelos três grupos de inibidores.

Segundo Healy et al. (1991), o grupo das colinesterases pode ser dividido em duas subclasses (I e II) de acordo com seu padrão de inibição frente ao p-CMB. Colinesterase inibida pelo p-CMB pertence à subclasse II, e a não inibida pertence à subclasse I. O presente estudo submeteu as amostras de *A. niger* aos três grupos de inibidores anteriormente citados e revelou que a região EST-5 de *A. niger* deve ser classificada como colinesterase II e as demais como carboxilesterases (Quadro 1).

Quadro 1 - Atividade e classificação das esterases com a utilização de inibidores em *Acromyrmex niger*. (+) inibição, (-) não inibição

Esterases	Malathion	P-CMB	Sulfato de eserina	Classificação
EST-1	+	-	-	Carboxilesterase
EST-2	+	-	-	Carboxilesterase
EST-3	+	-	-	Carboxilesterase
EST-5	+	+	+	Colinesterase (II)
EST-6	+	-	-	Carboxilesterase
EST-7	+	-	-	Carboxilesterases
EST-8	+	-	-	Carboxilesterases

Dentre as esterases, as carboxilesterases e colinesterases são as mais frequentes em insetos, possivelmente porque estas desempenham papel fundamental na detoxificação de compostos xenobióticos, participando da resistência aos inseticidas em diversos grupos de insetos. Assim, as esterases detectadas em *A. niger* podem estar participando da desintoxicação do organismo desses insetos após o contato ou ingestão de inseticidas.

Essas enzimas podem também ser utilizadas como biomarcadores da exposição a pesticidas, para a detecção da presença e toxicidade de resíduos de

pesticidas usados na agricultura e como componentes de programa de monitoramento ambiental (Bonacci, et al., 2004).

Os inseticidas utilizados neste trabalho, como o organofosforado malathion, desencadeiam mecanismos que envolvem o aumento na detoxificação metabólica por hidrólise ou seqüestro destes compostos (Hemingway 2000, Lee e Lees 2001, Cui et al., 2007) ou alterações estruturais na acetilcolinesterase, alvo primário para esta classe de inseticida (Hsu et al., 2006). Os neonicotinóides, como o thiametoxam, atuam sobre os receptores nicotínicos da acetilcolina, como agonistas parciais ou completos (Déglise et al., 2002; Tomizawa e Casida, 2003). Os inseticidas reguladores de crescimento como a azaractina, um composto existente no óleo de Neem (*Azadirachta indica*), agem sobre a estrutura do tegumento dos insetos e sobre os mecanismos de controle da metamorfose e ecdise, atuando, principalmente, nas fases imaturas dos insetos (Carvalho, 1999).

Para o bioensaio com o malathion a  $CL_{50}$  foi  $8,7 \times 10^{-3}$  %. Na Figura 2 podemos observar por meio da análise de regressão que não há correlação entre a mortalidade e a concentração deste inseticida, pois o valor de  $R^2$  0,019 foi considerado muito baixo. Mas podemos destacar sua alta toxicidade baseado no valor extremamente baixo da  $CL_{50}$ , o que pode interferir no comportamento de insetos benéficos que não são alvo do inseticida, prejudicando seu modo de vida e reprodução.

O neonicotinóide thiametoxam apresentou alto valor de  $R^2$  0,916 (Figura 3). Na análise de regressão do uso desse inseticida, foi demonstrado que há uma correlação entre a mortalidade e a concentração do produto, ou seja, quanto maior a concentração, maior a mortalidade dos indivíduos, o que de fato poderia influenciar na mortalidade de indivíduos das populações que vivem expostas a esse inseticida. O valor da  $CL_{50}$  foi de 0,3882%. Nesse caso, após estudos de campo, a mortalidade de formigas *A. niger* possui potencial para ser utilizada como bioindicador da presença de thiametoxam no ambiente.

Os resultados obtidos para o regulador de crescimento (azaractina) mostraram que assim como o malathion não existe uma correlação entre a mortalidade de indivíduos e a concentração utilizada, pois o valor de  $R^2$  0,083 que também é considerado baixo (Figura 4). O valor da  $CL_{50}$  foi 4,9 %, sendo este o inseticida que causou a menor mortalidade.

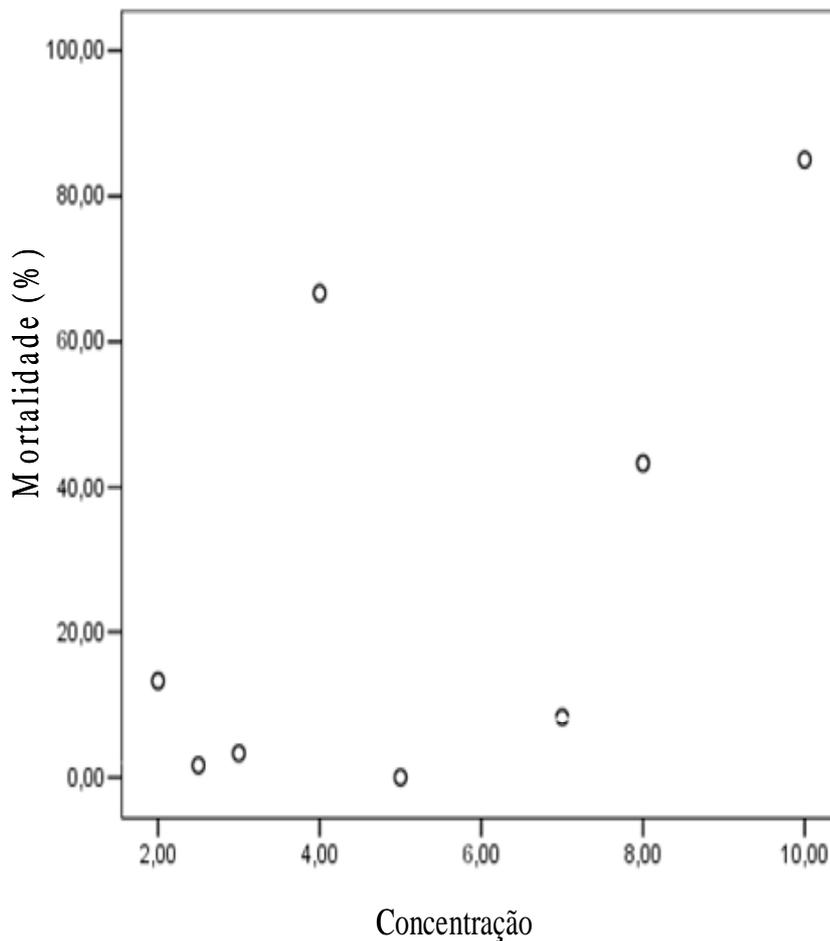


Figura 2 - Mortalidade de *Acromyrmex niger* em diferentes concentrações do organofosforado malathion.  $R^2=0,0019$ .

