

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOLOGIA MOLECULAR



Caracterização genética de populações de
Pachycondyla (Hymenoptera: Formicidae) do complexo
foetida

REBECA PEREIRA DOS SANTOS

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Fevereiro 2014

REBECA PEREIRA DOS SANTOS

**Caracterização genética de populações de
Pachycondyla (Hymenoptera: Formicidae) do complexo
*foetida***

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz,
como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Genética e Biologia Molecular.

Área de Concentração: Genética e
Biologia Molecular

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Fevereiro 2014

S237 Santos, Rebeca Pereira dos.
Caracterização genética de populações de Pchycondyla
(hymenoptera : formicidae) do complexo foetida / Rebeca Pereira
dos Santos. Ilhéus : UESC, 2014.

xi, 57f.

Orientadora : Janisete Gomes da Silva Miller.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Santa
Cruz. Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Mole-
cular.

Inclui referências e apêndices.

1. Formiga – Bahia. 2. Formiga – Espírito Santo. 3. Formiga -
Filogenia. 4. Genética de populações. I. Miller, Janisete Gomes da
Silva. II. Título.

CDD – 595.79

REBECA PEREIRA DOS SANTOS

**Caracterização genética de populações de
Pachycondyla (Hymenoptera: Formicidae) do complexo
*foetida***

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz,
como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Genética e Biologia Molecular.

Área de Concentração: Genética e
Biologia Molecular

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Fevereiro 2014

REBECA PEREIRA DOS SANTOS

**Caracterização genética de populações de
Pachycondyla (Hymenoptera: Formicidae) do complexo
*foetida***

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz,
como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Genética e Biologia Molecular.

Área de Concentração: Genética e
Biologia Molecular

APROVADA: 27 de fevereiro de 2014

Dr. Rogério Rosa da Silva
(MPEG)

Prof. Dr. Paulo dos Santos Terra
(UESC)

Prof. Dr. Ronan Xavier Corrêa
(UESC)

Prof.^a Dra. Janisete Gomes da Silva Miller
(UESC – Orientadora)

DEDICATÓRIA

“A Deus, aos meus pais Iraildo e Suzana e ao meu esposo Carlos com amor dedico”

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Santa Cruz, pelo compromisso com a qualidade do ensino e pesquisa brasileira e com a formação dos alunos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de estudos;

À Prof. Dra. Janisete Gomes da Silva Miller, pela oportunidade, pelos ensinamentos, pela orientação, e pelo apoio durante todo o mestrado e em todas as atividades do curso e por ter acreditado em mim;

À Prof. Dra. Cléa Mariano Ferreira Santos pela co-orientação e pelos ensinamentos;

Ao Prof. Dr. Marco Antônio Costa pela sabedoria pelos excelentes conselhos, e por compartilhar seus conhecimentos;

Ao Dr. Jacques Hubert C. Delabie pela gentileza e toda assistência profissional, pela identificação de todo material biológico e pelos ensinamentos e esclarecimentos nos momentos de dúvidas,

Ao meu esposo companheiro e amigo por todo carinho incentivo e, sobretudo pela compreensão;

Aos meus pais e meus irmãos pelas palavras de conforto e incentivo em prosseguir nessa longa jornada da vida acadêmica;

À todos os meus amigos de laboratório que compartilham os momentos bons e ruins, e que sempre estão dispostos a ajudar e em especial a Kátia, Daniela, Emanuelle, João, Flora e Patrícia pelo bom convívio;

À Kátia, pela amizade, pelo empenho em ajudar por compartilhar de suas experiências e pelos esclarecimentos em meio às dúvidas;

À João Paulo, Leonny e Emanuelle, pela amizade, companheirismo e pela grande ajuda nas coletas,

À todos os colegas e amigos que contribuíram coletando material biológico;

ÍNDICE

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. A subfamília Poneriane.....	3
2.2. O gênero <i>Pachycondyla</i>	4
2.3. O complexo <i>foetida</i>	5
2.4. Métodos de análise filogenética com genes mitocondriais e nucleares nos estudos em Formicidae	7
3. OBJETIVOS.....	9
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
4.1. Coletas de Material Biológico.....	10
4.2. Extração de DNA	11
4.3. Amplificação dos genes mitocondriais e nuclear via PCR	12
4.4. Purificação dos produtos de PCR.....	13
4.5. Sequenciamento dos fragmentos de DNA amplificados.....	13
4.6. Análises das sequências dos fragmentos	14

4.7 Alinhamento das sequências e análises filogenéticas.....	14
5. RESULTADOS.....	16
5.1. Coletas de Material Biológico.....	16
5.2. Extração de DNA e amplificação dos fragmentos das regiões COI, 16S e ITS1.....	17
5.3. Sequenciamento e Alinhamento.....	18
5.3. Análise filogenética do gene mitocondrial COI	19
5.4. Análise filogenética do gene mitocondrial 16S	25
5.5. Análise filogenética do espaçador interno transcrito ITS1.....	30
5.6 Análise filogenética dos dados concatenados	35
6. DISCUSSÃO.....	40
7. CONCLUSÃO	45
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
APÊNDICE 1.....	51
APÊNDICE 2.....	52
APÊNDICE 3.....	53
APÊNDICE 4.....	54

RESUMO

O complexo *foetida* é composto por 13 espécies de formigas neotropicais do gênero *Pachycondyla*. No Brasil, ocorrem sete das 13 espécies válidas que compõem esse complexo e três dessas espécies são frequentemente simpátricas no sul da Bahia, *Pachycondyla villosa* Fabricius (1804), *Pachycondyla inversa* Smith (1858) e *Pachycondyla bactronica* Fernandes, Oliveira & Delabie (2013). Por muito tempo essas três espécies, as quais compartilham morfologia bastante similar, permaneceram sob o nome de um único táxon, *P. villosa*. Diferenças morfométricas, bioquímicas, cariotípicas, comportamentais e morfológicas foram usadas para caracterizar essas três espécies do complexo *foetida*. Entretanto, dados moleculares para o estudo comparativo dessas espécies são escassos. Neste estudo, foram caracterizadas geneticamente populações das três espécies do complexo *foetida* coletadas em oito localidades do sul da Bahia e duas localidades do Espírito Santo. Essa caracterização foi baseada no sequenciamento de fragmentos dos genes mitocondriais citocromo oxidase I (COI) e do RNA ribossomal 16S (16S), além da região do espaçador interno transcrito 1 (ITS1). As análises filogenéticas foram realizadas utilizando os métodos de Máxima Parcimônia, Máxima Verossimilhança, Neighbor-Joining e análise Bayesiana. Os resultados foram congruentes para as quatro análises filogenéticas diferentes para as três regiões sequenciadas. Os dados corroboram a existência de três táxons distintos. Três principais clados compuseram as árvores geradas para as três regiões que revelaram que as espécies, *P. villosa*, *P. inversa* e *P. bactronica* formaram grupos monofiléticos.

Palavras-chave: Complexo *foetida*, caracterização genética, filogenia, sequenciamento

ABSTRACT

The *foetida* complex comprises 13 species of Neotropical ants in the genus *Pachycondyla*. In Brazil, there are seven of the 13 valid species that comprise this complex and three of these species are often sympatric in southern Bahia, *Pachycondyla villosa* Fabricius (1804), *Pachycondyla inversa* Smith (1858) and *Pachycondyla bactronica* Fernandes Oliveira & Delabie (2013). For a long time these three species, which share very similar morphology, remained under the name of a single taxon, *P. villosa*. Morphological, biochemical, karyotypic, morphological, and behavioral differences were used to characterize these three species within the *foetida* complex. However, molecular data for the comparative study of these species are scarce. In this study, populations were genetically characterized for three species in the *foetida* complex collected in eight localities in southern Bahia and two localities in the state of Espírito Santo. This characterization was based on the sequencing of fragments of the mitochondrial genes, cytochrome oxidase I (COI) and 16S ribosomal RNA (16S) in addition to the internal transcribed spacer 1 (ITS1) region. Phylogenetic analyzes were performed using the methods of Maximum Parsimony, Maximum Likelihood, Neighbor-Joining and Bayesian analysis. The results were similar for the four different phylogenetic analyses for the three sequenced regions. The data supported the existence of three distinct taxa. Three major clades composed the trees generated for the three regions and revealed that the species, *P. villosa*, *P. inversa* and *P. bactronica* formed monophyletic groups.

1. INTRODUÇÃO

As formigas são insetos pertencentes à ordem Hymenoptera e estão reunidas dentro da família Formicidae. Com mais de 12.761 espécies descritas nos mais diversos habitats do mundo, esses organismos representam, em particular nos ecossistemas tropicais, o grupo animal mais abundante e diverso (AGOSTI; JOHNSON, 2005). São consideradas insetos eussociais por apresentarem sobreposição de gerações, cuidado com a prole e divisão do trabalho reprodutivo, sendo representadas hierarquicamente pela fêmea reprodutiva (rainha), fêmeas estéreis (operárias) e machos. Esses organismos são considerados ecologicamente dominantes e o seu sucesso ecológico pode ser atribuído a fatores como a eussocialidade, sua diversidade ecológica e plasticidade comportamental que permitem a ocupação e exploração de uma grande diversidade de nichos (HOLLDÖBLER; WILSON, 1990). Além disso, as formigas exercem um importante papel ecológico na dinâmica do ambiente (SILVESTRE et al., 2003).

A subfamília Ponerinae é constituída de diversas linhagens cosmopolitas. Essa subfamília é considerada basal por apresentar características consideradas ancestrais em formigas como tamanho pequeno das colônias, pouca diferenciação morfológica entre rainhas e operárias e forrageio individual (WILSON; HOLLDÖBLER, 2005). Dentro da subfamília Ponerinae, o gênero *Pachycondyla* é um dos mais antigos conhecidos e ainda existentes, sendo conhecida uma espécie fóssil, *Pachycondyla rebekkae* Rust & Andersen, de uma formação calcária dos primórdios do Terciário por volta de 55 milhões de anos (RUST; ANDERSEN, 1999). No gênero *Pachycondyla*, algumas espécies do complexo *foetida* na região Neotropical são frequentemente simpátricas e possuem morfologia bastante similar tendo sido classificadas por muito tempo como um único táxon, *Pachycondyla villosa* Fabricius (1804). Esse complexo era composto até recentemente por onze espécies, das quais cinco de ocorrência no Brasil, *Pachycondyla foetida* Linnaeus (1758), *Pachycondyla villosa* Fabricius (1804), *Pachycondyla inversa* Smith (1858), *Pachycondyla curvinodis* Forel (1899) e *Pachycondyla theresiae* Forel (1899). Porém, recentemente foram descritas mais duas novas espécies por Fernandes et al. (2013), *Pachycondyla billemma* Ferreira, Oliveira & Delabie (2013) e *Pachycondyla bactronica* Fernandes, Oliveira & Delabie

(2013). Assim, atualmente 13 espécies compõem o complexo *foetida*, sendo sete presentes no Brasil. As espécies desse complexo têm hábitos arborícolas, formam populações de até várias dezenas de indivíduos, nidificam em associação com plantas epífitas como bromélias ou em madeira oca, na periferia das quais caçam insetos ou visitam nectários extraflorais.

Considerando as dificuldades de identificação de espécies apoiada apenas em caracteres morfológicos, estudos genéticos aliados aos estudos taxonômicos em diversos grupos de animais fornecem informações úteis na compreensão de processos evolutivos. Os marcadores moleculares podem ser uma ferramenta útil para auxiliar na identificação de indivíduos ou mesmo de espécies crípticas e formular inferências filogenéticas para grupos supra-específicos (HARTL; CLARCK, 1997).

As análises de polimorfismo do DNA mitocondrial têm sido extensivamente utilizadas para inferir relações em genética de populações e para estudos filogenéticos em animais, devido ao modo de herança uniparental e ausência de recombinação (AVISE et al., 1987). Esse tipo de análise permite a elaboração de hipóteses para um melhor entendimento dos processos de especiação animal.

O presente estudo teve como objetivo caracterizar geneticamente três espécies válidas de *Pachycondyla* do complexo *foetida* no sul da Bahia e dois municípios do Estado do Espírito Santo. Para tal, foram analisadas populações de *Pachycondyla villosa* (Fabricius), *Pachycondyla inversa* (Smith) e *Pachycondyla bactronica* (Fernandes; Oliveira & Delabie) utilizando fragmentos dos genes mitocondriais, citocromo oxidase I (COI), RNA ribossomal 16S (16S) e a região ITS1 do rDNA. Os resultados para as regiões sequenciadas agruparam todos os espécimes de *Pachycondyla villosa* em um único clado, indicando tratar-se de um grupo monofilético enquanto as outras duas espécies do complexo *foetida*, *Pachycondyla inversa* e *Pachycondyla bactronica*, não se agruparam em um único clado.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A subfamília Ponerinae

Com cerca de 900 espécies descritas e distribuição predominantemente tropical, a subfamília Ponerinae é a terceira maior subfamília de formigas (BOLTON et al., 2006). As formigas Ponerinae representam uma linhagem diversa e cosmopolita cujas características tornam-nas um atraente modelo para estudos investigativos sobre a evolução ecológica e da eussocialidade das formigas. Esta subfamília é atualmente dividida em três tribos, Platythyreini, Thaumatomyrmecini e Ponerini. (SCHMIDT, 2013). A tribo Ponerini na região Neotropical é representada por dez dos 23 gêneros existentes (LATTKE, 2003).

Pelo fato de apresentarem características consideradas ancestrais, tanto em aspectos morfológicos quanto ecológicos e comportamentais, esta subfamília é considerada um grupo basal (LATTKE, 2003). Dentre as características ancestrais que colocam as Ponerinae em posição basal estão a pouca diferenciação morfológica entre rainhas e operárias, o forrageio predatório solitário, as colônias pouco populosas, além das rainhas fundadoras necessitarem sair dos ninhos para obter alimento (WILSON; HÖLLDOBLER, 2005). A partir dos caracteres ancestrais, as formigas da subfamília Ponerinae passaram por diversos processos evolutivos os quais originaram uma substancial diversidade de organização social e comportamentos que representam um sistema valioso para estudar como ocorreu a evolução de muitas características que têm surgido repetidamente durante o curso da evolução das formigas (SCHMIDT, 2013).

A evolução ecológica de Ponerinae tem sido marcada por uma diversificação nas preferências de substrato, no grau de cooperação entre as operárias e nos ambientes de forrageio. A maioria das formigas desta subfamília são predadoras generalistas de artrópodes e catadoras de extratos florais, mas um grande número de gêneros especializou-se em tipos específicos de presas, incluindo isópodes (SCHMIDT, 2009).

Quanto ao comportamento de forrageio, as formigas da subfamília Ponerinae podem ser divididas em duas categorias, epigeicas ou hipogeicas. As operárias epigeicas forrageiam na superfície do solo ou vegetação e

geralmente apresentam corpo robusto e olhos bem desenvolvidos, enquanto as operárias hipogeicas forrageiam sob o solo, serrapilheira ou madeira podre, e são geralmente pequenas com olhos pouco desenvolvidos ou ausentes (SCHMIDT, 2009).

2.2 O gênero *Pachycondyla*

O gênero *Pachycondyla* F. Smith 1858 representa o maior grupo de formigas da subfamília Ponerinae (WILD, 2002). As espécies do gênero *Pachycondyla* estão entre as espécies mais antigas do registro fóssil e ainda existentes (MARIANO et al., 2000). A distribuição geográfica de *Pachycondyla* é predominantemente pantropical e o gênero é constituído por 380 espécies e subespécies (MACKAY; MACKAY, 2010).

Estudos ecológicos relatam que a estrutura reprodutiva das formigas do gênero *Pachycondyla* pode apresentar uma ampla variedade e a divisão, organização e reprodução das colônias parecem estar diretamente associadas ao grau de agressividade dos indivíduos (D'ETTORRE et al., 2005; FERNANDES et al., 2013).

Em algumas espécies de *Pachycondyla* neotropicais, rainhas recém-acasaladas aparentadas ou não podem se associar para fundar uma nova colônia (KOLMER, 2002; LUCAS et al., 2002; D'ETTORRE et al., 2005; FERNANDES et al., 2013;). Colônias que são fundadas por uma única rainha são denominadas monogínicas enquanto colônias fundadas por rainhas em associação são conhecidas como poligínicas. Essa cooperação entre rainhas pode envolver relação hierárquica de dominância e subordinação na qual a rainha alfa predomina na ovoposição podendo ainda se alimentar dos ovos da rainha subordinada (oofagia) (KOLMER, 2002; D'ETTORRE et al., 2005).

Este gênero foi revisado por Mackay; Mackay (2010), os quais relataram 92 espécies válidas na Região Neotropical e dividiram o gênero em vários complexos de espécies com base em caracteres morfológicos. Para o Novo Mundo, são reconhecidos 18 complexos de espécies, entre eles, o complexo *Pachycondyla foetida*.

2.3 O complexo *foetida*

A correta identificação de espécies é um desafio antigo para a taxonomia. Dentre as causas que contribuem para confusões na correta identificação das espécies estão problemas na definição de espécie e conseqüentemente na sua delimitação, ocorrência de espécies crípticas, duas ou mais espécies que não podem ser distinguidas confiavelmente apenas com base na morfologia e complexos de espécies, espécies proximamente relacionadas com morfologia bastante similar, além de processos de especiação os quais originam novas espécies a partir de uma espécie ancestral. A especiação pode ocorrer sem que haja consideráveis mudanças morfológicas da espécie nova para a ancestral, e esse fato pode dificultar a correta identificação de espécies quando esta toma por base análise exclusivamente de caracteres morfológicos, os quais podem ser dúbios e confusos (BICKFORD, 2007; FERREIRA et al., 2010).