A análise das eletroforeses indicou que não houve qualquer alteração na expressão gênica das esterases na presença do inseticida neen e do actara. Porém, Hashimoto et al. (2003) observaram alterações na atividade das esterases 1 e 2 de 50% de operárias de *Apis mellifera* com 1 e 3 dias de exposição ao inseticida, após a aplicação tópica do inseticida thiametoxam. A esterase 5 apresentou atividade reduzida em 50%, 25% e não apresentou atividade em operárias com 3, 4 e 5 dias de exposição, respectivamente. Segundo esses autores, essas regiões de atividade esterásica podem ser usadas para detectar a presença de resíduos do inseticida thiamethoxam

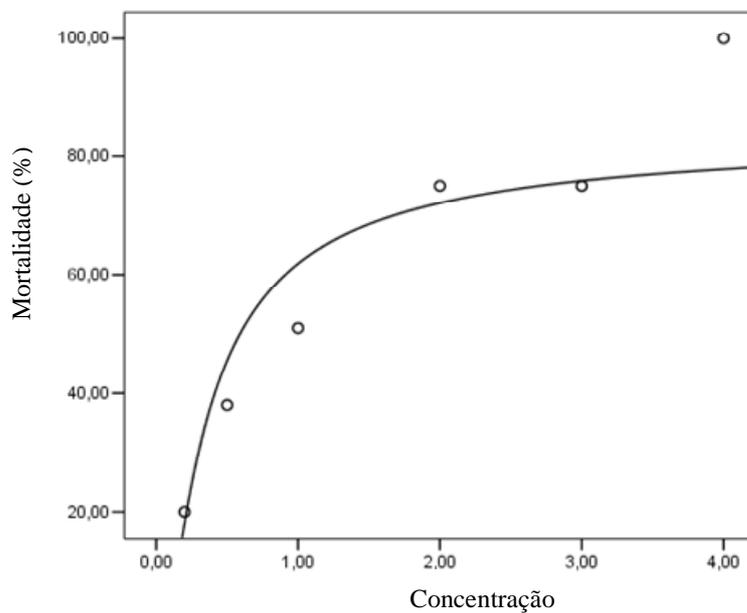


Figura 3 - Curva de regressão (sigmóide) para os valores de mortalidade de *Acromyrmex niger* em diferentes concentrações do thiametoxam.  $R^2=0,916$ .

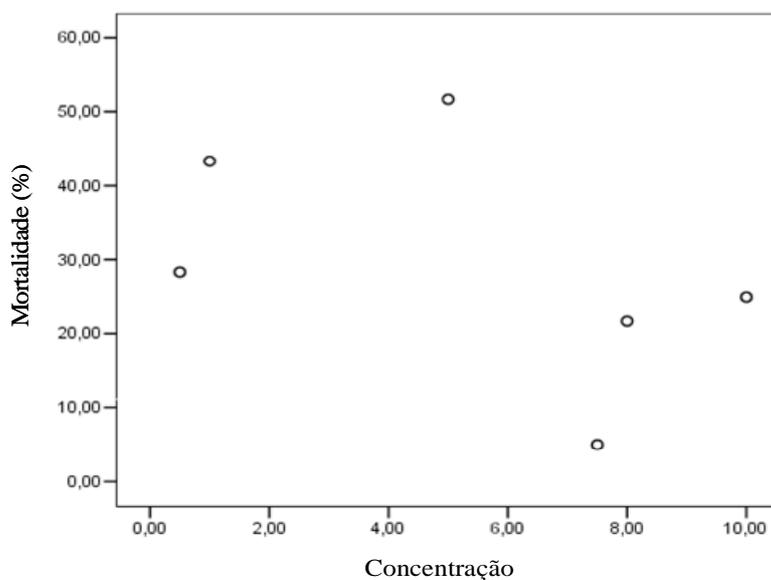


Figura 4 - Mortalidade de *Acromyrmex niger* em diferentes concentrações do regulador de crescimento.  $R^2=0,083$ .

Attencia et al. (2005) trabalharam com operárias de *Apis mellifera* e detectaram que na concentração de 0,01% do inseticida metil-parathion a atividade da esterase-1 foi reduzida em 75%, 14 e 21 dias após a introdução do inseticida. Uma inibição de 50% foi encontrada para esterases 3 e 4, um dia após a introdução do inseticida. A adição do malathion causou um efeito similar na alteração da atividade das esterases 3 e 4, pois reduziu a atividade em 25% na maior concentração utilizada que foi 0,5%. Esses resultados sugeriram que as esterases 3 e 4 podem ser usadas para detectar a presença de resíduos de metil-parathion e malathion no ambiente.

No presente trabalho com *A. niger*, foi observada a inibição parcial de todas as esterases de formigas submetidas ao contato com malathion nas concentrações  $1 \times 10^{-3}$  % e  $5 \times 10^{-3}$ % (Quadro 2). Esse padrão de inibição parcial pode ser considerado um biomarcador para a presença de resíduos desse agrotóxico.

Quadro 2 - Inibição da atividade das esterases detectada em *Acromyrmex niger* após contato com o malathion, o thiametoxam e o regulador de crescimento. (-) ausência de inibição; (±) inibição parcial

Esterase	Concentrações malathion ( $\times 10^{-3}$ %)									Concentrações thiametoxam (%)						Concentrações regulador de crescimento (%)					
	1	2	3	4	5	7	8	10	0,2	0,5	1	2	3	4	0,5	1	5	7,5	8	10	
EST-1	±	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
EST-2	±	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
EST-3	±	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
EST-4	±	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
EST-5	±	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
EST-6	±	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
EST-7	±	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Assim, de um modo geral, *Acromyrmex niger* não pode ser considerada um bom bioindicador ambiental de resíduos de agrotóxicos no ambiente quando utilizamos o parâmetro alteração da expressão das esterases nas condições realizadas neste trabalho.

Apesar do presente estudo não avaliar testes em campo, os baixos valores para a  $CL_{50}$  obtidos *in vitro* para os três agrotóxicos utilizados podem sugerir que esses inseticidas nas quantidades indicadas para a agricultura, provavelmente afetarão de maneira mais intensa a viabilidade desses insetos que ficariam expostos por mais tempo ao agrotóxico. Assim, bioensaios de campo precisam ser realizados e os indivíduos expostos aos agrotóxicos levadas ao laboratório para estudo das esterases. Principalmente no caso do thiametoxam, que apresentou correlação entre a dose do neonicotinóide e a mortalidade de *Acromyrmex niger* após a contaminação, ou seja, mostrou que a avaliação da mortalidade dessas formigas tem potencial para ser utilizada como parâmetro para detecção de resíduos do thiametoxam.

#### 4. CONCLUSÕES

a) A correlação entre dose e mortalidade de *Acromyrmex niger* após a contaminação com neonicotinóide thiametoxam mostrou que a avaliação da mortalidade dessas formigas tem potencial para ser utilizado como parâmetro para detecção de resíduos desse agrotóxico.

b) A análise das esterases da formiga cortadeira *Acromyrmex niger* não pode ser considerada um bom bioindicador de resíduos do neonicotinóide thiametoxam e do regulador de crescimento azaractina.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATTENCIA, V.M.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M.C.C.; TOLEDO, V.A.A. Esterase activity in *Apis mellifera* after exposure to organophosphate insecticides (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, 45:87-595, 2005

AUGUSTIN, E.; LOECK, A. E.; STORCH, G.; GRÜTZMACHER, D.D.; AFONSO, A.P.S.; GUSMÃO, L. G. Identificação de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae) através de isoenzimas. **Revista Brasileira de Agrociências**, 5:2, 217-220, 1999.

BONACCI, S.; BROWNE, M.A.; DISSANAYAKE, A.; HAGGER, J.A.; CORSI, I.; FOCARDI, S.; GALLOWAY, T.S. Esterase activities in the bivalve mollusc *Adamussium colbeckias* as a biomarker for pollution monitoring in the Antarctic marine environment. **Marine Pollution Bull**, 49:445-455, 2004.

CANTAGALLI, L.B.; MANGOLIN, C.A.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M.C.C. Isoenzymatic Polymorphisms in Leaf-cutting Ants *Atta capiguara* Gonçalves (Hymenoptera; Formicidae). **Neotropical entomology**, 2009. (no prelo)

CARVALHO, C.F. Efeitos de compostos reguladores de crescimento de insetos sobre larvas e adultos de *Chrysoperla externa* (Hagen, 1891) (Neuroptera: Chrysopidae). **Ciências e Agrotecnologia**, 23:96-101, 1999.

CERON, C.R.; SANTOS, J.R.; CAMPOS BICUDO, H.E.M.C. The use of gelatin to dry cellophane wound slab gels in an embroidering hoop. **Brazilian Journal of Genetics**, 15:201-203, 1992

CUI, F.H.QU.J.; CONG, X.-L.; LIU, E.C.L.; QIAO. Do mosquitoes acquire organophosphate resistance by functional changes in carboxylesterases? **Faseb Journal**, 21:3584–3591, 2007

DÉGLISE, P.; GRÜNEWALD B.; GAUTHIER, M. The insecticide imidacloprid is a partial agonist of the nicotinic receptor of honeybee Kenyon cells. **Neuroscience Letters**, 321:13-16, 2002.

DIEHL, E.; CAVALI-MOLINA, S.; ARAÚJO, A.M. Isoenzyme variation in the leaf-cutting ants *Acromyrmex hayeri* and *Acromyrmex striatus* (Hymenoptera, formicidae). **Genetic and Molecular Biology**, 25:173-178, 2002.

EMERY, C.F. Formicidae, Subfam, Myrmicinae, in: Wytsman, Genera Insectorum. Bruxelles: **fasc.**,174:207-397, 1922.

FONSECA, R.C.; DIEHL, H. Riqueza das formigas (Hymenoptera, Formicidae) epigéicas em povoamentos de *Eucalyptus* spp. (Myrtaceae) de diferentes idade no Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, 48:95-100, 2004.

FOWLER, H.G.L.; FORTI, C.; BRANDÃO, C.R.F.; DELABIE, J.H.C.; VASCONCELOS, H.L. Ecologia Nutricional de formigas. In: PAZZINI, A.R.; PARRA, J.R.P. (org.). **Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas**. São Paulo: Manole/CNPq, 1991. p. 131-223.

GONÇALVES, C.R. O gênero *Acromyrmex* no Brasil (Hym., Formicidae). Petrópolis: **Studia Entomology**, 4:1-4, 1961.

HASHIMOTO, J.H.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M.C.C.; TOLEDO, V.A.A. Evaluation of the use of the inhibition esterases activity on *Apis mellifera* as bioindicators of insecticide thiamethoxam pesticide residues. **Sociobiology**, 42:693-699, 2003.

HEALY, M.J.; DUMANCIC, M.M.; OAKESHOTT, J.G.; Biochemical and physiological studies of soluble esterases from *Drosophila melanogaster*. **Biochemical Genetics**, 29:365-387, 1991.

HEMINGWAY, J. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 30:1009-1015, 2000.

HOLLOBLER, B., WILSON, E.O. **The Ants**. Massachusetts:The Belknap Press of Harvard University Press Cambridge,1990. 732p.

HSU, J.C.D.S.; HAYMER, J.W.; FENG, H.T. Mutations in the acetylcholinesterase gene of *Bactrocera dorsalis* associated to organophosphorus insecticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 36:396-402, 2006.

LEE, S.E.; LEES, E.M. Biochemical mechanisms of resistance in strains of *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae) resistant to malathion and chlorpyrifos-methyl. **Journal of Economic Entomology**, 94:706-713, 2001.

MANSOUR, S.A. Is it possible to use the honey bee adult as a bioindicator for the detection of pesticide residues in plants? **Acta Biologica Hungarica**, 38:69-76, 1987.

MOUTINHO, P.; NEPSTAD, D.C.; DAVIDSON, E.A. "Influence of leaf-cutting ant nests on secondary Forest growth and soil properties in Amazônia". **Ecology**, 84:1265-1276, 2002.

MOUTINHO, P.R.S.; NEPSTAD, D.C.; ARAÚJO, K.; CRISTOPHER, U. Formigas e Florestas: estudos para recuperação de áreas de pastagem. **Ciência Hoje**, 15:59-60, 1993.

PETERNELLI, E.F.O.; DELLA LUCIA, T.M.C.; MARTINS, S.V. "Espécies de formigas que interagem com as sementes de *Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae)". **Revista Árvore**, 28:733-738, 2004.

SILVA, R.R.; BRANDÃO, C.R.F. Formigas (Hymenoptera:Formicidae) como indicadoras da qualidade ambiental e da biodiversidade de outros invertebrados terrestres. **Biotemas**, 12:55-73, 1999.