Muitos estudos apontam que grande parte das espécies existentes no mundo permanece desconhecida devido à ocorrência de complexo de espécies, duas ou mais espécies distintas que compartilham alta similaridade morfológica podendo ser classificadas erroneamente sob o nome de um único táxon (FERREIRA et al., 2010; ROSS et al., 2010; 2005; BICKFORD, 2007; BERNASCONI et al., 2011; LUCAS et al., 2002; SCHLICK-STEINER et al., 2006; SEIFERT, 2009).

Reconhecido como o gênero com maior diversidade na subfamília Ponerinae, as espécies neotropicais do gênero *Pachycondyla* foram agrupadas em diversos complexos de espécies pelos autores Mackay & Mackay (2010) com a finalidade de facilitar a identificação das espécies dentro do gênero. O complexo *foetida* compreende o segundo maior complexo em número de espécies, com 13 espécies reconhecidas (MACKAY; MACKAY, 2010).

Os indivíduos que compõem o complexo de espécies *P. foetida* possuem hábitos predominantemente arborícolas onde formam populações de até várias dezenas de indivíduos, instalados em associação com plantas epífitas como bromélias ou em madeira oca, na periferia das quais caçam insetos ou visitam nectários extraflorais (KOLMER, 2002).

As características gerais dos indivíduos para as espécies que compõem esse complexo são operárias com a superfície do corpo inteiramente coberta com pilosidade densa e coloração dos pêlos dourados; palpos cobertos por pubescência esparsa, carena malar bem desenvolvida; olhos grandes e ovais (localizados na metade anterior da cabeça; sulco notopropodeal profundo e bem marcado no dorso mesosomal; pecíolo subquadrado em vista lateral, com o rosto anterior vertical ou côncavo e face posterior amplamente arredondada. As rainhas são bastante similares às operárias, podendo ser diferenciadas das castas principalmente pelo tamanho maior do abdômen e pelas cicatrizes no local de inserção das asas no tórax (MACKAY; MACKAY 2010; FERNANDES et al., 2013)

Dentre as espécies do complexo *foetida* que ocorrem no território brasileiro, duas são observadas frequentemente em simpatria no litoral da Bahia, *P. villosa* e *P. inversa*, as quais têm sido objeto de estudos comparativos nas áreas de genética, ecologia e sistemática (TRINDL et al., 2004; LUCAS et al., 2002; MARIANO et al., 2006; TENTSCHERT et al., 2001; KOLMER et al., 2002; FERNANDES et al., 2013). Por mais de duas décadas, o status taxonômico das espécies de *Pachycondyla* do complexo *foetida* permaneceu nebuloso provavelmente por confusões causadas devido à grande similaridade morfológica entre as espécies que compõem o complexo e por apresentarem distribuição bastante ampla (FERNANDES et al., 2013).

Estudos comparativos com abordagem morfológica, citogenética e bioquímica apontaram que duas espécies do complexo *foetida* que ocorrem em simpatria na região do nordeste brasileiro, *P. inversa* e *P. villosa*, apresentam diferenças morfológicas, ecológicas e comportamentais tais como distinções na morfologia do pecíolo e composição de hidrocarbonetos cuticulares (LUCAS et al., 2002), no número de cromossomos que compõem o cariótipo (MARIANO, 2004) e na morfologia do clipeo (FERNANDES et al., 2013). No trabalho de Lucas et al. (2002), de discriminação de diferentes táxons no complexo de espécies *Pachycondyla villosa*, dados morfométricos, bioquímicos e químicos, caracterizaram e diferenciaram três táxons em populações de *P. villosa* coletadas em Ilhéus, Bahia, Brasil, citadas como *P. villosa*, *P. inversa* e *P. 'subversa'*, indicando a presença de mais de duas espécies. Recentemente, a espécie citada no trabalho destes autores como *P. 'subversa'* foi descrita por

Fernandes et al. (2013) como *P. bactronica*, encontrada no Brasil nos estados do Amapá, Paraná, Piauí, Sergipe, Bahia, Distrito Federal, São Paulo, Paraná e Santa Catarina, junto com outra nova espécie do complexo *foetida*, *P. billemma*, encontrada nos estados de Goiás, São Paulo e Rio de Janeiro (FERNANDES et al., 2013).

Atualmente o número de espécies do complexo *foetida* que ocorrem no Brasil são sete, *Pachycondyla villosa* (Fabricius), *Pachycondyla inversa* (Smith), *Pachycondyla curvinodis* Forel, *Pachycondyla foetida* Forel, *Pachycondyla theresiae* Forel, *Pachycondyla billemma* Fernandes, Oliveira & Delabie e *Pachycondyla bactronica* Fernandes, Oliveira & Delabie. A espécie nominal *P. villosa* é atualmente a mais citada na literatura dentre as espécies que compõem o complexo *foetida* (LUCAS et al., 2002; TRUNZER et al., 1998; HEINZE et al., 1996; DEJEAN et al., 1990; ZARA; CAETANO, 2003; MARIANO et al., 2000; D'ETTORRE et al., 2005). Alguns autores utilizam em seus trabalhos o termo grupo *P. villosa* ou ainda complexo *P. villosa* para se referir as três das espécies do complexo *P. foetida*, *P. villosa*, *P. inversa* e *P. bactronica* que ocorrem em simpatria na região Nordeste do Brasil (KOLMER, 2002; LUCAS et al., 2002; MARIANO, 2004).

2.4 Métodos de análise filogenética com genes mitocondriais e nucleares nos estudos em Formicidae

Até recentemente, a principal base para a classificação das formigas eram os caracteres morfológicos das operárias, porém, é cada vez mais evidente que aspectos da morfologia podem apresentar convergência, revelando a necessidade cada vez maior de incorporar fontes adicionais para inferir relações filogenéticas entre os grupos desses organismos (WARD, 2007).

Tendo em vista as dificuldades e limitações impostas à identificação de certos grupos de organismos com base apenas em caracteres morfológicos, o uso de dados moleculares tem crescido exponencialmente nas últimas décadas e têm desempenhado papel de importância crucial em trabalhos de reconstrução filogenética e identificação das espécies, particularmente aquelas que apresentam complexos de espécies e espécies crípticas como no caso das

formigas, produzindo resultados esclarecedores (BRADY et al., 2006; BRADY, 2003; MOREAU et al., 2006; WARD, 2007).

Até o momento, aproximadamente 40 genes mitocondriais e nucleares codificantes de proteínas já foram examinados em estudos de sistemática de insetos, além de regiões não codificadoras do DNA (CATERINO et al., 2000).

O DNA mitocondrial começou a ser utilizado pelos cientistas há cerca de uma década e meia para resolver questões genealógicas entre os indivíduos com base em sua ancestralidade comum. Esse genoma bastante compacto com ausência de íntrons é composto por 37 genes ligados em uma molécula circular e evolui mais rapidamente do que o DNA nuclear em animais (AVISE, 2009).

Em estudos com animais, os genes do DNA mitocondrial mais frequentemente sequenciados são citocromo oxidase I (COI), citocromo oxidase II (COII), 16S rDNA e 12S rDNA (CATERINO et al., 2000).

A maioria dos estudos moleculares em formigas utilizou o gene COI em suas análises (AYALA et al., 1996; BACCI et al., 2009; BERNASCONI et al., 2011; HALBERT et al., 2001; KNADEN et al., 2012; MARTINS et al., 2007; MOREAU, 2008; ROSS; SHOEMAKER, 2005; SCHLICK-STEINER et al., 2006; SANCHEZ-PENA et al., 2009). Outro gene mitocondrial bastante informativo e utilizado nesses estudos é o gene 16S (BERNASCONI et al., 2011; CROZIER et al., 1995; MOREAU, 2008; RESENDE et al., 2010;).

Apesar do uso do DNA mitocondrial ser mais frequente em estudos de sistemática de insetos, devido ao reconhecimento de que árvores de genes mitocondriais podem representar apenas uma visão parcial e até mesmo tendenciosa da filogenia do organismo, várias regiões nucleares têm sido usadas para filogenia de artrópodes. Em estudos de Diptera e Hymenoptera envolvendo análise do DNA nuclear, a predominância é para o uso da região 28S e do espaçador interno transcrito (ITS) (CATERINO et al., 2000).

Em diversos estudos envolvendo grupos de formigas, o sequenciamento do DNA tem gerado dados moleculares úteis para investigações em filogenia, genética de populações e distinção de espécies crípticas. No trabalho de Crozier et al. (1995), os autores utilizaram sequências de DNA mitocondrial para examinar a relação entre várias espécies que pertencem ao complexo *Myrmecia pilosula*; Ayala et al. (1996) utilizaram o sequenciamento de duas

regiões do DNA mitocondrial para reconstruir a filogenia de formigas *Azteca* da subfamília Dolichoderinae; Ross et al. (2005) compararam dados de sequenciamento do DNA com dados morfológicos na delimitação de três espécies nominais do gênero *Solenopsis* estreitamente relacionadas; Moreau et al. (2006), investigaram a história filogenética de 19 subfamílias de formigas utilizando cinco genes nucleares e um gene mitocondrial; Schlick-Steiner et al. (2006) investigaram a diversidade de formigas dentro do complexo *Tetramorium caespitum/impurum* por meio de análises filogenéticas do DNA mitocondrial aliadas às análises morfológicas; Bacci et al. (2009) sequenciaram regiões do DNA nuclear e mitocondrial para reconstruir a filogenia de formigas do gênero *Atta*; Rabeling et al. (2008) descreveram uma nova espécie de formiga, *Martialis heureka* (Rabeling & Verhaagh, 2008) membro da nova subfamília Martialinae, utilizando dados moleculares e morfológicos para inferir a filogenia; Bernaconi et al. (2011) utilizaram dados de nove locos microssatélites para auxiliar na delimitação e identificação de espécies crípticas de formigas do grupo *Formica rufa*; Knaden et al. (2012) realizaram um estudo de filogenia molecular dentro do gênero *Cataglyphis* por meio do sequenciamento de regiões do DNA mitocondrial. Em 2013, Schmidt publicou um estudo filogenético detalhado da subfamília Ponerinae através do sequenciamento de quatro genes nucleares.

3. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi caracterizar diferentes populações das três espécies simpátricas de *Pachycondyla* do complexo *foetida* ocorrentes no estado da Bahia, *Pachycondyla villosa*, *Pachycondyla inversa* e a nova espécie *Pachycondyla bactronica*, através de análises filogenéticas com base em sequências de DNA da região nuclear ITS1 e dos genes mitocôndrias, COI, e 16S.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta de material biológico

Os pontos de coleta abrangeram 10 localidades nos Estados da Bahia e Espírito Santo (Figura 1). As áreas de coleta foram determinadas com base em estudos preliminares a respeito da distribuição das três espécies do complexo *foetida* que ocorrem em simpatria na região sul da Bahia a partir das informações da coleção do Laboratório de Mirmecologia da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC/CEPEC), Ilhéus (BA). As áreas de coleta compreenderam matas primárias, secundárias, áreas de “cabruca”, coqueiral e áreas urbanas.

A maioria dos ninhos estava fixada na copa de árvores de grande porte de modo que a captura dos indivíduos diversas vezes foi realizada durante o ato de forrageio dos mesmos. Os indivíduos foram capturados com o auxílio de luvas e pinça entomológica. Os espécimes foram armazenados em tubos contendo etanol absoluto e os tubos foram marcados em campo. O material coletado foi levado ao Laboratório de Citogenética da UESC e conservado em freezer a -20°C .

Pelo menos um espécime adulto de cada colônia foi montado em alfinete entomológico. Os espécimes foram identificados pelo Dr. Jacques Delabie e depositados na Coleção Entomológica do Laboratório de Mirmecologia CEPEC/CEPLAC (CPDC) e documentados no livro de registro o número da colônia, data de coleta, e coletor responsável.

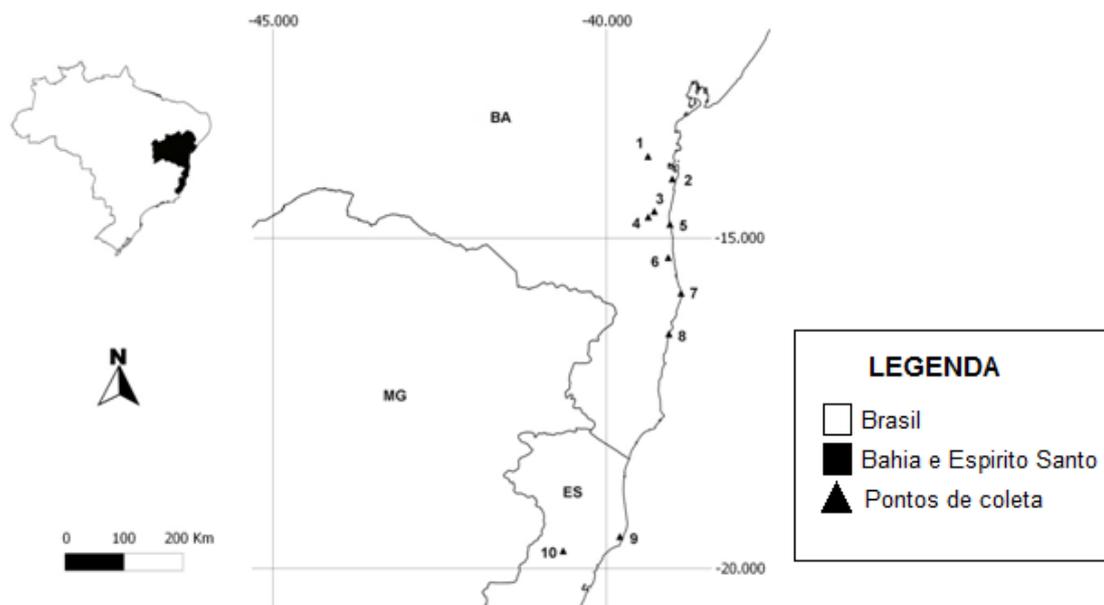


Figura 1. Mapa das localidades onde foram realizadas as coletas. Os triângulos representam os pontos de coleta

Tabela 1. Locais de coletas com as respectivas coordenadas geográficas e as espécies coletadas em cada localidade.

Número	Localidade	Espécies coletadas	Coordenadas geográficas
1	Piraí do Norte-BA	<i>P. inversa</i>	13°45'S 39°22'W
2	Maraú-BA	<i>P. villosa</i>	14°05'S 39°00'W
3	Uruçuca-BA	<i>P. villosa</i> , <i>P. bactronica</i>	14°35'S 39°17'W
4	Itajuípe-BA	<i>P. villosa</i>	14°40'S 39°22'W
5	Ilhéus-BA	<i>P. villosa</i> , <i>P. bactronica</i> , <i>P. inversa</i>	14°47'S 39°13'W
6	Una-BA	<i>P. villosa</i>	15°17'S 39°04'W
7	Barrolândia-BA	<i>P. villosa</i> , <i>P. bactronica</i>	15°50'S 38°53'W
8	Porto Seguro-BA	<i>P. villosa</i> , <i>P. inversa</i>	16°26'S 39°03'W
9	Itapinas-ES	<i>P. villosa</i>	19°31'S 40°48'W
10	São Roque-ES	<i>P. bactronica</i>	19°44'S 40°39'W

4.2 Extração de DNA

O DNA total foi obtido a partir das pernas e tórax de espécimes conservados em etanol absoluto. Para a extração de DNA utilizou-se o kit DNeasy de extração de tecidos animais (Qiagen) seguindo o protocolo do fabricante. Para cada espécie por localidade foram extraídos três indivíduos, porém, em algumas localidades foi coletado apenas um indivíduo.

4.3 Amplificação dos genes nucleares e mitocondriais via PCR

A amplificação foi feita através da técnica da PCR (“Polymerase Chain Reaction”), utilizando dois termocicladores modelo Mastercycler da Eppendorf e Verti 96 Well ThermalCycler da Applied Biosystems. Para as reações de PCR foram utilizados, água MiliQ ultrapura, tampão 5x Go Taq Flexi Buffer (Promega), dNTP (Promega), MgCl₂ 25mM (Promega), Go Taq DNA Polimerase 5 U/μL (Promega) e os “primers” na concentração de 20ng/ μL. Os “primers” utilizados neste estudo amplificam as regiões dos genes mitocondriais citocromo oxidase I (FOLMER et al. 1994) e 16S (COSTA 1998) e do espaçador interno transcrito 1 (ITS1) (PILGRIM et al. 2002) (Tabela 2). Em cada reação de PCR realizada, foi incluído um controle negativo para verificar possíveis contaminações no produto da reação.

Após o término da PCR, foi feita a verificação dos fragmentos de DNA amplificados através de eletroforese em gel de agarose 2%. A solução aplicada no gel era composta por 2 μL da reação de PCR, 2 μL de tampão de carregamento 5x Green Go taq flexiBuffer (Promega) e 2 μL do corante de DNA gel green (Biotium). Para a quantificação do tamanho das bandas e da concentração de DNA nos produtos de PCR, utilizou-se o marcador ΦX-174 DNA/*Bsu*RI (*Hae*III) (Fermentas Life Sciences), aplicado no mesmo gel com as amostras. Após aproximadamente 50 minutos de eletroforese, os géis foram colocados no transiluminador com luz UV (~300nm) (Nippon Genetics Europe) e fotografados utilizando câmera fotográfica digital portátil (Sony Cyber-shot) 16.1 Mega pixels. Após a análise visual das fotos dos géis, os produtos de PCR que apresentaram bandas de boa qualidade foram estocados em freezer a -20°C e posteriormente foram purificados e enviados para sequenciamento.

Tabela 2. Regiões mitocondriais e nucleares amplificadas para as análises filogenéticas com os respectivos "primers".