THEO, C.A. Case for Revisiting the Safety of Pesticides: A Closer Look at Neurodevelopment. **Environmental Health Perspectives**.114:10-17, 2006.

TOMIZAWA, M.; CASIDA, J.E. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. **Annual Review of Entomology**, 48:339-364, 2003.

ZANETTI, R.; CARVALHO, G.A.; SANTOS, A.; SOUZA-SILVA, A.; GODOY, M.S. **Manejo integrado de formigas cortadeiras**. Lavras: UFLA, 2002.16p.

## CAPÍTULO II

### **Estrutura de populações por meio de RAPD em *Atta sexdens rubropilosa* forel, 1908 (Hymenoptera, formicidae)**

#### **RESUMO**

A variabilidade genética das formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa*, coletadas em Maringá (PR), Ivatuba (PR), Itambé (PR), Presidente Prudente (SP) e Dracena (SP), foi avaliada por meio da técnica PCR-RAPD. Foram utilizados 15 *primers* da Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA (OPA-01, OPA-02, OPA-03, OPA-04, OPA-07, OPA-10, OPA-11, OPA-14, OPA-18, OPA-19, OPB-11, OPB-12, OPB-17, OPC-20 e OPM-3) que produziram 148 fragmentos dos quais 123 apresentaram polimorfismo, correspondendo a 83,11%. A estimativa da diversidade genética pelo índice de Shannon foi de 0,3836 e desvio padrão  $\pm$  0,2335. Esses valores demonstram alta diversidade genética. O valor de  $G_{ST}$  (0,2372) indicou que as populações estão moderadamente diferenciadas, porém há acasalamentos entre as populações analisadas. As populações de Ivatuba e Itambé, apesar da pequena distância geográfica (33,8 Km), apresentaram a maior distância genética. Entre Maringá e Ivatuba (42,3 Km) foi estimada a menor distância genética, mostrando que essas populações não possuem barreiras para o cruzamento entre os reprodutores. O elevado valor de polimorfismo 83,11% e a capacidade de cruzamento entre as populações presentes nas regiões estudadas indicam que essa espécie de formiga cortadeira está bem adaptada à região e que deverão ser desenvolvidos programas integrados de controle dessa praga.

Palavras-chave: *Atta sexdens rubropilosa*, PCR-RAPD, variabilidade genética

**POPULATION STRUCTURE THROUGH RAPD OF *Atta sexdens rubropilosa*  
FOREL, 1908 (Hymenoptera, formicidae)**

**ABSTRACT**

The genetic variability of the leaf-cutting ants *Atta sexdens rubropilosa* collected in Maringá (PR), Ivatuba (PR), Itambé (PR), Presidente Prudente (SP) and Dracena (SP) was evaluated through the PCR-RAPD technique. It was used 15 primers of Operon Technologies Inc., Alameda, CA, U.S.A. (OPA-01, OPA-02, OPA-03, OPA-04, OPA-07, OPA-10, OPA-11, OPA-14, OPA-18, OPA-19, OPB-11, OPB-12, OPB-17, OPC-20 and OPM-3) which yielded 148 fragments of which 123 showed polymorphism, corresponding to 83.11%. The estimate of the genetic diversity by the Shannon index was 0.3836 and the standard deviation was  $\pm 0.2335$ . These figures show high genetic diversity. The  $G_{ST}$  value was 0.2372 indicating that the populations are moderately differentiated, but there is mating among the analyzed populations. The populations from Ivatuba and Itambé, despite the small geographical distance (33.8 km), showed the largest genetic distance. The lowest genetic distance was estimated in Maringá and Ivatuba (42.3 Km), showing that there are no barriers for the mating among the reproducers in these populations. The high value of polymorphism 83.11% and the capability of crossing among the populations in the studied regions indicate that this species of leaf-cutting ant is well adapted to the region, and that integrated control programs must be developed.

Key words: *Atta sexdens rubropilosa*, PCR-RAPD, genetic variability

## 1. INTRODUÇÃO

As formigas cortadeiras são consideradas pragas importantes na Região Neotropical, pois possuem ampla distribuição geográfica e hábito de corte de grande variedade de plantas nativas e cultivadas. Particularmente, a espécie *Atta sexdens rubropilosa* (Forel, 1908) traz prejuízos, principalmente às plantações de *Eucalyptus* e *Pinnus* spp. (Boaretto e Forti, 1997), cortando as folhas e ramos tenros, podendo destruir completamente as plantas (Oliveira, 1996).

Isso ocorre, principalmente, em plantios homogêneos, que favorecem o desenvolvimento de pragas como as formigas do gênero *Atta* e *Acromyrmex*, (Della Lucia, 1993).

As empresas de reflorestamento têm empregado o controle químico de formigas cortadeiras. Porém, aspectos econômicos e ambientais têm levado as empresas a melhorar o rendimento operacional das técnicas de controle químico. Nos últimos anos, aumentou o número de trabalhos nas áreas de controle biológico e de controle cultural, principalmente em relação à resistência de plantas, na tentativa de buscar alternativas ao químico, ou mesmo viabilizar uma associação de diferentes estratégias de controle (Della Lucia, 1993).

Em geral, as formigas proporcionam oportunidades únicas para a investigação de várias questões biológicas, evolutivas e populacionais. Isso porque suas colônias são altamente complexas pois possuem diversas castas. As formigas podem ser empregadas para estudos de comportamento ecológicos, estrutura genética de populações, além de oferecer um rico material para investigar a seleção por parentesco e o altruísmo (Brian, 1983; Sudd; Frank, 1987; Hölldobler e Wilson, 1990). As formigas são organismos haplodiplóides, pois os machos surgem a partir da partenogênese e as fêmeas a partir de ovos fertilizados. A ocorrência desses dois níveis de ploidia produz uma ferramenta importante para a análise genética (Dihel et al., 2002).

Alguns autores discutem que os organismos diplóides possuem maior variabilidade genética que organismos haplodiplóides (Pamilo et al., 1978; Falcão; Contel, 1990). Graur (1985) concluiu que o nível de socialidade é mais importante que a haplodiploidia na determinação da diversidade genética em himenópteros.

Desde a década de 1960, a análise de isoenzimas foi o método dominante na avaliação da variação genética em populações naturais. Atualmente, outras técnicas estão disponíveis para o estudo da diversidade genética, como o RAPD (*random amplified polymorphism DNA*) e todas apresentam vantagens e desvantagens (Ferreira e Grattapaglia, 1995). O RAPD se baseia na identificação do polimorfismo do DNA amplificado aleatoriamente por meio da utilização de um único iniciador de seqüência arbitrária, o qual é capaz de amplificar as seqüências de DNA incluídas entre dois sítios de anelamento (Welsh e McClelland 1990). Apesar de ser uma técnica que usa seqüências aleatórias, muitos trabalhos têm demonstrado sua eficiência na identificação de populações de insetos (Lopes-da-Silva et al., 2004) e estudos de variabilidade genética.

Cantagalli et al. (no prelo) analisaram a estrutura de populações de *Atta capiguara* (saúva-parda) da região de Tapejara (PR), por meio de polimorfismos isoenzimáticos, e observaram baixa variabilidade genética para esta espécie. Nesse sentido, o marcador RAPD foi utilizado no presente estudo para a análise da variabilidade genética e da estrutura de populações da formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa* (saúva limão) com o intuito de contribuir para o entendimento sobre a genética de populações dessas formigas cortadeiras, visando um melhor manejo dessa espécie.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Coleta das amostras biológicas

Soldados de *Atta sexdens rubropilosa*, facilmente identificados pelo seu odor característico de capim-limão, devido a uma glândula com função de alarme localizada na cabeça dessas formigas, foram coletadas em 5 regiões diferentes do estado do Paraná e São Paulo. No noroeste do Paraná, foram coletadas amostras de Maringá (23° 26'S, 51° 56' O), Itambé (23°39'39" S, 51°59'24" O) e Ivatuba (23°37'08" S, 52°13'15 O) . No estado se São Paulo as amostras foram coletadas em Presidente Prudente (22° 07' 04''S e 51° 22' 57'' O) e Dracena (21° 28' 57" S, 51° 31' 58" O). Os locais de coleta estão representados na Figura 1.

Em Maringá, Itambé e Ivatuba, foram coletados 4 ninhos de cada localidade; em Presidente Prudente e Dracena, 2 ninhos por localidade, totalizando 16 ninhos. O material coletado foi estocado em frascos plásticos a -20°C.

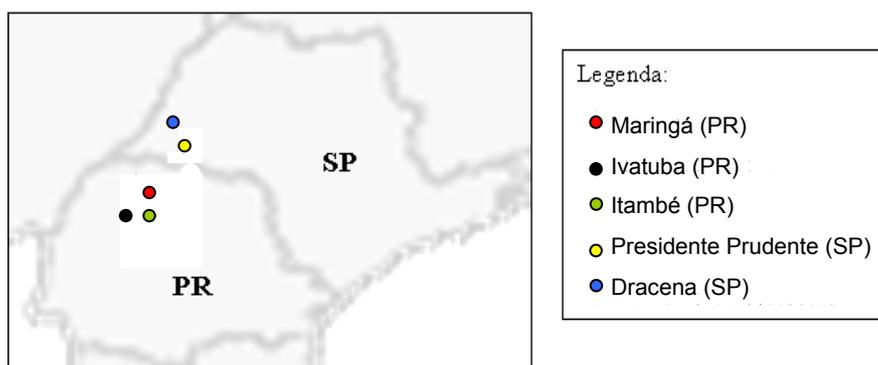


Figura 1 - Mapa dos Estados do Paraná e São Paulo, identificando os locais de coleta de *Atta sexdens rubropilosa* .

### 2.2. Isolamento do DNA

O DNA total foi extraído de 5 indivíduos de cada ninho, com exceção de um ninho de Ivatuba do qual foi possível extrair DNA de apenas 4 indivíduos,

totalizando 79 amostras. Somente as cabeças dos soldados foram utilizadas para evitar que nucleases existentes no trato digestório desses insetos degradassem as amostras.

O método usado para extração do DNA total foi o Método Yu et al. (1993) modificado. As cabeças foram homogeneizadas em tubos para 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 mg/mL Proteinase K]. Após 30 min de incubação a 65°C, o material foi centrifugado durante 10 min (10000 xg) e o sobrenadante transferido para um novo tubo, adicionando-se igual volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Após homogeneização e centrifugação para separação das fases, a fase superior foi transferida para um novo tubo. O DNA foi precipitado através da adição de 250 µL de isopropanol gelado e incubado a -20°C *overnight*. O DNA precipitado foi separado por centrifugação a 10.300 x g por 10 min. Após descarte do sobrenadante, o precipitado foi lavado com 1,0 mL de etanol 70% gelado e deixado secar à temperatura ambiente. Depois de seco, o DNA foi ressuscitado por duas horas em 50 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA), tratado com RNase (10 µg/mL) e permanecendo por mais duas horas na bancada antes de ser armazenado a -20°C.

A integridade e a quantificação do DNA foram avaliadas em gel de agarose 0,8% com tampão TAE 1X (Tris, Ácido acético, EDTA, pH 8,0). A quantidade de DNA presente em cada amostra foi estimada por meio de comparação com concentrações conhecidas e graduadas de DNA-padrão (phago λ). Os géis foram corados com banho de brometo de etídio (0,5 µg/mL) e as bandas de DNA visualizadas sob luz ultravioleta e a imagem capturada por sistema da EDAS (Kodak 1 D Image Analysis 3.5).

### **2.3. Amplificação da reação PCR-RAPD, separação e visualização dos produtos**

Para avaliar o genoma das populações de *Atta sexdens rubropilosa*, foram selecionados 15 *primers* da Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA (OPA-

01, OPA-02, OPA-03, OPA-04, OPA-07, OPA-10, OPA-11, OPA-14, OPA-18, OPA-19, OPB-11, OPB-12, OPB-17, OPC-20 e OPM-3).

As condições de amplificação foram baseadas na metodologia descrita por Williams et al. (1990). Para um volume de reação de 20  $\mu$ L foi utilizado tampão Tris-KCl 1X (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,3  $\mu$ M de *primer*, 0,1 mM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), uma unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen), e 20 ng de DNA molde. As reações foram realizadas em um termociclador “Eppendorf Mastercycler® Gradient”, programado para 45 ciclos, com uma desnaturação inicial a 96°C por cinco minutos e uma extensão final a 72°C por sete minutos. Cada ciclo consistiu de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 35°C e um minuto a 72°C. Um controle negativo de reação (com ausência de DNA molde) foi usado em cada grupo de amplificações para identificar possíveis contaminações.

Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose 1,7% a 60 volts usando tampão TBE 0,5X (Tris-borato, EDTA pH 8,0) e corados com banho de brometo de etídio (0,5  $\mu$ g/mL). Os fragmentos de DNA foram visualizados sob luz ultravioleta e a imagem capturada por sistema EDAS (Kodak 1 D Image Analysis 3.5).