	Região	"Primer"	Sequência (5' → 3')	T _a (°C)	Autor
Mitocondrial	COI	LCO-1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	52°	Folmer et al. (1994)
		HCO-2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA		
	16S	LR13943F	CACCTGTTTATCAAAAAACAT	47°	Costa (1998)
		16SR	CGTCGATTTGAACTCAAATC		
Nuclear	ITS1	F 1_18S_RSTM	GATTACGTCCCTGCCCTTTG	54°	Pilgrim et al. (2002)
		R1_5.85S_RSTM	CGATGATCAAGTGTCTGCA		

4.4 Purificação dos produtos de PCR

A purificação dos fragmentos amplificados foi feita através do tratamento com as enzimas exonuclease I de *Escherichia coli* (EXO1) e fosfatase alcalina de camarão (SAP). Essas enzimas atuam na eliminação de resíduos de "primers" e desoxirribonucleotídeos (dNTPS) que podem interferir no sequenciamento dos fragmentos de DNA amplificados. Para a purificação, foram utilizados 2,7 µL da mistura enzimática - 0,9 µL de EXO1, e 1,8 µL de SAP – preparada minutos antes da purificação, e 15,0 µL do produto de PCR. Os tubos contendo as reações foram levados ao termociclador e incubados a 37 °C por 30 minutos e em seguida a 80°C por 15 minutos. Os produtos de PCR purificados foram estocados a -20°C. Após cada purificação, foram corridos géis de agarose 2% contendo 2 µL da purificação, 2 µL de tampão de carregamento 5x Green Go taq flexiBuffer (Promega) e 2 µL do corante de DNA gel Green (Biotium), para verificar a eficiência da reação de purificação.

4.5 Sequenciamentos dos fragmentos de DNA amplificados

O DNA amplificado por PCR foi sequenciado em sequenciador automático (Mega BACE 1000) no Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo com os mesmos "primers" utilizados na reação de amplificação.

4.6 Análises das sequências dos fragmentos

As sequências foram analisadas e editadas utilizando o programa Bioedit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999), versão 7.0.9.0. Para esta análise, foi feita a sobreposição entre cada sequência “forward” e o respectivo complemento reverso da sequência “reverse”. A partir dos eletroferogramas de ambas as sequências, fez-se a correção de possíveis ambiguidades e gerou-se uma sequência consenso para cada um dos espécimes que foi salva no formato FASTA compatível para o reconhecimento da ferramenta Clustal W Multiple Alignment (THOMPSON et al., 1994) foi realizado o alinhamento de todas as sequências consenso dos espécimes estudados.

4.7 Alinhamento das sequências e análises filogenéticas

Após o alinhamento automático das sequências consenso realizado utilizando a ferramenta Clustal W Multiple Alignment (THOMPSON et al., 1994) com as configurações padrão, as sequências foram manualmente ajustadas. Foram utilizados quatro métodos para reconstrução filogenética: Neighbor-Joining (NJ), Máxima Parcimônia (MP), Máxima Verossimilhança (ML) e análise Bayesiana. As análises filogenéticas foram realizadas utilizando os programas MEGA 5.2 (TAMURA et al., 2008) e MrBAYES 3.1 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003). Foram geradas matrizes de distâncias genéticas entre as sequências e calculada a composição nucleotídica para cada um dos genes estudados utilizando o programa MEGA 5.2 (TAMURA et al., 2008). Para a construção das árvores filogenéticas, o arquivo com o alinhamento foi importado para o Mega 5.2 e convertido em formato compatível (MEG). As árvores filogenéticas foram reconstruídas pelos métodos de Neighbor-Joining (NJ), Máxima Parcimônia (MP), Máxima Verossimilhança (ML) com distância de Kimura-2-parâmetros e “bootstrap” de 1000 replicações. A análise Bayesiana foi realizada utilizando o programa MrBAYES 3.1 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003) usando a cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) com quatro cadeias simultâneas para 10 milhões de gerações, sendo as árvores salvas a cada 1.000 gerações. O “burn-in” foi realizado a cada 250 gerações e o suporte dos ramos foi estimado através de probabilidade posterior. A espécie *Pachycondyla apicalis* foi utilizada como grupo externo as espécies do estudo,

Pachycondyla villosa, *Pachycondyla inversa* e *Pachycondyla bactronica* do complexo de espécies *Pachycondyla foetida*.

As sequências obtidas neste estudo foram comparadas com sequências disponíveis no GenBank ® (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) através da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool - ALTSCHUL et al. 1997) para confirmação da identidade taxonômica. A tradução das sequências foi realizada no GenBank para verificar a possível presença de códons de parada.

5. RESULTADOS

5.1 Coleta de material biológico

Foi coletado um total de 32 amostras de ninhos das três espécies do complexo *foetida*, dos quais 22 ninhos amostrados eram da espécie *P. villosa*, seis dos ninhos amostrados eram de *P. inversa* e quatro eram de *P. bactronica*. Foi ainda coletado um espécime de *P. apicalis* que foi utilizado como grupo externo para as análises filogenéticas. Dentre os 10 pontos de coleta, oito estão localizados no Estado da Bahia e dois no Estado do Espírito Santo. As espécies de *Pachycondyla* coletas em cada localidade, bem como a quantidade de ninhos amostrados e o número total de indivíduos estão apresentados na Tabela 3. O maior número de espécies e de ninhos amostrados foi na cidade de Ilhéus (BA).

Tabela 3. Espécies, número de ninhos e número de exemplares coletados por localidade.

Amostragem de espécies do complexo <i>P. foetida</i> em áreas da Bahia e do Espírito Santo			
Espécie	Localidade	Nº ninhos	Nº exemplares
<i>P. villosa</i>	Ilhéus - BA	5	148
<i>P. inversa</i>	Ilhéus - BA	3	18
<i>P. villosa</i>	Belmonte- BA	5	21
<i>P. bactronica</i>	Belmonte- BA	2	36
<i>P. villosa</i>	Una- BA	3	24
<i>P. villosa</i>	Uruçuca- BA	3	6
<i>P. inversa</i>	Uruçuca- BA	1	1
<i>P. villosa</i>	Maraú- BA	1	1
<i>P. villosa</i>	Itajuípe- BA	1	44
<i>P. villosa</i>	Porto Seguro- BA	3	3
<i>P. inversa</i>	Porto Seguro- BA	1	1
<i>P. inversa</i>	Pirai do Norte- BA	1	1
<i>P. bactronica</i>	São Roque- ES	1	1
<i>P. villosa</i>	Itapinas- ES	1	1
	TOTAL	31	306

5.2 Extração de DNA e amplificação dos fragmentos das regiões COI, 16S e ITS

Foram selecionados 32 indivíduos do total de 308 para as análises. O protocolo utilizado permitiu obter DNA de alta qualidade com uma concentração média de 50 ng/ μ L. A partir do DNA total extraído foram amplificados com eficiência os fragmentos dos genes mitocondriais COI e 16S e da região do espaçador transcrito interno 1 (ITS1) para três espécies de estudo do *P. villosa*, *P. inversa* e *P. bactronica* além da espécie *Pachycondyla apicalis*, utilizada como grupo externo.

O total de sequências consenso obtido para cada uma das três espécies em cada região sequenciada está apresentado na Tabela 4.

Tabela 4. Número de indivíduos sequenciados por espécie para as regiões utilizadas no estudo.

Número de sequências obtidas por região			
Região	Espécie	Nº de sequências	Nº Total para região
COI	<i>P. villosa</i>	22	33
	<i>P. inversa</i>	6	
	<i>P. bactronica</i>	4	
	<i>P. apicalis</i>	1	
16S	<i>P. villosa</i>	18	28
	<i>P. inversa</i>	6	
	<i>P. bactronica</i>	3	
	<i>P. apicalis</i>	1	
ITS1	<i>P. villosa</i>	19	25
	<i>P. inversa</i>	2	
	<i>P. bactronica</i>	3	
	<i>P. apicalis</i>	1	
REGIÕES CONCATENADAS	<i>P. villosa</i>	15	20
	<i>P. inversa</i>	2	
	<i>P. bactronica</i>	2	
	<i>P. apicalis</i>	1	
	TOTAL		106

5.3 Sequenciamento e alinhamento

O sequenciamento do gene mitocondrial COI resultou em 33 sequências consenso, das quais 22 para a espécie *P. villosa*, seis para a espécie *P. inversa*, quatro para a espécie *P. bactronica* e uma sequência do grupo externo *P. apicalis*. O alinhamento das sequências para o gene COI gerou uma matriz de 610 caracteres com 432 sítios conservados, 178 sítios variáveis e 101 sítios informativos para parcimônia. A matriz de distância gerada com as sequências obtidas para o gene COI apresentou um valor máximo de 16,7% de divergência entre as sequências dos espécimes *P. villosa* 3 da localidade de Uruçuca (BA) e *P. bactronica* 6 da localidade de Belmonte (BA). A composição nucleotídica das sequências das três espécies do complexo *foetida* para o gene COI apresentou um alto desvio de 72,3% de A+T e 27,7% de C+G.

Para o gene mitocondrial 16S, foi obtido um total de 28 sequências consenso, sendo 18 para a espécie *P. villosa*, seis para a espécie *P. inversa*, três para a espécie *P. bactronica* e uma para o grupo externo *P. apicalis*. O alinhamento das sequências para o gene 16S gerou uma matriz de 466 caracteres com 384 sítios conservados, 82 sítios variáveis e 37 sítios informativos para parcimônia. A matriz de distância gerada com as sequências obtidas para o gene 16S apresentou um valor máximo de 7,0% de divergência entre as sequências dos espécimes *P. inversa* da localidade de Ilhéus (BA) e *P. bactronica* da localidade de São Roque (ES). A composição nucleotídica das sequências para o gene mitocondrial 16S também apresentou um alto desvio de 80,8% de A+T e 19,2% de C+G.

O total de sequências consenso gerado para a região do espaçador interno transcrito 1 (ITS1) foi de 25, sendo 19 sequências para a espécie *P. villosa*, duas sequências para a espécie *P. inversa*, três sequências para *P. bactronica* e uma para o grupo externo *P. apicalis*. O alinhamento das sequências para a região do ITS1 gerou uma matriz de 824 caracteres com 743 sítios conservados, 68 sítios variáveis e 27 sítios informativos para parcimônia. A matriz de distância gerada com as sequências obtidas para a região do espaçador ITS1 apresentou um valor máximo de 2,5% de divergência entre as sequências dos espécimes *P. villosa* 3 e *P. bactronica* 7.2, ambos da localidade de Belmonte (BA). A composição nucleotídica das sequências para

o espaçador interno transcrito 1 (ITS1) apresentou um baixo desvio de 42% de A+T e 58% de C+G.

Para análise concatenada das sequências foi alinhado um total de 20 sequências, das quais 15 pertencem à espécie *P. villosa*, duas à espécie *P. inversa*, duas à espécie *P. bactronica* e uma corresponde ao grupo externo *P. apicalis*. A análise concatenada das espécies do complexo *foetida* foi realizada a partir do agrupamento das sequências de um fragmento do gene mitocondrial da subunidade I da citocromo oxidase (COI), de um fragmento do gene de RNA ribossomal 16S e de um fragmento da região do espaçador interno transcrito 1 (ITS1). Foi gerada uma matriz concatenada composta por 1.902 caracteres com 1.569 sítios conservados, 316 sítios variáveis e 162 informativos para parcimônia. A matriz de distância gerada com as sequências concatenadas apresentou um valor máximo de 7,5% de divergência entre as sequências dos espécimes *P. villosa* 3 da localidade de Uruçuca (BA) e *P. inversa* 6 da localidade de Ilhéus (BA). A composição nucleotídica das sequências das três espécies do complexo *foetida* para os dados concatenados apresentou um alto desvio de 61,6% de A+T e 38,4% de C+G.

5.4 Análise filogenética do gene mitocondrial COI

A matriz COI apresentou 178 sítios variáveis, o que correspondeu a 29,18% dos caracteres. Do total de sítios variáveis, 101 foram informativos para a análise de Máxima Parcimônia. Esta análise resultou em duas árvores mais parcimoniosas com 240 passos.

A árvore de consenso estrito gerada através do método de Máxima Parcimônia está apresentada na Figura 2. Nesta análise, foram observados três cladogramas principais com ramos com alto suporte estatístico, com valores de “bootstrap” variando de 99% a 100%. As populações das três espécies formaram três grupos monofiléticos, visto que todos os indivíduos de *P. villosa* agruparam-se apenas no clado I, todos os indivíduos de *P. inversa* agruparam-se no clado II e todos os indivíduos de *P. bactronica* agruparam-se no clado III. O clado I apresentou três agrupamentos revelando variação genética dentro do grupo *P. villosa*. Esses grupos relacionaram os espécimes de Itapinas (ES) com Una 2 (BA) com valor de “bootstrap” de 29%, Itajuípe 3 com Porto Seguro 3 (BA) com valor de “bootstrap” de 76% e os indivíduos Barro 5 e Barro 2 da

mesma localidade, Belmonte (BA), com valor de “bootstrap” de 75%. O clado II apresentou um grupo que reuniu um espécime de *P. bactronica* de Barrolandia (BA) com outro espécime de *P. bactronica* da mesma localidade com valor de “bootstrap” de 48%. O clado III apresentou dois grupos, o primeiro grupo relacionou dois espécimes de *P. inversa* coletados em Ilhéus (BA) “bootstrap” de 78% e o segundo grupo relacionou um espécime de *P. inversa* coletado em Ilhéus (BA) com um espécime de *P. inversa* coletado em Porto Seguro (BA) “bootstrap” de 42%. As distâncias genéticas entre os espécimes geradas a partir da comparação das sequências para esse gene estão representadas na matriz de distâncias para o gene COI no Anexo 1.

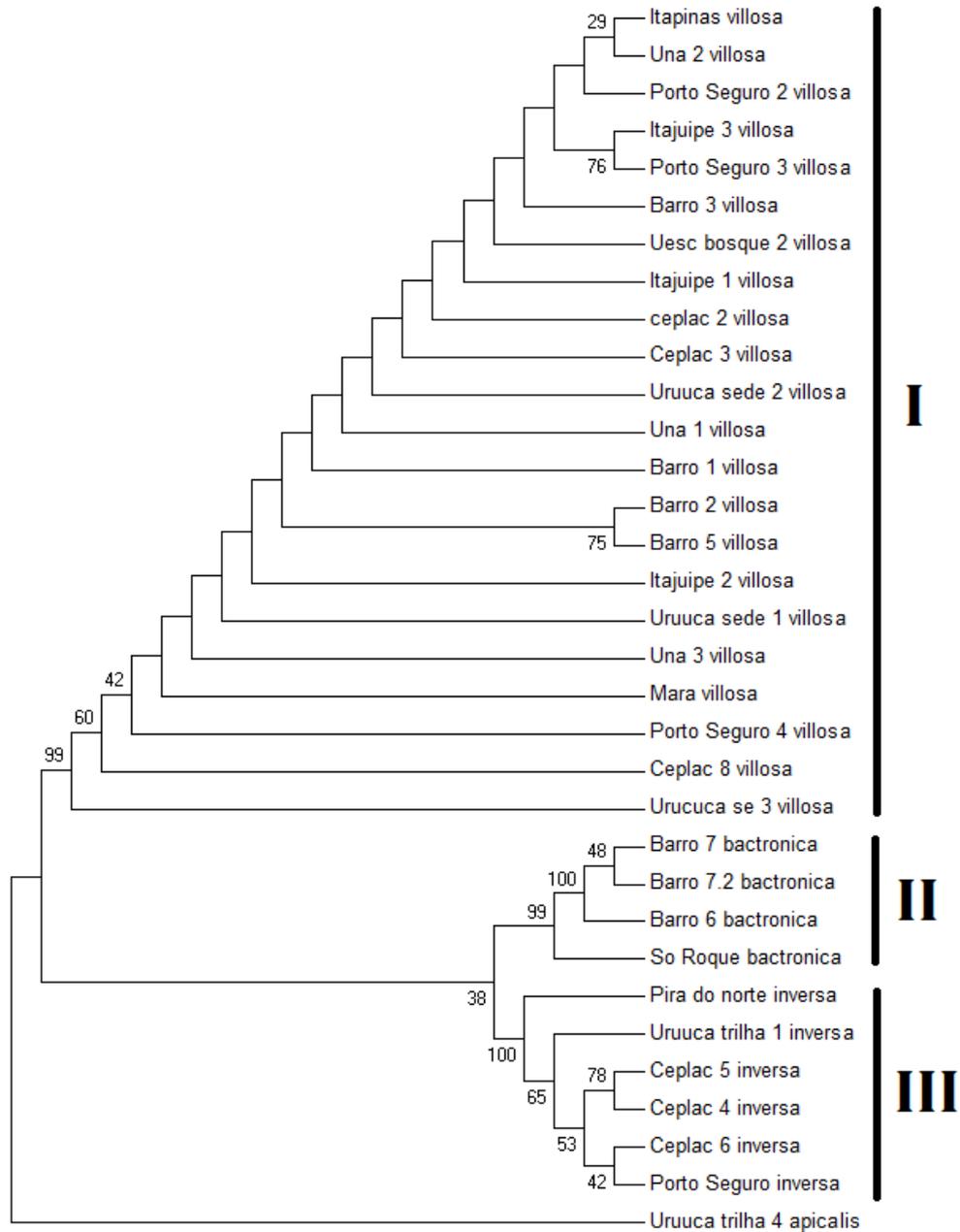


Figura 2. Uma das duas árvores mais parcimoniosas pela análise de Máxima Parcimônia para o gene COI. Os valores de “bootstrap” para 1.000 replicações foram apresentados junto aos nós.