Um marcador de peso molecular de DNA (DNA Ladder-Invitrogen) foi usado para determinar o tamanho dos fragmentos gerados (100 pb a 12 kb).

## **2.4 Análises dos dados**

As análises dos dados moleculares envolveram a interpretação dos fragmentos (bandas) de DNA genômico obtidos. Os indivíduos foram comparados dentro e entre as populações, sendo as comparações feitas pela presença (1) ou ausência (0) de fragmentos de tamanhos moleculares idênticos (localizados no mesmo loco) para cada indivíduo analisado.

A variabilidade genética, dentro e entre as populações, foi determinada pela porcentagem de locos polimórficos. A diversidade genética das populações analisadas foi calculada pelo índice de Shannon (I) (Lewontin, 1972). Também

foram calculados os valores de  $G_{ST}$ . Para o cálculo dessas análises foi utilizado o programa Popgene 1.31 (Yeh et al., 1999).

A matriz de similaridade foi submetida a uma análise de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average) para construção de um dendrograma, a fim de representar graficamente a distância genética das populações analisadas. Para esta análise foi utilizado o programa NTSYS 1.7, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, (Rohlf, 1989), baseado no complemento aritmético do coeficiente de Jaccard e o programa Popgene 1.31 (Yeh et al., 1999), baseado no complemento aritmético da distância genética de Nei (1978).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para verificar a variabilidade genética das espécies de *Atta sexdens rubropilosa* nas diferentes regiões de coleta (Figura 1) e a possibilidade da amplificação do DNA extraído, por meio da técnica PCR-RAPD, foram testados inicialmente 80 primers, dos quais 15 foram utilizados. O Quadro 2 mostra a seqüência de nucleotídeos dos *primers* selecionados, o número de fragmentos total e polimórficos e o tamanho dos fragmentos amplificados.

Carvalho e Vieira (2001) citam que a quantidade de DNA íntegro 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. Carvalho (2000) verificou que, para *Atta sexdens rubropilosa*, a quantidade ótima de DNA para as reações de RAPD está entre 19 e 30 ng. Nosso trabalho mostrou que foi possível extrair DNA de boa qualidade para amplificação em quantidades que variaram entre 10 e 40 ng.

Quadro 1 - *Primers*, seqüências de nucleotídeos, número de fragmentos por *primer* e número de fragmentos polimórficos, amplificados pela reação PCR-RAPD em populações de *Atta sexdens rubropilosa*

<i>Primer</i>	Seqüências de nucleotídeos	Número de fragmentos	Número de fragmentos polimórficos
OPA - 01	5'- CAGGCCCTTC -3'	09	09
OPA - 02	5'- GTGACGTAGG -3'	09	07
OPA - 03	5'- AGTCAGCCAC -3'	13	11
OPA - 04	5'- AATCGGGCTG -3'	08	06
OPA - 07	5'- GAAACGGGTG -3'	17	15
OPA - 10	5'- GTGATCGCAG -3'	04	03
OPA - 11	5'- CCACAGCAGT -3'	11	07
OPA - 14	5'- TCTGTGCTGG -3'	06	06
OPA - 18	5'- AGGTGACCGT -3'	09	08
OPA - 19	5'- CAAACGTCGG -3'	12	12
OPB - 11	5'- GTAGACCCGT -3'	11	08
OPB - 12	5'- CCTTGACGCA -3'	09	09
OPB - 17	5'- AGGGAACGAG -3'	11	07
OPC - 20	5'- ACTTCGCCAC -3'	09	07
OPM - 03	5'- GGGGGATGAG -3'	10	08
Total		148	123

O número de fragmentos nítidos e reproduzíveis gerados por primers em todas as populações analisadas variou de 4 a 17 fragmentos, uma média de 9,8 fragmentos por primer, e o tamanho dos produtos amplificados permaneceu entre 200 e 5000 pb. (Figura 2).

Os 15 primers usados na reação PCR-RAPD produziram 148 fragmentos. Foi observado que, do número total de fragmentos analisados, 123 apresentaram polimorfismo, correspondendo a 83,11%. Grutzmacherl et al. (2007) utilizaram 3 *primers* (UBC 354, UBC 348 e UBC356) RAPD para estudar a variabilidade genética de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* que ocorrem no Rio Grande do Sul e obtiveram 87 fragmentos.

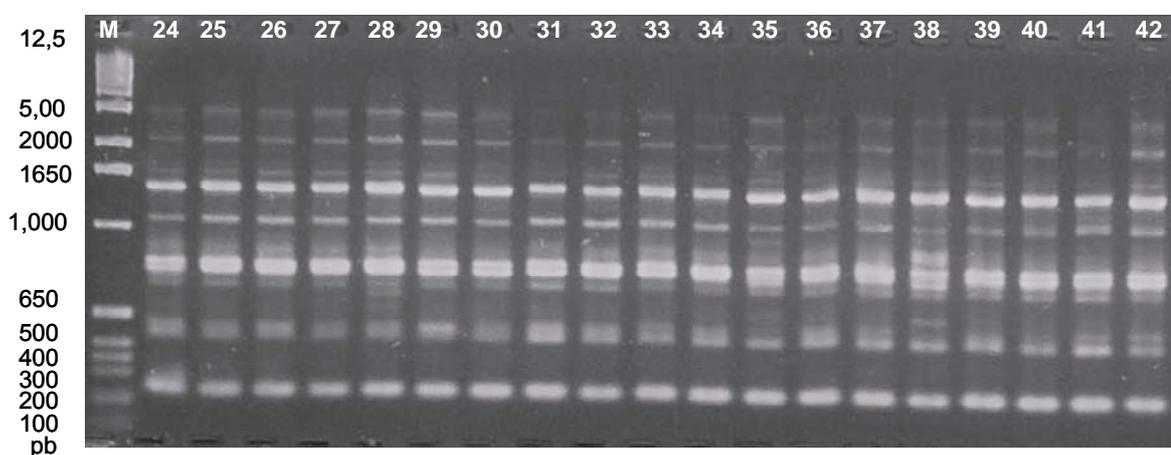


Figura 2 - Perfis eletroforéticos de RAPD de *Atta sexdens rubropilosa*. Fragmentos amplificados com o *primer* OPA-03. Amostras de Maringá (24 ao 42). M = Marcador de peso molecular de DNA (DNA Ladder-Invitrogen).

A estimativa da diversidade genética pelo índice de Shannon (0,3836) e o desvio padrão ( $\pm 0,2335$ ) indicaram alta diversidade genética. O alto valor de  $G_{ST}$  (0,2372) mostrou que as populações de *Atta sexdens rubropilosa* estão diferenciadas.