A árvore gerada através do método de Máxima Verossimilhança está apresentada na Figura 3. Nesta análise, a árvore reconstruída para o gene COI apresentou resultado similar à árvore reconstruída pelo método da MP, apresentando as espécies de *Pachycondyla* em três principais clados com os ramos principais com alto suporte estatístico com valores de “bootstrap” acima de 99%, formando três grupos monofiléticos. No clado I ocorreu o agrupamento

das populações de *P. villosa*. O clado II revelou o agrupamento das populações de *P. inversa* e o clado III apresentou o agrupamento das populações de *P. bactronica*, dando suporte à formação de três grupos monofiléticos correspondentes às três espécies analisadas.

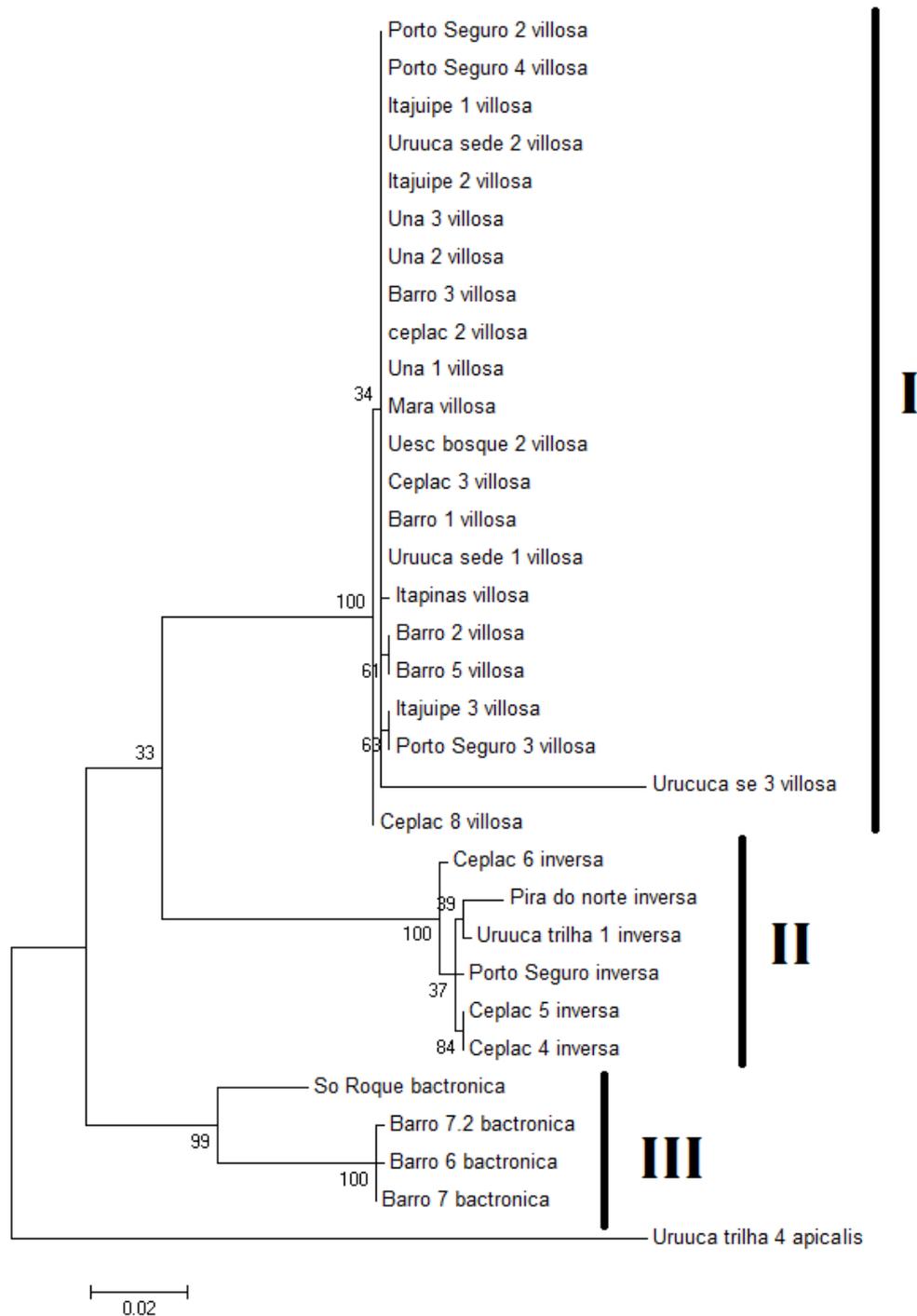


Figura 3. Árvore de reconstrução filogenética gerada pelo método da Máxima Verossimilhança para o gene COI, com “bootstrap” de 1.000 replicações.

A árvore gerada através do método de Neighbor-Joining está apresentada na Figura 4. Nesta análise, a árvore recuperada para o gene COI também apresentou topologia similar às árvores reconstruídas com os métodos MP e MV, com as espécies de *Pachycondyla* agrupadas em três principais clados e com os principais ramos com alto suporte estatístico com valores de “bootstrap” acima de 100% formando três grupos monofiléticos. As populações de *P. villosa* agruparam-se apenas no clado I. O clado II revelou o agrupamento das populações da espécie *P. inversa*. Assim, como novamente observado o agrupamento das populações da espécie *P. bactronica* no clado III.

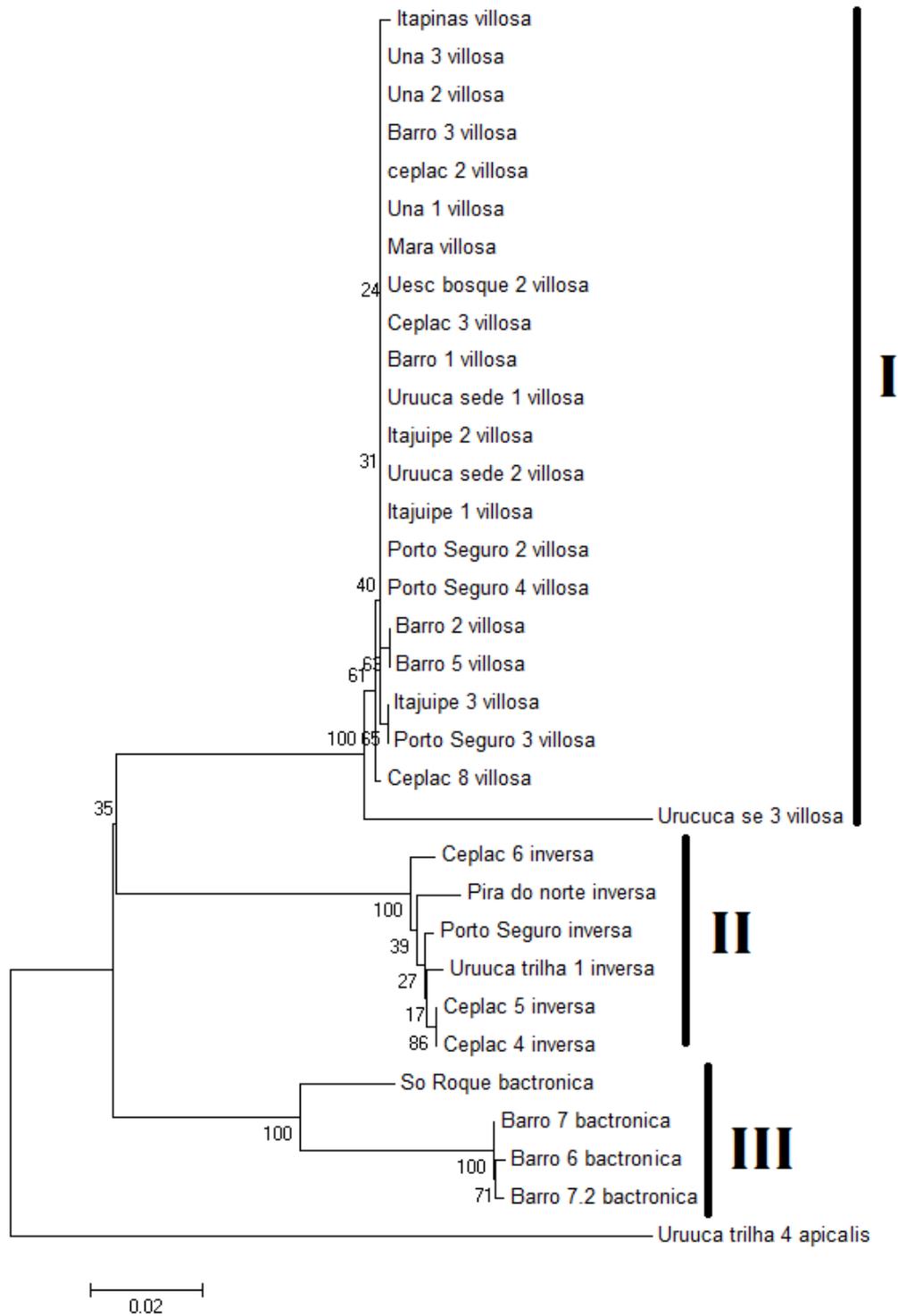


Figura 4. Reconstrução filogenética pelo método de Neighbor-Joining utilizando o modelo Kimura-2-parâmetros para o gene COI. Valores de “bootstrap” de 1.000 replicações estão apresentados junto aos nós.

A árvore gerada utilizando o método de análise Bayesiana está apresentada na Figura 5. Esta análise recuperou uma árvore com topologia similar às árvores geradas pelos métodos de MP, MV e NJ. Foram observados

três clados principais para as espécies de *Pachycondyla*. O clado I foi composto apenas por indivíduos da espécie *P. villosa* e apresentou ramo com valor de probabilidade posterior de 0,99. O clado II agrupou apenas as populações de *P. bactronica* com valor de probabilidade posterior de 1,0. O clado III agrupou apenas indivíduos da espécie *P. bactronica* com valor de probabilidade posterior de 0,97.

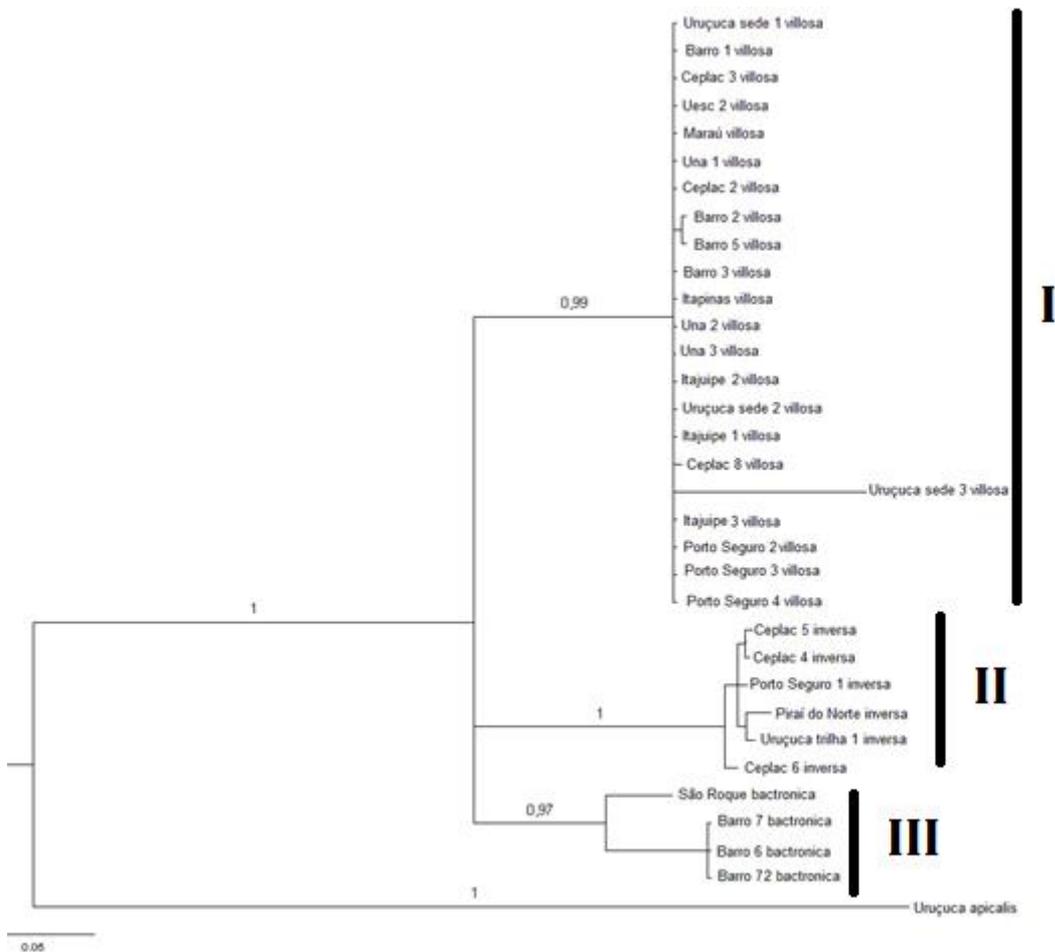


Figura 5. Árvore de reconstrução filogenética para o gene COI gerada através do método de análise Bayesiana, utilizando cadeia de Markov (mcmc) com 10 milhões de gerações. Valores de probabilidade posterior (PP) são indicados nos nós.

5.5 Análise filogenética do gene mitocondrial 16S

A matriz com as sequências de um fragmento do gene 16S apresentou 82 sítios variáveis o que correspondeu a 17,59% dos caracteres. Dos sítios variáveis, um total de 37 foi informativo para a análise de Máxima Parcimônia. Esta análise resultou em 10 árvores mais parcimoniosas com 103 passos.

A árvore de consenso estrito gerada através do método de Máxima Parcimônia está apresentada na Figura 6. Nesta análise, foram observados três cladogramas principais com ramos com valores de “bootstrap” acima de 76%. Para essa região gênica, assim como para o gene COI analisado anteriormente, as populações de *P. villosa* formaram um grupo monofilético, com todos os espécimes agrupados no clado I. O clado I apresentou dois grupos revelando variação genética entre as populações de *P. villosa*. Estes grupos reuniram os espécimes de Itapinas (ES) com Porto Seguro 4 (BA) com valor de “bootstrap” de 7% e Uruçuca (BA) 1 com Maraú (BA) com valor de “bootstrap” de 21%. O clado II agrupou as populações de *P. bactronica* de Barrolândia (BA) e de São Roque (ES) e apresentou um grupo reunindo os dois espécimes de *P. bactronica* da mesma localidade, Barrolândia (BA), com valor de “bootstrap” de 95%. O clado III agrupou todas as populações de *P. inversa*, as quais formaram um grupo monofilético. A matriz de distância para o gene 16S está no Anexo 2.

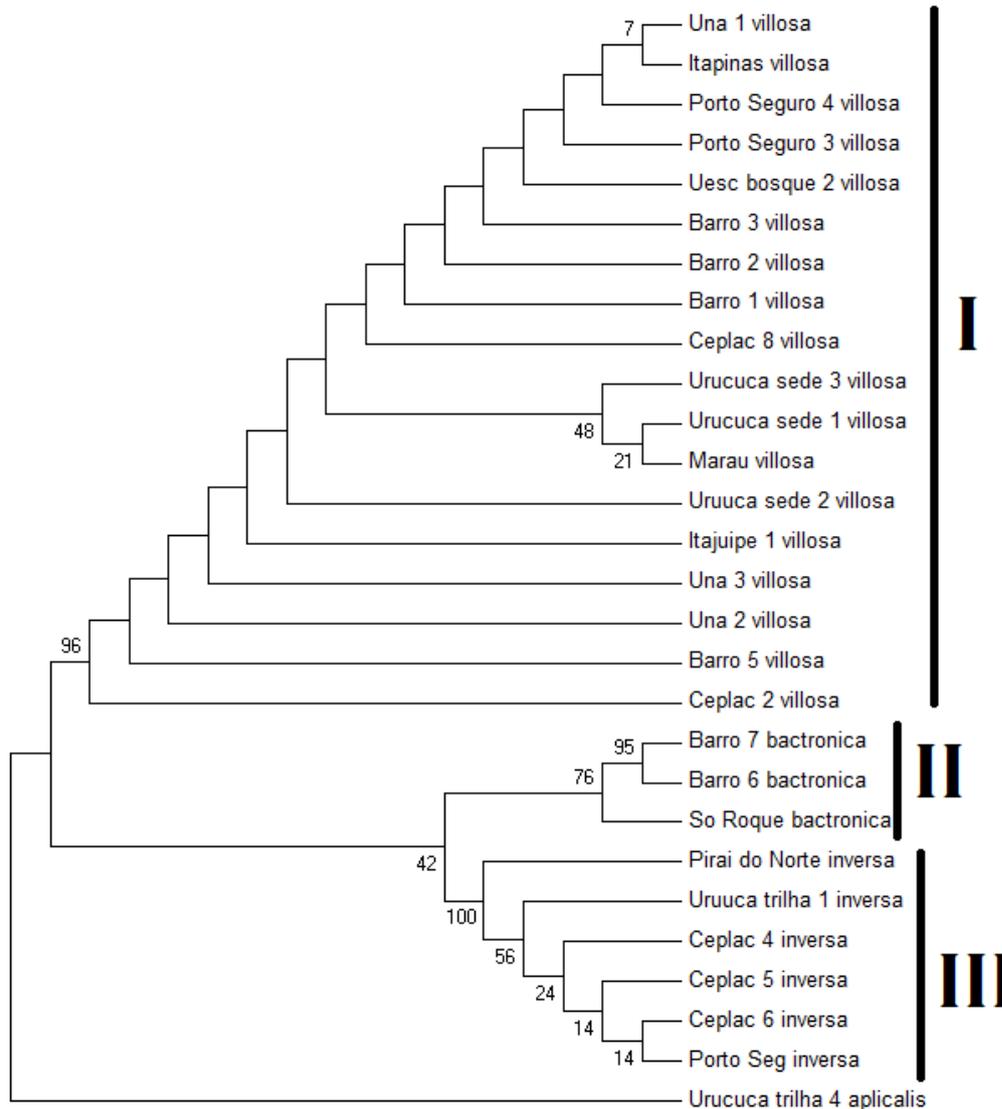


Figura 6. Uma das 10 árvores mais parcimoniosas pela análise de Máxima Parcimônia para o gene 16S. Com valores de “bootstrap” para 1.000 replicações apresentados junto aos nós.