A análise dos valores da distância genética de Nei (1978) entre as cinco populações analisadas, permite inferir que as populações de Presidente Prudente e Ivatuba apresentaram as maiores distâncias genéticas, enquanto as populações de Maringá e Ivatuba apresentaram as menores distâncias. (Quadro 2).

Quadro 2 - Valores da Identidade Genética e Distância Genética de Nei (1978) obtidos pelo programa Popgene 1.31 para as cinco populações de *Atta sexdens rufopilosa*

Pop/ID	Ivatuba	Maringá	P. Prudente	Dracena	Itambé
Ivatuba	***	0,9583	0,8632	0,9346	0,8966
Maringá	0,0426	***	0,9094	0,9546	0,9264
P. Prudente	0,1472	0,0950	***	0,9011	0,9299
Dracena	0,0676	0,0464	0,1042	***	0,9068
Itambé	0,1092	0,0764	0,0727	0,0979	***

\*Os valores da Identidade genética de Nei estão representados acima da diagonal e a Distância de Nei estão abaixo da diagonal.

O dendrograma, baseado no complemento aritmético da distância genética de Nei (1978) (Figura 3), mostra que as populações de Dracena (SP) e Itambé (PR) possuem a mesma origem que as demais populações, porém estão geneticamente mais próximas que o esperado, pois Itambé (PR) é geograficamente muito próxima de Maringá (PR) e Ivatuba (PR).

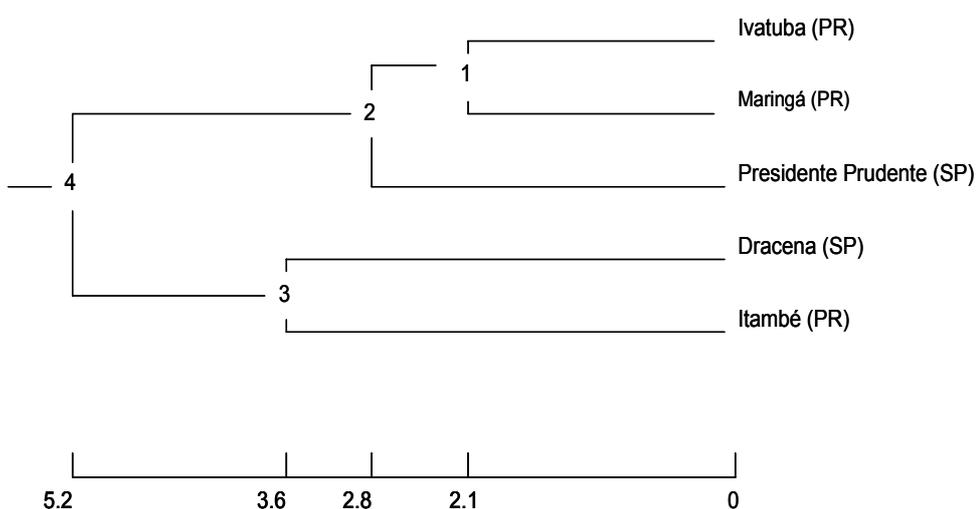


Figura 3 - Dendrograma baseado no complemento aritmético da distância genética de Nei (1978), obtido por marcadores RAPD. Os indivíduos das populações de *Atta sexdens rufopilosa* coletadas em Ivatuba, Maringá, Presidente Prudente, Dracena e Itambé, foram agrupados pelo método UPGMA, utilizando o programa Popgene 1.31.

O dendrograma, baseado no índice de similaridade de Jaccard (Figura 4), corrobora com o valor de  $G_{ST}$  indicando que as populações estão diferenciadas. As formigas cortadeiras do gênero *Atta* (saúvas) são insetos americanos. Nas Américas, sua área de dispersão vai do sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. Em todos os países americanos compreendidos nesta região há saúvas, exceto no Chile, em algumas ilhas das Antilhas e no Canadá (Sousa, 1996).

Primitivamente, nas florestas do Paraná, não havia saúvas. Estas entraram no estado seguindo o caminho da colonização. Os primeiros reflorestamentos ocorridos no Paraná foram iniciados na década de 40 (Bansho et al., 1994). Considerando o pequeno tempo de introdução de formigas *A. sexdens rubropilosa* no Paraná, em torno de 70 anos, elas apresentam um alto grau de diferenciação ( $G_{ST} = 0,2372$ ), porém há acasalamentos entre as populações analisadas.

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que as *A. sexdens rubropilosa* de Maringá, Ivatuba, Itambé, Presidente Prudente-SP e Dracena-SP tiveram uma origem em comum. Contudo, podemos separá-las em dois grupos, um formado por Maringá, Itambé e Presidente Prudente, e o segundo formado por Ivatuba e Dracena.

As populações de Ivatuba e Itambé apesar da pequena distância geográfica (33,8 Km) apresentaram a maior distância genética (Quadro 2), permitindo inferir que não está ocorrendo acasalamento entre reprodutores dessas populações, ou há pequeno número de hibridações. Já entre Maringá e Ivatuba (42,3 Km) foi estimada a menor distância genética (Quadro 2).

Portanto, os dados analisados indicam que não há relação entre distância genética e geográfica entre os ninhos estudados. O alto valor de diferenciação genética pode ter ocorrido devido à existência de um alto polimorfismo ancestral, seguido de deriva genética sem hibridação, pois essa espécie é monogínica.

O elevado valor de polimorfismo 83,11% e a capacidade de cruzamento entre as populações presentes nas regiões estudadas indicam que essa espécie de formiga cortadeira está bem adaptada à região e que deverão ser desenvolvidos programas integrados de controle dessa praga.

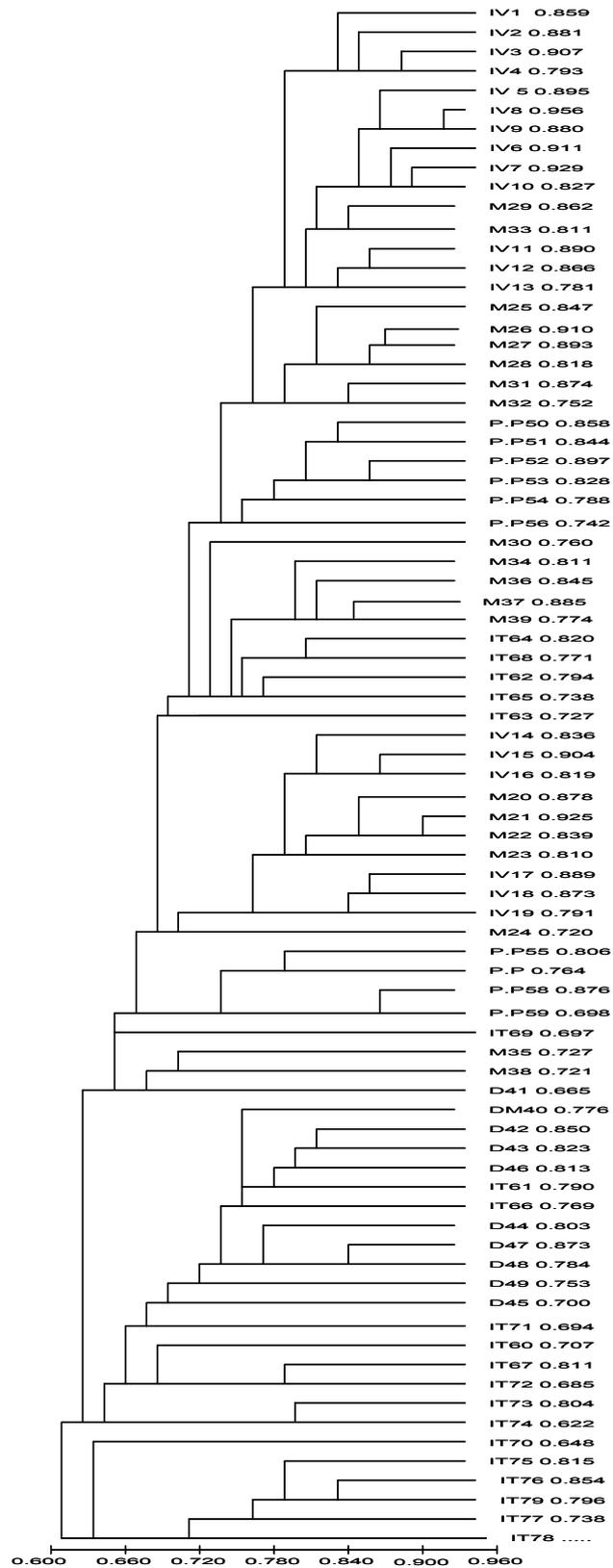


Figura 4 - Dendrograma baseado no complemento aritmético do coeficiente de Jaccard, obtido por marcadores RAPD. Os indivíduos de Ivatuba (IV), Maringá (M), Presidente Prudente (P.P), Dracena (D) e Itambé (IT) analisados foram agrupados pelo método UPGMA, utilizando o programa NTSYS.

#### 4. CONCLUSÕES

a) As populações de *Atta sexdens rubropilosa* (saúva limão) analisadas apresentaram alta porcentagem de locos RAPD polimórficos.

b) Apesar da recente introdução da saúva limão em Maringá, Ivatuba e Itambé, as populações analisadas já apresentam diferenciação genética, formando subpopulações.

c) As populações de Ivatuba e de Maringá apresentaram a maior similaridade genética.

## 5. CONCLUSÕES GERAIS

a) A avaliação da mortalidade de formigas *Acromyrmex niger* após contaminação com o neonicotinóide em doses subletais tem potencial para ser utilizada como bioindicador da presença desse agrotóxico.

b) Alterações no padrão do perfil eletroforético das esterases de *Acromyrmex niger* não podem ser consideradas bioindicadores da presença de resíduos do neonicotinóide thiametoxam e do regulador de crescimento azaractina.

c) As populações de *Atta sexdens rubropilosa* (saúva limão) das regiões de Maringá, Ivatuba, Itambé, Presidente Prudente e Dracena apresentaram alta porcentagem de locos RAPD polimórficos.

d) As populações de saúva limão de Maringá, de Ivatuba e de Itambé mostraram diferenciação genética, apesar do pequeno tempo de sua introdução na região.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANSHO, J.Y.; CARNEIRO, D.A.; CORDEIRO, L. Controle de formigas cortadeiras na KFPC – PR. In: III Curso de Atualização no Controle de Formigas Cortadeiras, 1994. **Resumos...** Piracicaba: IPEF/GTFC, 1994, p. 41-50.

BOARETTO, M.A.; FORTI, L.C. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. **Série Técnica, IPEF**, 11:31-46, 1997.

CARVALHO, A.O.R. **Análise da variabilidade genética e identificação de espécies do gênero *Atta* (Hymenoptera: Formicidae) por meio de marcadores moleculares.** Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2000. 134p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas).

CARVALHO, A.O.R.; VIEIRA, L.G.E. Determinação das condições ótimas para análises de PCR-RAPD em *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). Londrina: **Neotropical Entomology**, 4: 593-600, 2001.

DELLA LUCIA, T.M.C. **As formigas cortadeiras.** Viçosa: Folha de Viçosa, 1993. 262p.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220p.

GRUTZMACHERI, D.D.; LOECK, A.E.; OLIVEIRA A.C.; ZIMMER, P.D.; MALONE, G. Variabilidade genética interespecífica em formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* que ocorrem no Estado do Rio Grande do Sul. Santa Maria: **Ciência Rural**, 37:921-927, 2007.

LEWONTIN, R.C. The apportionment of human diversity. **Evolutionary Biology**, 6:381-398, 1972.

LOPES-DA-SILVA, M.; TONET, G.E.L.; VIEIRA, L.G.E. Characterization and genetic relationships among brazilian biotypes of *Schizaphis graminum* (Rondani)

(Hemiptera: Aphididae) using RAPD markers. Londrina: **Neotropical Entomology**, 33:43-49, 2004.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, 89:583-590, 1978.

OLIVEIRA, M.A. **Identificação de formigas cortadeiras e efeito do desfolhamento simulado em plantios de *Eucalyptus grandis***. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1996. 61p. Dissertação (Mestrado em Entomologia).

ROHLF, F.J. **NTSYS-Pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System**. New York: Exeter Publishers, 1989.

SOUSA, N.J. **Avaliação do uso de três tipos de porta-iscas no controle de formigas cortadeiras, em áreas preparadas para a implantação de povoamentos de *Pinus taeda* L.** Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1996. 72p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal). Disponível em: <<http://www.floresta.uftpr.br/~lpf/pragas01.html>>, acesso em: 30, julho, 2007.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M.; Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, 18:7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, 18: 6531-6535, 1990.

YEH, F.C.; BOYLE, T.Y.Z.; XIYAN, J.M. **POPGENE Version 1.31**: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis. Edmonton: University of Alberta and Center for International Forestry Research, 1999.

YU, K.F.; VAN DEYNZE, A.; PAULUS, K.P. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. In: BR Glick (ed.). **Methods in plant molecular biology and biotechnology**. USA: CRC Press, 1993. p. 287-301.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)