A árvore gerada através do método de Máxima Verossimilhança está apresentada na Figura 7. Nesta análise, a árvore reconstruída para o gene 16S apresentou topologia similar à árvore reconstruída com o método de MP, agrupando as espécies de *Pachycondyla* em três principais clados com os principais ramos apresentando suporte estatístico para valores de “bootstrap” acima de 78%, formando três grupos monofiléticos. As populações de *P. villosa* novamente agruparam-se no clado I. O clado II revelou o agrupamento das populações de *P. Bactronica* e no clado III foi verificado o agrupamento das populações de *P. inversa*.



Figura 7. Árvore de reconstrução filogenética gerada pelo método da Máxima Verossimilhança para o gene 16S, com “bootstrap” de 1.000 replicações.

A árvore gerada através do método de Neighbor-Joining está apresentada na Figura 8. Nesta análise, a árvore gerada a partir das sequências do gene 16S também apresentou topologia similar às árvores reconstruídas com os métodos de MP e MV, agrupando as espécies de *Pachycondyla* em três principais clados com principais ramos apresentando alto suporte estatístico com valores de “bootstrap” acima de 80%, formando três grupos monofiléticos. As populações de *P. villosa* agruparam-se no clado I, com suporte de 96%. O clado II revelou o agrupamento entre três indivíduos da espécie *P. bactronica*, os mesmos que foram agrupados no clado II para as

árvores de MP e MV apresentadas anteriormente, com suporte de 80%. O clado III mostra o agrupamento de populações de *P. bactronica* com suporte de 99%.

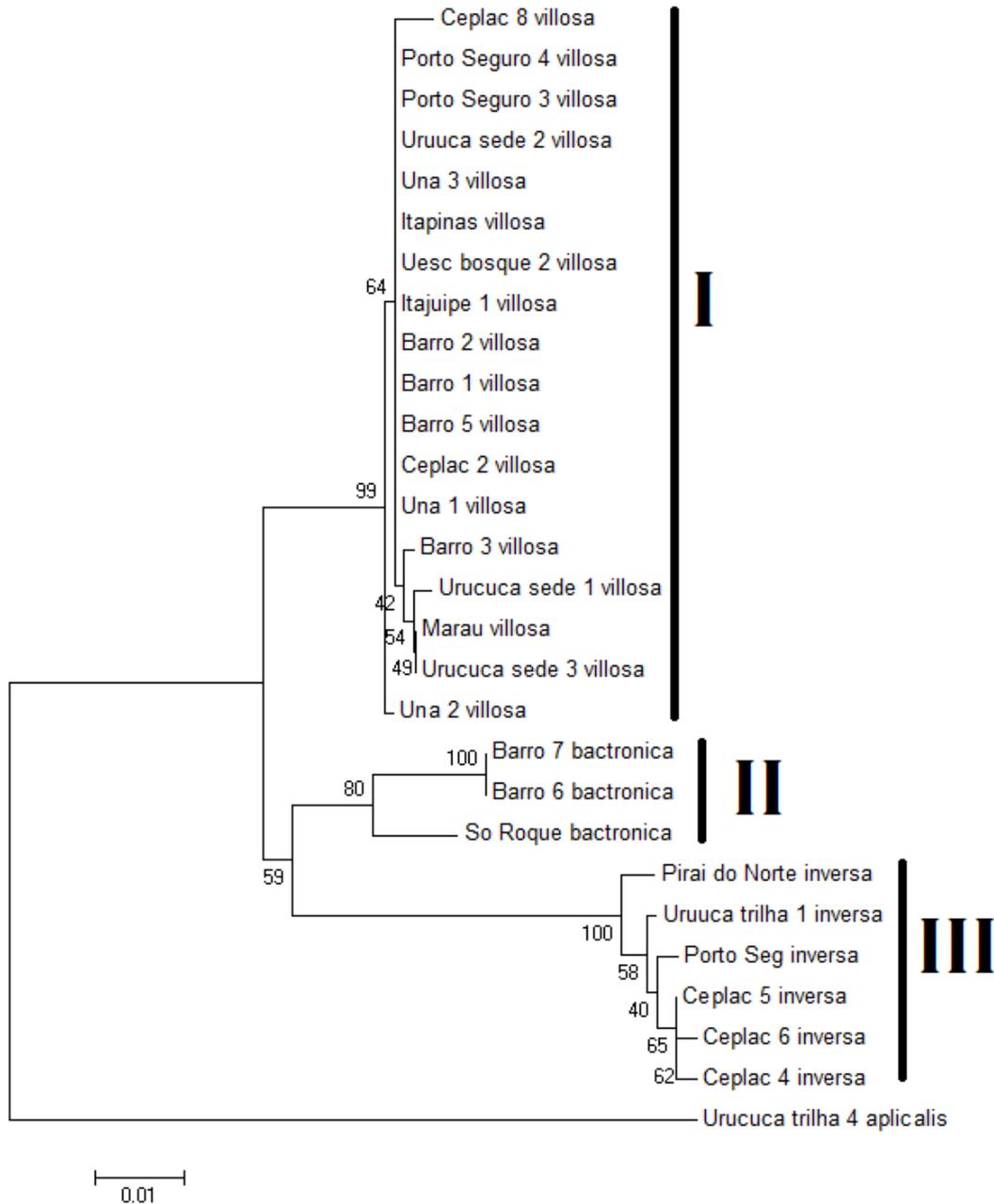


Figura 8. Árvore de reconstrução filogenética pelo método de Neighbor-Joining utilizando o modelo Kimura-2-parâmetros para o gene 16S. Valores de “bootstrap” de 1.000 replicações estão apresentados junto aos nós

A árvore gerada utilizando o método de análise Bayesiana está apresentada na Figura 9. Esta análise filogenética recuperou uma árvore com topologia similar às árvores geradas pelos métodos de MP, MV e NJ, agrupando as espécies de *Pachycondyla* em três clados. O clado I foi composto apenas por populações de *P. villosa* com valor de probabilidade posterior de 0,53. O clado II agrupou apenas de populações de *P. bactronica* com valor de probabilidade posterior de 0,92. O clado III agrupou as populações de *P. bactronica* com valor de probabilidade posterior de 1,0.

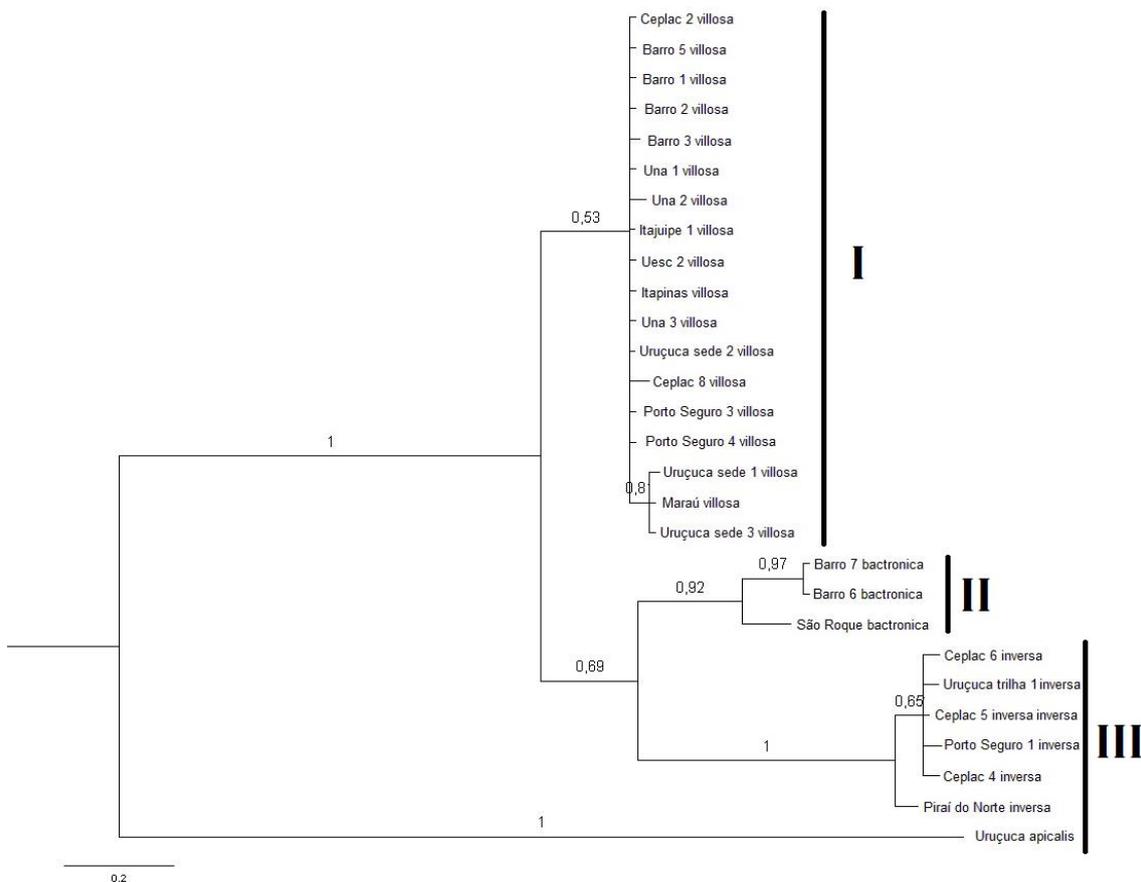


Figura 9. Árvore de reconstrução filogenética para o gene 16S gerada através do método de análise Bayesiana, utilizando cadeia de Markov (mcmc) com 10 milhões de gerações. Valores de probabilidade posterior (PP) são indicados nos nós.

5.6 Análise filogenética do espaçador interno transcrito ITS1

A matriz com as sequências do ITS1 apresentou 68 sítios variáveis, o que correspondeu a 8,25% dos caracteres. Dos sítios variáveis, um total de 27 foi informativo para a análise de Máxima Parcimônia. Esta análise resultou em 10 árvores mais parcimoniosas com 63 passos.

A árvore de consenso estrito gerada através do método de Máxima Parcimônia está apresentada na Figura 10. Nesta análise, a árvore reconstruída para a região do espaçador interno transcrito 1 (ITS1) apresentou três cladogramas principais com valores de “bootstrap” acima de 90%. Todos os espécimes de *P. villosa* agruparam-se apenas no clado I, corroborando os resultados apresentados nas análises dos genes mitocondriais COI e 16S de que as populações *P. villosa* formaram um grupo monofilético. O clado I apresentou dois grupos revelando variação genética entre as populações de *P. villosa*. O primeiro grupo reuniu um espécime de *P. villosa* da localidade de Itajuípe (BA) e um espécime de *P. villosa* de Una (BA) e o segundo grupo agrupou um espécime de *P. villosa* de Una (BA) com um espécime coletado em Barrolândia (BA). O clado II formou um grupo monofilético com o agrupamento das populações de *P. inversa*. Este clado reuniu dois espécimes de *P. inversa* da localidade de Ilhéus (BA). O clado III revelou o agrupamento de três espécimes de *P. bactronica* da mesma localidade, Barrolândia (BA), formando um grupo monofilético. A matriz de distância para o espaçador ITS1 está apresentada no Anexo 3.

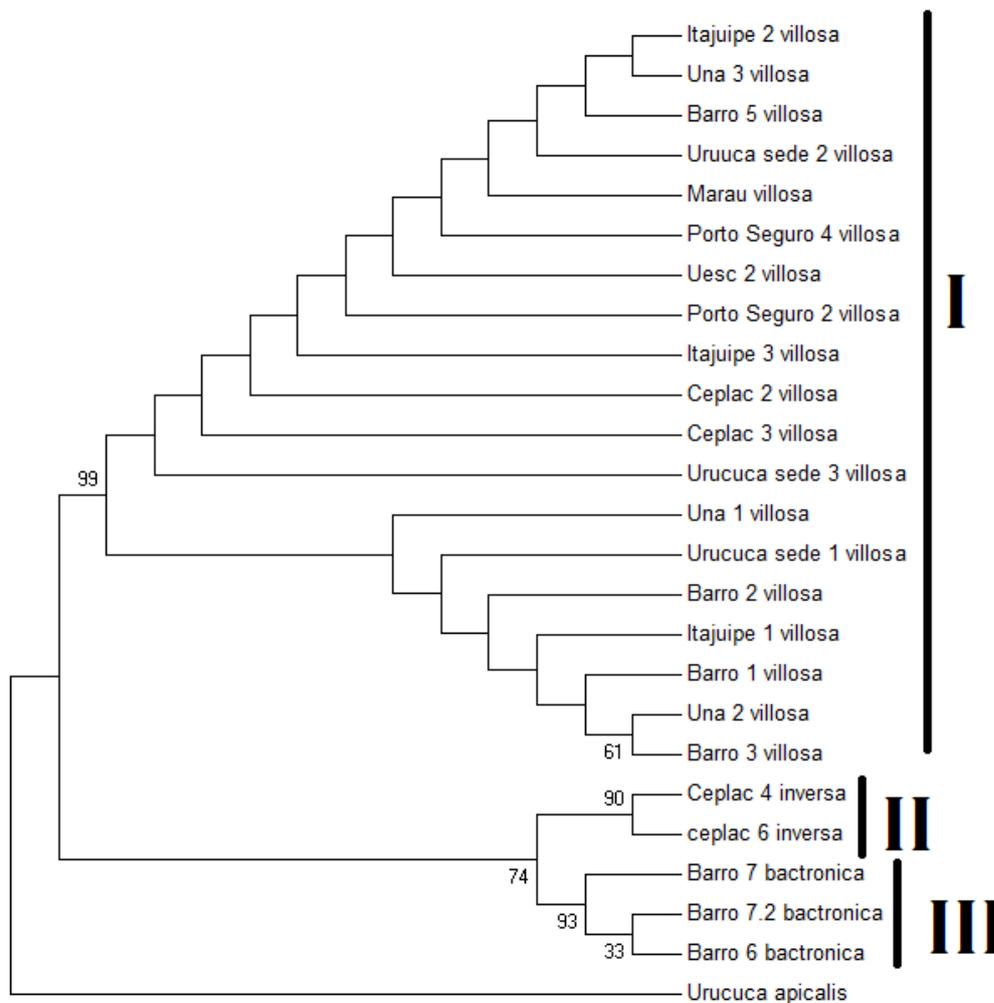


Figura 10. Uma das dez árvores mais parcimoniosas pela análise de Máxima Parcimônia para a região ITS1 com valores de “bootstrap” para 1.000 replicações apresentados junto aos nós.

A árvore gerada através do método de Máxima Verossimilhança está apresentada na Figura 11. Nesta análise, a árvore reconstruída para a região do ITS1 apresentou resultado similar à árvore reconstruída com o método anterior de Máxima Parcimônia, com as espécies de *Pachycondyla* agrupadas em três principais clados, com os ramos principais apresentando valores de “bootstrap” acima de 91%. As populações de *P. villosa* novamente formaram um grupo monofilético, com todos os espécimes de *P. villosa* agrupados apenas no clado I. Assim como as populações de *P. inversa* e *P. bactronica* formaram dois grupos monofiléticos agrupando-se no clado II e clado III, respectivamente.

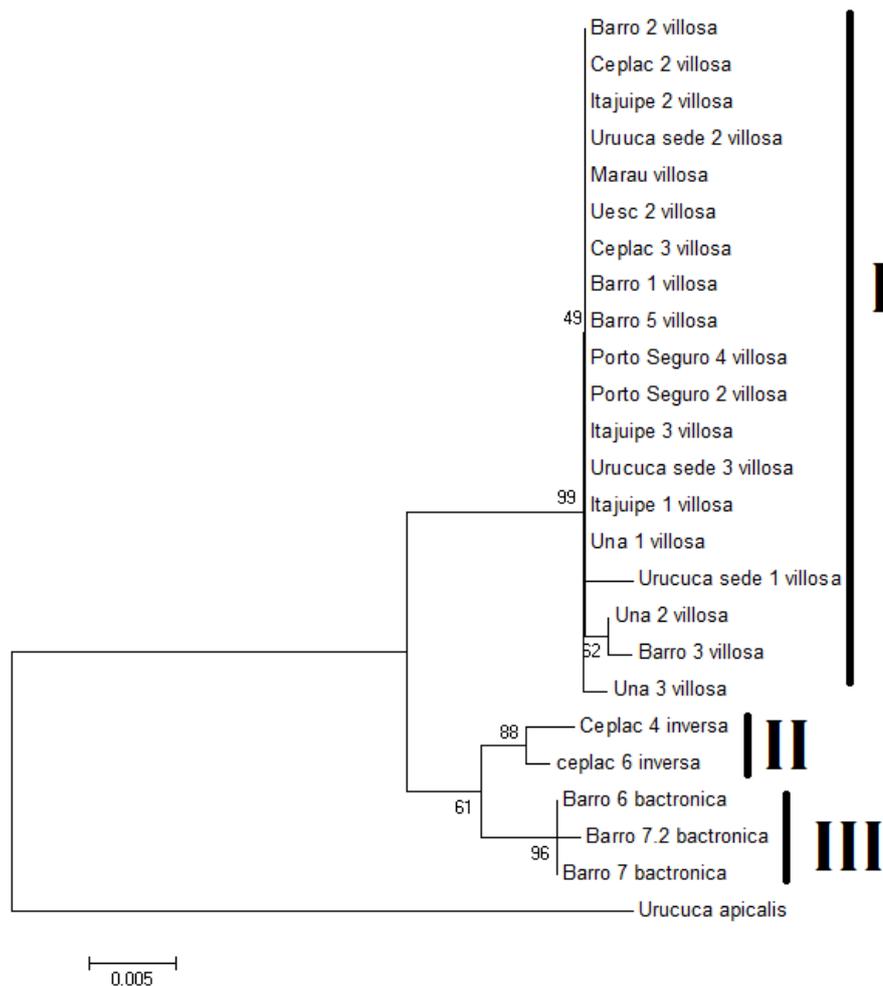


Figura 11. Árvore de reconstrução filogenética gerada pelo método da Máxima Verossimilhança para região ITS1, com valores de “bootstrap” para 1.000 replicações apresentados junto aos nós.

A árvore gerada através do método de Neighbor-Joining está apresentada na Figura 12. Nesta análise, a árvore reconstruída para o espaçador ITS1 também apresentou topologia similar às árvores reconstruídas usando os métodos de MP e MV, agrupando as espécies de *Pachycondyla* em três principais clados com ramos com valores de “bootstrap” acima de 90% para os ramos principais. As populações de *P. villosa* agruparam-se no clado I, as populações de *P. inversa* agruparam-se no clado II e as populações de *P. bactronica* agruparam-se no clado III, formando três grupos monofiléticos.

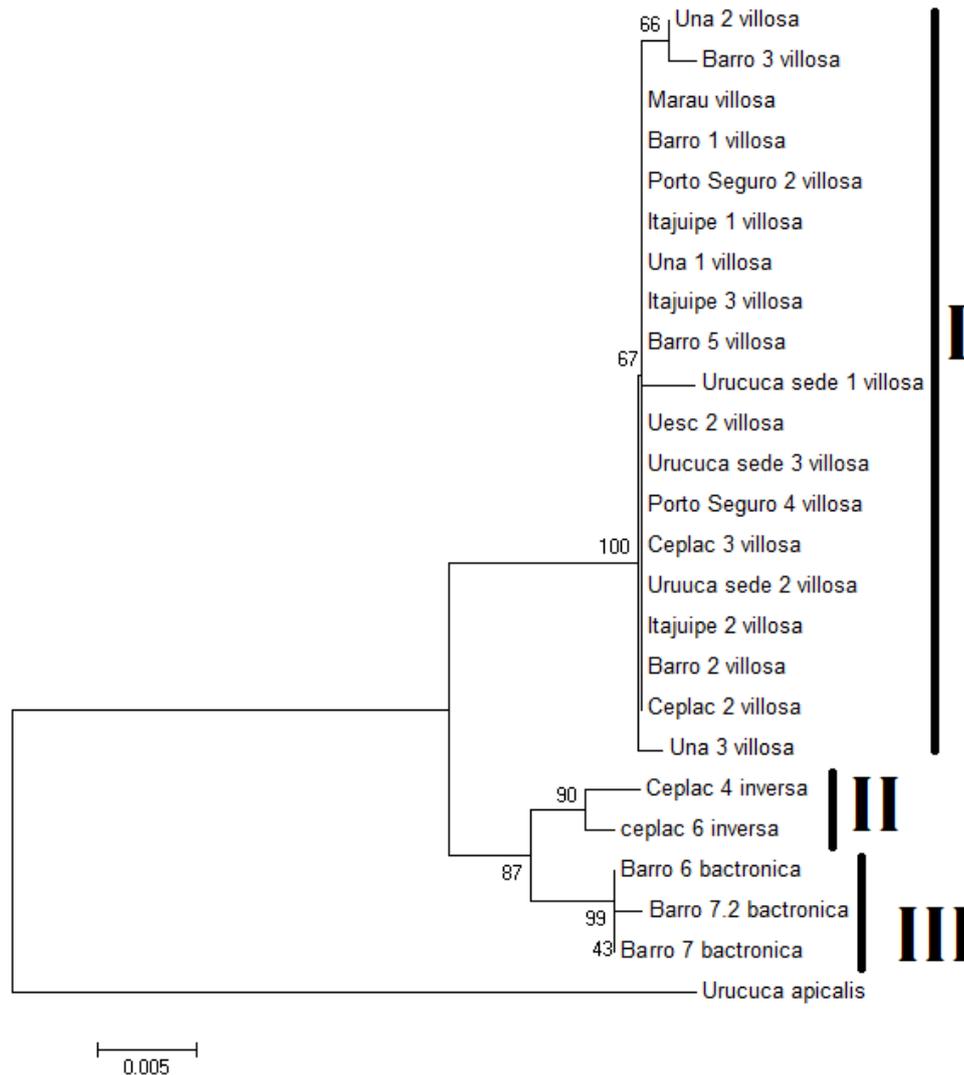


Figura 12. Árvore de reconstrução filogenética pelo método de Neighbor-Joining utilizando o modelo Kimura-2-parâmetros para região ITS1. Valores de “bootstrap” de 1.000 replicações estão apresentados junto aos nós.

A árvore gerada utilizando o método de análise Bayesiana para a região ITS1 está apresentada na Figura 13. Esta análise recuperou uma árvore com topologia similar as árvores geradas pelos métodos de MP, MV e NJ, agrupando as espécies de *Pachycondyla* em três clados. O clado I foi composto apenas por indivíduos da espécie *P. villosa* com valor de probabilidade posterior de 1,0. O clado II revelou o agrupamento apenas das populações da espécie *P. bactronica* com valor de probabilidade posterior de 1,0. O clado III revelou o agrupamento das populações da espécie *P. inversa* apresentando valor de probabilidade posterior de 0,98.

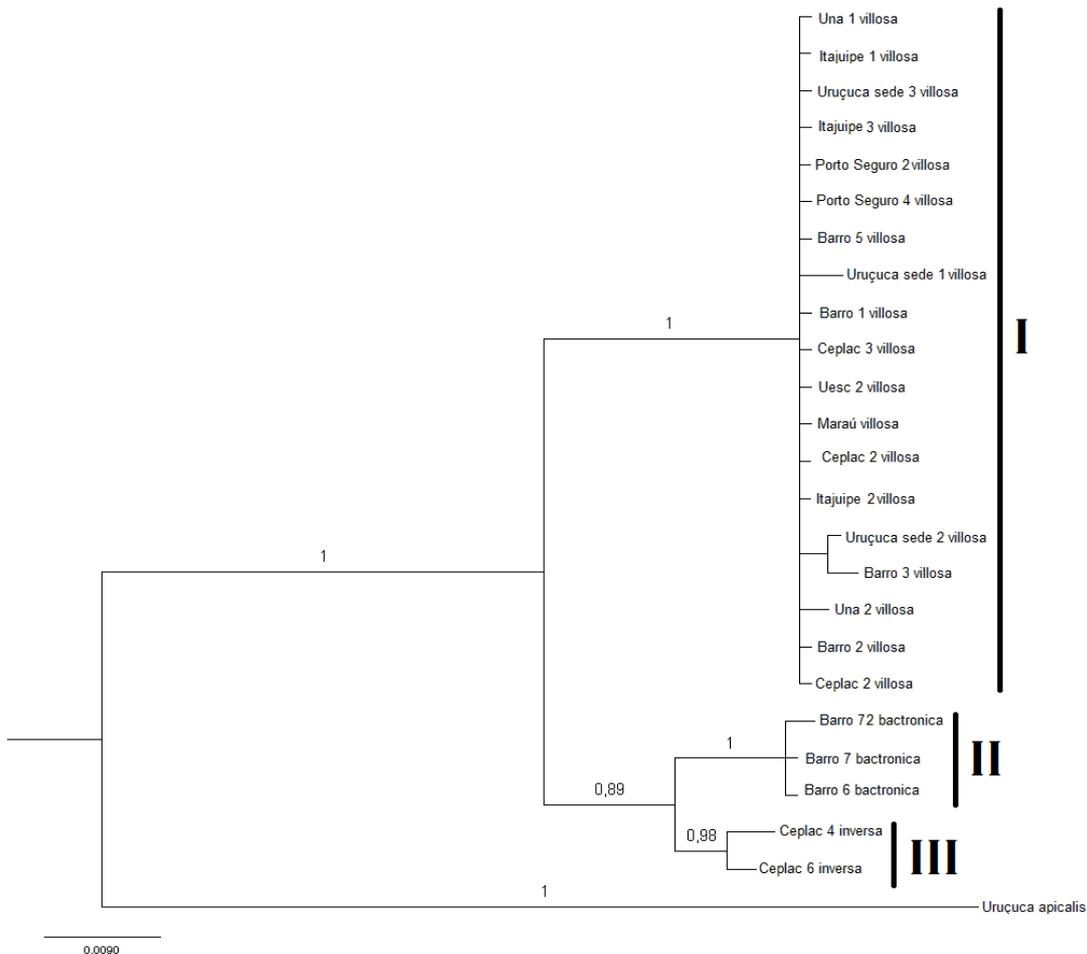


Figura13. Árvore de reconstrução filogenética para o gene ITS1 gerada através do método de análise Bayesiana, utilizando cadeia de Markov (mcmc) com 10 milhões de gerações. Valores de probabilidade posterior (PP) são indicados nos nós.

5.7 Análise filogenética dos dados concatenados

A matriz dos dados concatenados apresentou 316 sítios variáveis o que correspondeu a 16,61% dos caracteres. Dos sítios variáveis, um total de 162 foi informativo para a análise de Máxima Parcimônia. Esta análise resultou em oito árvores mais parcimoniosas com 368 passos.

A árvore de consenso estrito gerada através do método de Máxima Parcimônia está apresentada na Figura 14. Nesta análise, a árvore reconstruída para os dados concatenados por parcimônia agrupou as espécies de *Pachycondyla* em três principais clados com ramos com valores de “bootstrap” de 100%. As populações de *P. villosa* agruparam-se apenas no clado I. O clado I apresentou quatro grupos revelando variação genética dentro do grupo *P. villosa*. Os espécimes de Barrolândia 1 e Ceplac 2 foram reunidos

no primeiro grupo com valor de “bootstrap” de 6%, o segundo grupo reuniu os espécimes Barrolândia 5 e Barrolândia 2, com valor de “bootstrap” de 69%, o terceiro grupo reuniu os espécimes Una 2 e Barrolândia 3 com valor de “bootstrap” de 54% e o quarto grupo reuniu os espécimes Uruçuca 1 (BA) com Maraú (BA), com baixo valor de “bootstrap” de 33%. O clado II revelou o agrupamento de dois espécimes de *P. inversa* com “bootstrap” de 100%, ambos coletados em Ilhéus (BA). O clado III agrupou dois espécimes de *P. bactronica* ambos coletados em Barrolândia (BA) com “bootstrap” de 100%. A matriz de distância para o espaçador ITS1 está apresentada no Anexo 4.

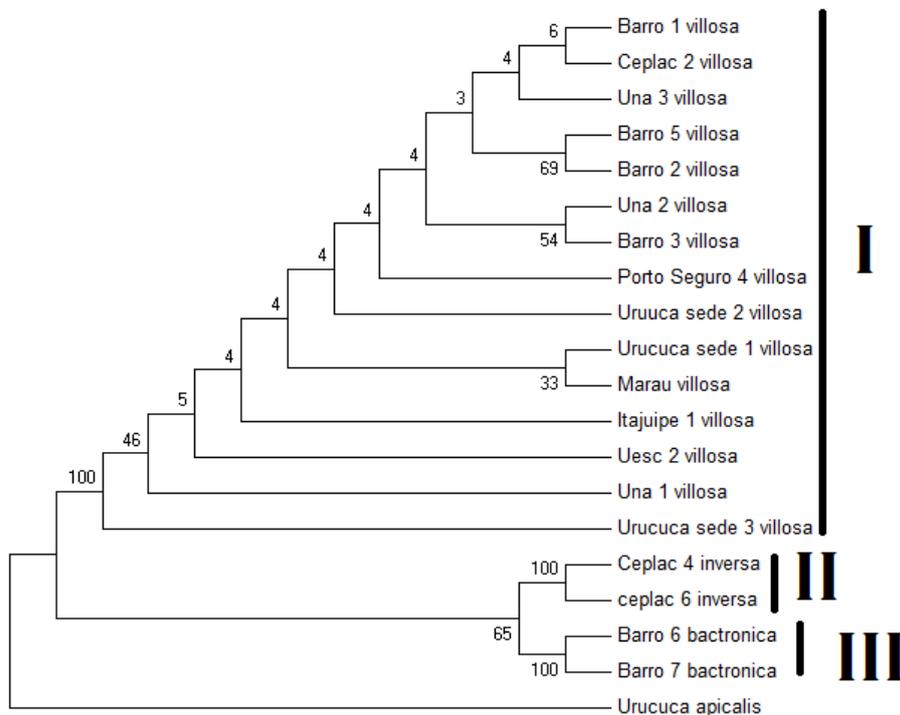


Figura 14. Uma das oito árvores mais parcimoniosa gerada através do método de Máxima Parcimônia para os dados concatenados. Com valores de “bootstrap” para 1.000 replicações apresentados junto aos nós.

A árvore gerada através do método de Máxima Verossimilhança está apresentada na Figura 15. Nesta análise, a árvore reconstruída com os dados concatenados apresentou resultado similar à árvore reconstruída com o método de MP, revelando o agrupamento das espécies de *Pachycondyla* em três principais clados com os ramos principais apresentando valores de “bootstrap” de 100%. As populações de *P. villosa* agruparam-se no clado I. O clado II reuniu dois espécimes de *P. inversa* da localidade de Ilhéus (BA). No clado III foram reunidos dois espécimes de *P. bactronica* ambos de Barrolândia

(BA). As populações das três espécies formaram três grupos monofiléticos também para a análise dos dados concatenados.

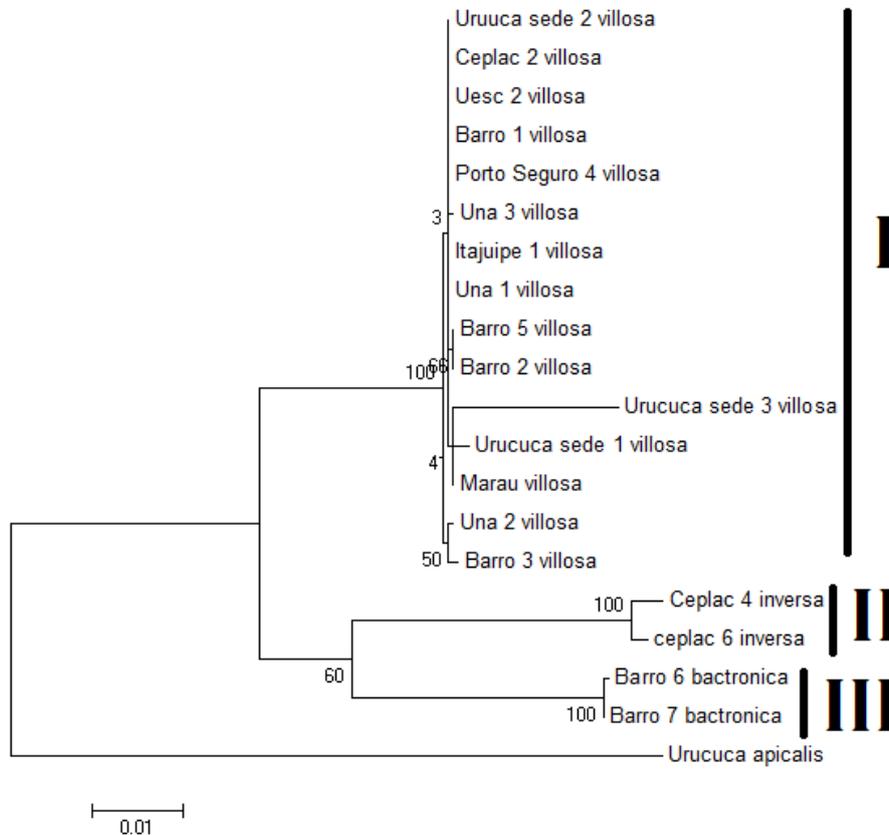


Figura 15. Árvore de reconstrução filogenética gerada pelo método da Máxima Verossimilhança para os dados concatenados, com valores de “bootstrap” para 1.000 replicações apresentados junto aos nós.

A árvore gerada através do método de Neighbor-Joining está apresentada na Figura 16. Nesta análise, a árvore reconstruída para os dados concatenados também apresentou topologia similar às árvores reconstruídas com MP e MV, agrupando as espécies de *Pachycondyla* em três principais clados com os principais ramos com valores de “bootstrap” acima de 61%. As populações de *P. villosa* agruparam-se apenas no clado I. O clado II revelou o agrupamento de dois espécimes de *P. inversa* e o clado III revelou o agrupamento de dois espécimes de *P. bactronica* com resultado semelhante ao resultado apresentado nas árvores de MP e MV para os as sequências concatenadas.

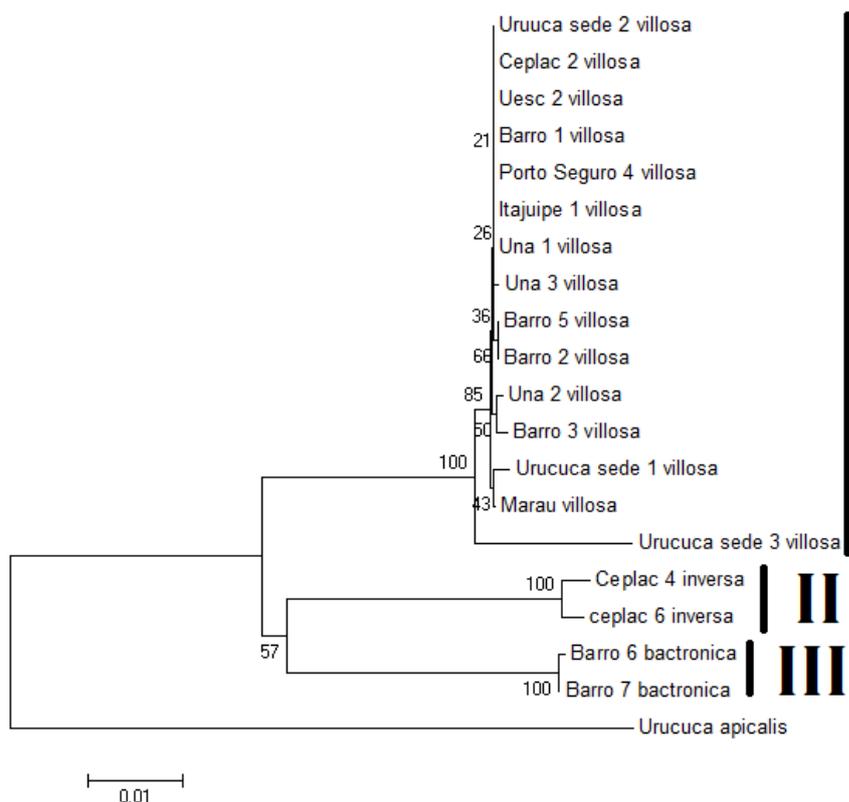


Figura 16. Árvore de reconstrução filogenética pelo método de Neighbor-Joining utilizando o modelo Kimura-2-parâmetros para os dados concatenados. Valores de “bootstrap” de 1.000 replicações estão apresentados junto aos nós.

A árvore gerada utilizando o método de análise Bayesiana para os dados concatenados está apresentada na Figura 17. Esta análise recuperou uma árvore com topologia similar as árvores geradas pelos métodos de MP, MV e NJ, agrupando as espécies de *Pachycondyla* em três clados. O clado I, foi composto apenas por espécimes de *P. villosa* com valor de probabilidade posterior de 1,0. O clado II revelou o agrupamento apenas das populações da espécie *P. bactronica* com valor de probabilidade posterior de 1,0. O clado III revelou o agrupamento das populações da espécie *P. inversa* apresentando valor de probabilidade posterior de 1,0.



Figura17. Árvore de reconstrução filogenética para Os dados concatenados gerada através do método de análise Bayesiana, utilizando cadeia de Markov (mcmc) com 10 milhões de gerações. Valores de probabilidade posterior (PP) estão indicados nos nós.

6. DISCUSSÃO

Esse é o primeiro estudo realizado para caracterizar as espécies *P. villosa*, *P. inversa* e *P. bactronica* do complexo *foetida* por meio do sequenciamento de DNA. A utilização dessas regiões bem como dos dados concatenados pode auxiliar na delimitação destas espécies.

Os altos desvios observados na composição nucleotídica das sequências dos genes COI e 16S indicando alto percentual de A+T corroboram os resultados indicados na literatura de maior composição nucleotídica de A+T para as regiões mitocondriais em insetos (SIMON et al., 1994; STEWART; BECKENBACH, 2006).

Os resultados das análises filogenéticas indicaram congruência para as três regiões sequenciadas bem como os dados concatenados. Além disso, as árvores apresentaram topologia similar para todos os quatro métodos, Máxima Parcimônia, Máxima Verossimilhança, Neighbor-Joining e Bayesiana, utilizados nas análises.

Para as três regiões analisadas COI, 16S, ITS1, bem como na análise dos dados concatenados, as espécies do complexo *foetida*, *P. villosa*, *P. inversa* e *P. bactronica* formaram três clados monofiléticos com altos valores de “bootstrap” e de probabilidade posterior. Em todas as árvores recuperadas, as populações de *P. inversa* e de *P. bactronica* apresentaram-se mais próximas entre si do que das populações de *P. villosa* revelando maior diferenciação genética de *P. villosa* em relação às outras duas espécies. Estes dados corroboram estudos anteriores para essas espécies e reafirmam a existência de três táxons distintos e simpátricos do complexo *foetida* no sul da Bahia.

Dos 306 de *Pachycondyla* do complexo *foetida* coletados para esse estudo, um total de 266 foi coletado na área onde se encontra a Comissão Executiva da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) localizada no município de Ilhéus (BA). Nesse local, essas três espécies do complexo *foetida* são encontradas em simpatria, tendo sido área de amostragem em diversos estudos envolvendo essas três espécies de formigas. No trabalho de Trindl et al. (2004), os autores coletaram 11 colônias de *Pachycondyla inversa* na CEPLAC a fim de desenvolverem um trabalho de caracterização de cinco locos microssatélites para esta espécie. Kolmer (2002) coletou 112 colônias de *Pachycondyla* do

complexo *foetida* na CEPLAC e realizou estudos comportamentais, morfológicos e estudo de eletroforese de aloenzimas. Os autores Lucas et al. (2002) coletaram nove colônias na CEPLAC, três de *P. villosa*, três de *P. inversa* e três de *P. bactronica* e realizaram trabalhos de morfometria, caracterização de hidrocarbonetos cuticulares e de eletroforese de isoenzimas. Mariano (2004) coletou 29 colônias das espécies *Pachycondyla villosa*, *Pachycondyla inversa*, *Pachycondyla bactronica* e *Pachycondyla unidentata* na CEPLAC a fim de avaliar a variação cariotípica dessas espécies. Os autores Fernandes et al. (2013) incluíram a área da CEPLAC nas coletas das espécies do complexo *foetida* para o desenvolvimento do trabalho taxonômico de descrição de duas novas espécies de *Pachycondyla* deste complexo.

No trabalho de Kolmer (2002), realizado antes mesmo que o status taxonômico dessas três espécies tivesse sido resolvido, o autor investigou populações simpátricas de *Pachycondyla* do complexo *foetida* coletadas em Ilhéus (BA) em aspectos da morfologia, comportamento e genética. Nesse estudo, o autor encontrou diferenças morfológicas entre essas populações que permitiram diferenciá-las em duas formas distintas. Porém, com a utilização das aloenzimas na caracterização dessas populações o autor obteve padrões de bandejamento para cinco locos aloenzimáticos que diferenciou as populações em três táxons. Nesse mesmo estudo, o autor também analisou aspectos comportamentais, tais como cooperação e conflitos entre rainhas de *P. inversa* que podem se associar para fundar uma nova colônia e estabelecerem posição hierárquica entre elas. Além dos resultados obtidos com as análises morfológicas e genéticas, o autor enfatizou a diferenciação dessas três espécies com base em observações adicionais tais como ausência de heterozigotos nessas populações, não ocorrência das três diferentes formas em uma mesma colônia e no isolamento reprodutivo entre os diferentes morfotipos (KOLMER, 2002).

A caracterização dessas três espécies de *Pachycondyla* do complexo *foetida* também foi objetivo do estudo realizado por Lucas et al. (2002). Nesse trabalho de caracterização e diferenciação genética, morfométrica e química, todos os resultados distinguiram três táxons. Nesse estudo, os autores relataram diferenças na morfologia das operárias que podem facilitar a diferenciação visual dessas espécies. Segundo esses autores, indivíduos de *P.*

villosa e *P. bactronica* apresentam coloração nas pernas e outras partes ventrais mais avermelhadas, com a tonalidade do vermelho mais vivo para *P. villosa*. Porém, a diferenciação entre essas espécies de acordo com esses autores é feita mais precisamente através de comparação na morfologia do pecíolo. Os autores relatam que o pecíolo de *P. villosa* forma um ângulo reto na sua face anterior, enquanto o pecíolo de *P. inversa* tem sua face anterior bastante côncava e o pecíolo de *P. bactronica* forma em sua face anterior um ângulo agudo. Os autores advertem para a sutileza e falta de clareza nas diferenças morfológicas e apontam essa problemática como causa das dificuldades taxonômicas que mantiveram essas espécies por tanto tempo sob o nome de um único táxon. Os resultados das análises com aloenzimas realizado por esses autores revelaram que de um total de 29 sistemas enzimáticos, cinco apresentaram padrões que permitem diferenciar claramente os três táxons e corroboraram os resultados de Kolmer (2002), nos quais heterozigotos não foram encontrados. A análise da composição de hidrocarbonetos realizada pelos autores foi congruente com os dados morfométricos revelando diferenças no tamanho das cadeias dos hidrocarbonetos entre as três espécies (LUCAS et al., 2002).

As diferenças morfológicas relatadas pelos autores citados anteriormente na coloração das pernas e partes ventrais também foi observada durante o período de coleta deste estudo, porém essa característica é marcante para diferenciar *P. villosa* das outras duas espécies e insuficiente para distinguir *P. inversa* de *P. bactronica*. A mesma dificuldade repete-se para a diferenciação dessas três espécies com base na morfologia do pecíolo. Enquanto o pecíolo da espécie *P. villosa* é mais facilmente distinguível em relação às outras duas espécies, tanto *P. inversa* quanto de *P. bactronica* apresentam a face do pecíolo curvada, sendo a diferenciação entre as duas espécies bastante sutil.

Diferenciação genética entre essas três espécies do complexo *foetida* também foi revelada no estudo de Mariano (2004). Nesse trabalho, a autora analisou o número haplóide de cromossomos e cariótipo de 20 espécies neotropicais de *Pachycondyla*, dentre essas, as três espécies caracterizadas nesse estudo, *P. villosa*, *P. inversa* e *P. bactronica*. Na época em que o estudo foi desenvolvido, *P. bactronica* ainda não havia sido descrita tendo sido referida

como *P. 'subversa'*. Os resultados revelaram diferenças nos cariótipos dessas espécies. O número de cromossomos para a espécie *P. villosa* foi de $2n= 34$ dos quais 12 são metacêntricos e 22 são acrocêntricos, para a espécie *P. inversa* o número cromossômico foi de $2n= 30$ dos quais 20 são metacêntricos e 10 são acrocêntricos enquanto a espécie *P. bactronica* apresentou dois diferentes cariótipos, $2n= 26$ com quatro cromossomos metacêntricos e 22 acrocêntricos e $2n= 28$ com 22 cromossomos metacêntricos e seis cromossomos acrocêntricos.

Considerando as informações relatadas anteriormente sobre diferenças no cariótipo das três espécies desse estudo, foi analisada uma possível correlação entre os dados citogenéticos apresentados no trabalho de Mariano (2004) e os dados de sequenciamento de DNA apresentados no presente trabalho. No trabalho de caracterização citogenética, a autora sugere que *P. villosa* apresenta um cariótipo bastante peculiar com maior número de cromossomos acrocêntricos que apresentam o braço longo extremamente mais longo do que o braço curto e rico em heterocromatina enquanto as espécies *P. inversa* e *P. bactronica* possuem um maior número de cromossomos do tipo metacêntrico sem diferenças marcantes no tamanho dos cromossomos e quantidade de heterocromatina uniforme. Com esses dados, a autora concluiu que *P. inversa* e *P. bactronica* são táxons com maior afinidade. Essa proximidade também é observada nas análises filogenéticas do presente estudo, onde a maioria das árvores apresentou o clado I que agrupou as populações de *P. villosa* mais distante geneticamente dos cladogramas II e III que agruparam populações das espécies *P. inversa* e *P. bactronica*.

O “status” taxonômico dessas três espécies do complexo *foetida* foi definido recentemente no trabalho de Fernandes et al. (2013). Nesse trabalho, os autores descreveram duas novas espécies de *Pachycondyla* do complexo *foetida* para o Brasil, *Pachycondyla billemma* e *Pachycondyla bactronica*. A espécie descrita como *P. bactronica* é a mesma citada nos trabalhos anteriores como *P. 'subversa'* e que apresenta morfologia bastante similar a *P. inversa*. Os autores reafirmam que *P. villosa* pode ser diferenciada facilmente de *P. bactronica* pela face anterior pecíolo e ainda adicionam outra característica para diferenciar essas duas espécies, a margem anterior do clipeo que é

côncava e sem estrias em *P. villosa*, enquanto em *P. bactronica* é estriada e convexa. Porém, não enfatizam diferenciação entre *P. inversa* e *P. bactronica*.

A análise conjunta dos dados apresentados e discutidos anteriormente nos trabalhos que comparam aspectos comportamentais, genéticos, químicos e morfológicos das populações das espécies simpátricas de *Pachycondyla* do complexo *foetida* convergem para a diferenciação de três táxons e revelam a importância de estudos integrativos para discriminação de espécies proximamente relacionadas e agrupadas em complexos de espécies

7. CONCLUSÕES

Os dados moleculares obtidos através do sequenciamento das regiões COI, 16S e ITS, apresentam informação filogenética suficiente para a recuperação das relações filogenéticas e para a separação dos táxons *P. villosa*, *P. inversa* e *P. bactronica*.

Os resultados obtidos nesse estudo corroboram com análises morfológicas, citogenéticas e moleculares anteriores de que as espécies neotropicais do complexo *foetida* e simpátricas no interior da Bahia, são três táxons distintos.

Os resultados para as três regiões sequenciadas e para os quatro métodos filogenéticos utilizados, recuperaram o agrupamento das populações de *P. villosa*, *P. inversa* e *P. bactronica* formando três grupos monofiléticos.

A divisão das árvores filogenéticas em três clados monofiléticos com o clado que agrupa as populações de *P. villosa* mais divergente, revelou que *P. villosa* é mais distante geneticamente das outras duas espécies, enquanto *P. inversa* e *P. bactronica* são mais relacionadas geneticamente, resultado que corrobora com os aspectos morfológicos e citogenéticos de trabalhos anteriores.

Os resultados revelaram a importância de estudos integrativos para discriminação de espécies agrupadas em complexos de espécies. Os caracteres morfológicos já descritos para as três espécies aqui estudadas não são muito claros ou fáceis de serem diferenciados. Porém, a integração de análises moleculares, citogenéticas, químicas, ecológicas e morfológicas, resultam em dados complementares para melhor diferenciação de espécies proximamente relacionadas que compõem complexos de espécies, como ocorre com espécies *P. bactronica*, *P. inversa* e *P. villosa*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTI, D.; JOHNSON, N.F. editores. **Antbase**, 2005. Disponível em: <<http://www.antbase.org>>. Acessado em: 06 fev. 2014.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v25, p. 3389-3402, 1997.
- AVISE, J. C.; BALL, J.M.; BERMINGAM, E.; LAMB, T. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, 18:489–522, 1987.
- AVISE, J. C. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, 36: 3-15, 2009.
- AYALA, F.J.; WETTERER, J.K.; LONGINO, J.T.; HARTL, D.L. Molecular phylogeny of *Azteca* ants (Hymenoptera: Formicidae) and the colonization of *Cecropia* trees. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 5, p. 423-428, 1996.
- BACCI, M.; SOLOMON, S. E.; MUELLER, U. G.; MARTINS, V. G.; CARVALHO, A. O. R.; VIERIA, L. G. E.; SILVA-PINHATI, A. C. O. Phylogeny of leafcutter ants in the genus *Atta* Fabricius (Formicidae: Attini) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. **Molecular phylogenetics and Evolution** 51: 427 – 437, 2009.
- BERNASCONI, C.; CHERIX, D.; SEIFERT, B.; PAMILO, P. Molecular taxonomy of the *Formica rufa* group (red wood ants)(Hymenoptera: Formicidae): a new cryptic species in the Swiss Alps. **Myrmecological News**, 14, 37-47, 2011.
- BICKFORD, D.; LOHMAN, D. J.; SODHI, N. S.; NG, P. K.; MEIER, R.; WINKER, K., DAS, I. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology & Evolution**, 22(3), 148-155, 2007.
- BOLTON, B., ALPERT, G.; WARD, P.S.; NASRECKI, P. Bolton's Catalogue of ants of the world. **Harvard University Press**, Cambridge, Massachusetts. 2006.CD-ROM.
- BRADY, S. G. Evolution of the army ant syndrome: the origin and long-term evolutionary stasis of a complex of behavioral and reproductive adaptations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 11: 6575-6579, 2003.
- BRADY, S. G.; T. R. SCHULTZ; B. L. FISHER; P. S. WARD. Evaluating alternative hypotheses for the early evolution and diversification of ants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**

of America 103: 18172-18177, 2006.

CATERINO, M. S.; CHO, S.; SPERLING, F. A. H. The current state of insect molecular systematics: a thriving tower of Babel. **Annual Review of Entomology**, v.45, p.1-45, 2000.

CROZIER, R. H.; DOBRIC, N.; IMAI, H.T.; GRAUR, D.; CORNUET, J. M.; TAYLOR, R. W. Mitochondrial-DNA sequence evidence on the phylogeny of Australian jack-jumper ants of the *Myrmecia pilosula* complex. **Evol.**, v. 4, p. 20- 30, 1995.

DEJEAN, A. Influence of the preimaginal and precocious environment on the choice of the nest in the ant *Pachycondyla villosa* (Fabr.). **Behavioural Processes**, 21: 107–125, 1990.

D'ETTORRE, P.; KELLNER, K.; DELABIE, J. H. C.; HEINZE, J. Number of queens in founding associations of the ponerine ant *Pachycondyla villosa*. **Insectes Sociaux**, 52: 327–332, 2005.

FERNANDES, I. O.; OLIVEIRA, M. L.; DELABIE, J. H. C. Description of two new species in the Neotropical *Pachycondyla foetida* complex (Hymenoptera: Formicidae: Ponerinae) and taxonomic notes on the genus. **Myrmecological News**. 19: 133-163, 2013.

FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse Metazoan Invertebrate. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v3, p.294-297.1994.

FERREIRA, R. S.; POTEAUX, C.; DELABIE, J. H. C.; FRESNEAU, D.; RYBAK, F. Stridulations reveal cryptic speciation in neotropical sympatric ants. **PLoS one**, 12: 15363, 2010.

HALL, T. A. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. **Nucl. Acids Symp. Ser.**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. Principles of population genetics Sunderland: **Sinauer associates**, Vol. 116, 1997.

HEINZE, J.; TRUNZER, B.; OLIVEIRA, P. S.; HOLLDOBLER, B. Regulation of reproduction in the neotropical ponerine ant *Pachycondyla villosa*. **J. Insect Behav.** 9: 441–450, 1996.

HOLLDOBLER, B.; WILSON, E.O. The Ants. New York: **Harvard University Press**, p.732, 1990.

KNADEN, M.; TINAUT, A.; STOKL, J.; CERDÁ, X.; WEHNER, R. Molecular phylogeny oh the desert ant genus *Cataglyphis* (Hymenoptera: Formicidae). **Myrmecological News**. 16: 123 – 132, 2012.

KOLMER, K.; HOLDOBLER, B.; HEINZE, J.. Colony and population structure in *Pachycondyla* cf. *inversa*, a ponerine ant with primary polygyny. **Ethology Ecology & Evolution**, 14: 157-164, 2002.

LATTKE, J.E. Subfamilia Ponerinae, In: F. Fernandez (ed.) Introduccion a las hormigas de la region Neotropical. Bogota, **Instituto de Investigacion de Recursos Biologicos Alexander von Humboldt**. 398 p. 261-276, 2003.

LUCAS C.; FRESNEAU D.; KOLMER K.; HEINZE J.; DELABIE J.H.C. and Pho D.B. A multidisciplinary approach to discriminating different taxa in the species complex *Pachycondyla villosa* (Formicidae). **Biol. J. Linn. Soc.** 75: 249–259, 2002.

MACKAY, W.; MACKAY, E.. The Systematic and Biology of the New World ants of the *Pachycondyla* (Hymenoptera: Formicidae). Texas: **The Edwin Mellen Press, Ltd.** 2010.

MARIANO, C. S. F.; POMPOLO, S. G.; DELABIE, J. H. C. Citogenética das espécies gêmeas e simpátricas *Pachycondyla villosa* e *Pachycondyla* sp 'inversa' (Ponerinae). **Naturalia**, 24: 215–217, 2000.

MARIANO, C.S.F.; DELABIE, J.H.C.; *Dinoponera Lucida* Emery (Formicidae: Ponerinae): the highest number of chromosome known in Hymenoptera. **Naturwissenschaften**, v. 91, p.82–185, 2004.

MARIANO, C.S.F.; POMPOLO, S.G.; LACAU, S.; J.H.C. DELABIE. Questions sur la monophylie du taxon *Pachycondyla* Smith, 1858: approche cytogénétique sur le sous-genre *Pachycondyla sensu* Emery, 1901 (Hymenoptera, Formicidae, Ponerinae). **Bulletin de la Société entomologique de France**, 3: 299-304, 2006.

MARTINS, J.; SOLOMON, S. E.; MIKHEYEV, A. S.; MUELLER, U. G.; ORTIZ, A.; BACCI, M. Nuclear mitochondrial-like sequences in ants: evidence from *Atta cephalotes* (Formicidae: Attini). **Insect molecular biology**, 16(6): 777-784, 2007.

MOREAU, C. S.; BELL, C. D.; VILA, R.; ARCHIBALD, S. B.; PIERCE, N. E. Phylogeny of the ants: diversification in the age of angiosperms. **Science**, 312(5770), 101-104, 2006.

MOREAU, C. S. Unraveling the evolutionary history of the hyperdiverse ant genus *Pheidole* (Hymenoptera: Formicidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 48: 224-239, 2008.

PILGRIM, E. M.; ROUSH, S. A.; KRANE, D. E. Combining DNA sequences and morphology in systematics: testing the validity of the dragonfly species *Cordulegaster bilineata*. **Heredity**, 89(3), 184-190, 2002.

RABELING, C.; BROWN, J.M.; VERHAAGH, M. Newly discovered sister lineage sheds light on early ant evolution. **Proceedings of the National Academy of Science**, p. 1-5, 2008.

RESENDE, H. C.; YOTOKO, K. S.; DELABIE, J. H.; COSTA, M. A.; CAMPIOLO, S.; TAVARES, M. G.; FERNANDES-SALOMÃO, T. M. Pliocene and Pleistocene events shaping the genetic diversity within the central corridor of the Brazilian Atlantic Forest. **Biological Journal of the Linnean Society**, 101(4), 949-960, 2010.

RONQUIST, F.; J. P. HUELSENBECK. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics** v19, p.1572-1574, 2003.

ROSS, K. G., SHOEMAKER, D. D. Species delimitation in native South American fire ants. **Molecular Ecology**, 14(11), 3419-3438, 2005.

ROSS, K. G.; GOTZEK, D.; ASCUNCE, M. S.; SHOEMAKER, D. D. Species delimitation: a case study in a problematic ant taxon. **Systematic biology**, 59: 162-184, 2010.

RUST, J.; ANDERSEN, N.M. Giant ants from the Paleogene of Denmark with a discussion of the fossil history and early evolution of ants (Hymenoptera: Formicidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**. v.125, p.331- 348, 1999.

SANCHEZ-PEÑA, S. R.; CHACÓN-CARDOSA, M. C.; RESENDEZ-PEREZ, D. Identification of Fire Ants (Hymenoptera: Formicidae) from Northeastern Mexico with Morphology and Molecular Markers. **BioOne Research Involved**, 92(1):107-115. 2009.

SCHLICK-STEINER, B. C.; STEINER, F. M.; MODER, K.; SEIFERT, B., SANETRA, M.; DYRESON, E.; CHRISTIAN, E. A multidisciplinary approach reveals cryptic diversity in Western Palearctic *Tetramorium* ants (Hymenoptera: Formicidae) **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 40(1), 259-273, 2006.

SCHMIDT, C. A. Molecular phylogenetics and taxonomic revision of Ponerine ants (hymenoptera: formicidae: ponerinae). Tese de Doutorado. Graduate interdisciplinary program in insect Science. **The University of Arizona**. USA, 2009.

SCHMIDT, C. A. Molecular phylogenetics of ponerine ants (Hymenoptera: Formicidae: Ponerinae). **Zootaxa**. 3647 2: 201–250, 2013.

SEIFERT, B. Cryptic species in ants (Hymenoptera: Formicidae) revisited: we need a change in the alpha-taxonomic approach. **Myrmecological News**. 12: 149 – 166, 2009.

SILVESTRE, R.; BRANDÃO. C. R.; SILVA, R. R. Grupos funcionales de hormigas: El caso de los grêmios de cerrado. In: FERNANDEZ, F. (Ed)

Introducción a las hormigas de la región neotropical. Bogotá: **Instituto de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt**, p. 113 – 148, 2003.

SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACK, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and compilation of conserved Polymerase Chain Reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America**, v87, p. 651-701, 1994.

STEWART, J.B. ; BECKENBACH, A.T. Insect mitochondrial genomics 2: the complete mitochondrial genome sequence of a giant stonefly, *Pteronarcys princeps*, asymmetric directional mutation bias, and conserved plecopteran A+T - region elements. **Genome**, v.49, p.815-824, 2006.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.1. **Molecular Biology and Evolution** 24:1596-1599, 2007.

TENTSCHERT, J.; KOLMER, K.; HOLDOBLER, B.; BESTMANN, H. J.; DELABIE, J.; HEINZE, J. Chemical profiles, division of labor and social status in *Pachycondyla* queens (Hymenoptera: Formicidae). **Naturwissenschaften**, 4:175-178, 2001.

THOMPSON, J.; HIGGINS, D.; GIBSON, T. Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position- specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v22, p.4673, 1994.

TRINDL, A.; HEINZE, J.; D'ETTORRE, P. Isolation and characterization of five microsatellite loci in the ponerine ant *Pachycondyla inversa* (Hymenoptera, Formicidae). **Molecular Ecology**. 4: 583–585, 2004.

TRUNZER, B.; HEINZE, J.; HOLDOBLER, B. Cooperative colony founding and experimental primary polygyny in the ponerine ant *Pachycondyla villosa*. **Insectes Sociaux**, 45: 267–276, 1998.

WARD, P. Phylogeny, classification, and species-level taxonomy of ants (Hymenoptera: Formicidae). **Zootaxa**, v. 1668, p. 549–563, 2007.

WILD, A. L. The Genus *Pachycondyla* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) in Paraguay. **Bol. Mus. Nac. Hist. Nat. Parag.** 14: 1- 18, 2002.

WILSON, E.O.; HOLDOBLER, B. The rise of ants: A phylogenetic and ecological explanation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.102,p. 7411-7414, 2005.

ZARA, F. J.; CAETANO, F. H. Ultramorphology and histology of the larval salivary gland of *Pachycondyla villosa* (Fabricius) (Hymenoptera: Formicidae, Ponerinae). **Neotropical Entomology**, 32: 59-68, 2003.

APENDICE 1. Matriz de distância do gene COI de espécies do grupo *foetida*, utilizando o algoritmo de Kimura-2-parâmetros.

```

[ 1] #Barro_6_bactronica
[ 2] #Barro_7_bactronica
[ 3] #Uruuca_sede_1_villosa
[ 4] #Barro_1_villosa
[ 5] #Ceplac_3_villosa
[ 6] #Uruuca_trilha_4_apicalis
[ 7] #Uesc_bosque_2_villosa
[ 8] #Ceplac_5_inversa
[ 9] #Ceplac_6_inversa
[10] #Porto_Seguro_inversa
[11] #Pira_do_norte_inversa
[12] #Mara_villosa
[13] #Ceplac_4_inversa
[14] #Una_1_villosa
[15] #ceplac_2_villosa
[16] #Barro_2_villosa
[17] #Barro_3_villosa
[18] #Uruuca_trilha_1_inversa
[19] #So_Roque_bactronica
[20] #Itapinas_villosa
[21] #Una_2_villosa
[22] #Una_3_villosa
[23] #Itajuipe_2_villosa
[24] #Uruuca_sede_2_villosa
[25] #Itajuipe_1_villosa
[26] #Ceplac_8_villosa
[27] #Uruuca_se_3_villosa
[28] #Itajuipe_3_villosa
[29] #Porto_Seguro_2_villosa
[30] #Porto_Seguro_3_villosa
[31] #Porto_Seguro_4_villosa
[32] #Barro_7.2_bactronica
[33] #Barro_5_villosa

[ 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 ]
[ 1]
[ 2] 0.00
[ 3] 0.12 0.12
[ 4] 0.12 0.12 0.00
[ 5] 0.12 0.12 0.00 0.00
[ 6] 0.20 0.20 0.18 0.18 0.18
[ 7] 0.12 0.12 0.00 0.00 0.00 0.18
[ 8] 0.19 0.19 0.10 0.10 0.10 0.20 0.10
[ 9] 0.12 0.12 0.10 0.10 0.10 0.19 0.10 0.01
[10] 0.12 0.12 0.10 0.10 0.10 0.19 0.10 0.00 0.01
[11] 0.12 0.12 0.11 0.11 0.11 0.19 0.11 0.01 0.02 0.01
[12] 0.12 0.12 0.00 0.00 0.00 0.18 0.00 0.10 0.10 0.10 0.11
[13] 0.18 0.18 0.10 0.10 0.10 0.20 0.10 0.00 0.01 0.00 0.01 0.10
[14] 0.12 0.12 0.00 0.00 0.00 0.18 0.00 0.10 0.10 0.10 0.11 0.00 0.10
[15] 0.12 0.12 0.00 0.00 0.00 0.18 0.00 0.10 0.10 0.10 0.11 0.00 0.10 0.00
[16] 0.12 0.12 0.00 0.00 0.00 0.18 0.00 0.11 0.11 0.11 0.11 0.00 0.11 0.00 0.00
[17] 0.12 0.12 0.00 0.00 0.00 0.18 0.00 0.10 0.10 0.10 0.11 0.00 0.10 0.00 0.00 0.00
[18] 0.19 0.12 0.11 0.11 0.11 0.19 0.11 0.00 0.01 0.00 0.01 0.11 0.00 0.11 0.11 0.11 0.11
[19] 0.05 0.05 0.10 0.10 0.10 0.19 0.10 0.12 0.11 0.11 0.11 0.10 0.12 0.10 0.10 0.10 0.10 0.12
[20] 0.12 0.12 0.00 0.00 0.00 0.18 0.00 0.11 0.11 0.11 0.11 0.00 0.11 0.00 0.00 0.00 0.00 0.11 0.10
[21] 0.12 0.12 0.00 0.00 0.00 0.18 0.00 0.10 0.10 0.10 0.11 0.00 0.10 0.00 0.00 0.00 0.00 0.11 0.10 0.00
[22] 0.12 0.12 0.00 0.00 0.00 0.18 0.00 0.10 0.10 0.10 0.11 0.00 0.10 0.00 0.00 0.00 0.00 0.11 0.10 0.00 0.00
[23] 0.12 0.12 0.00 0.00 0.00 0.18 0.00 0.10 0.10 0.10 0.11 0.00 0.10 0.00 0.00 0.00 0.00 0.11 0.10 0.00 0.00 0.00
[24] 0.12 0.12 0.00 0.00 0.00 0.18 0.00 0.10 0.10 0.10 0.11 0.00 0.10 0.00 0.00 0.00 0.00 0.11 0.10 0.00 0.00 0.00
[25] 0.12 0.12 0.00 0.00 0.00 0.18 0.00 0.10 0.10 0.10 0.11 0.00 0.10 0.00 0.00 0.00 0.00 0.11 0.10 0.00 0.00 0.00
[26] 0.12 0.12 0.00 0.00 0.00 0.18 0.00 0.10 0.10 0.10 0.11 0.00 0.10 0.00 0.00 0.00 0.00 0.10 0.10 0.00 0.00 0.00 0.00
[27] 0.17 0.17 0.05 0.05 0.05 0.22 0.05 0.15 0.16 0.15 0.16 0.05 0.15 0.05 0.05 0.06 0.05 0.15 0.15 0.06 0.05 0.05 0.05 0.05 0.05 0.06
[28] 0.12 0.12 0.00 0.00 0.00 0.18 0.00 0.11 0.11 0.11 0.11 0.00 0.11 0.00 0.00 0.00 0.00 0.11 0.10 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.05
[29] 0.12 0.12 0.00 0.00 0.00 0.18 0.00 0.10 0.10 0.10 0.11 0.00 0.10 0.00 0.00 0.00 0.00 0.11 0.10 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.05 0.00
[30] 0.12 0.12 0.00 0.00 0.00 0.18 0.00 0.11 0.11 0.11 0.11 0.00 0.11 0.00 0.00 0.00 0.00 0.11 0.10 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.05 0.00 0.00
[31] 0.12 0.12 0.00 0.00 0.00 0.18 0.00 0.10 0.10 0.10 0.11 0.00 0.10 0.00 0.00 0.00 0.00 0.11 0.10 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.05 0.00 0.00 0.00
[32] 0.00 0.00 0.12 0.12 0.12 0.20 0.12 0.18 0.12 0.12 0.12 0.12 0.12 0.12 0.12 0.12 0.12 0.13 0.05 0.12 0.12 0.12 0.12 0.12 0.12 0.12 0.17 0.12 0.12 0.12 0.12
[33] 0.12 0.12 0.00 0.00 0.00 0.18 0.00 0.11 0.11 0.11 0.11 0.00 0.11 0.00 0.00 0.00 0.00 0.11 0.10 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.06 0.00 0.00 0.00 0.00 0.12

```

APENDICE 2. Matriz de distância do gene 16S de espécies do grupo *foetida*, utilizando o algoritmo de Kimura-2-parâmetros

```

[ 1] #Ceplac_2_villosa
[ 2] #Barro_5_villosa
[ 3] #Barro_7_bactronica
[ 4] #Urucuca_sede_1_villosa
[ 5] #Barro_1_villosa
[ 6] #Barro_2_villosa
[ 7] #Barro_3_villosa
[ 8] #Urucuca_trilha_4_aplicalis
[ 9] #Marau_villosa
[10] #Ceplac_6_inversa
[11] #Una_1_villosa
[12] #Una_2_villosa
[13] #Itajuípe_1_villosa
[14] #Barro_6_bactronica
[15] #Urucuca_trilha_1_inversa
[16] #Pirai_do_Norte_inversa
[17] #Uesc_bosque_2_villosa
[18] #Ceplac_5_inversa
[19] #So_Roque_bactronica
[20] #Itapinas_villosa
[21] #Porto_Seg_inversa
[22] #Una_3_villosa
[23] #Urucuca_sede_2_villosa
[24] #Ceplac_8_villosa
[25] #Ceplac_4_inversa
[26] #Urucuca_sede_3_villosa
[27] #Porto_Seguro_3_villosa
[28] #Porto_Seguro_4_villosa

[      1  2  3  4  5  6  7  8  9  10  11  12  13  14  15  16  17  18  19  20  21  22  23  24  25  26  27  28 ]
[ 1]
[ 2] 0.00
[ 3] 0.04 0.04
[ 4] 0.00 0.00 0.05
[ 5] 0.00 0.00 0.04 0.00
[ 6] 0.00 0.00 0.04 0.00 0.00
[ 7] 0.00 0.00 0.04 0.00 0.00 0.00
[ 8] 0.12 0.12 0.12 0.13 0.12 0.12 0.12
[ 9] 0.00 0.00 0.04 0.00 0.00 0.00 0.00 0.12
[10] 0.06 0.06 0.06 0.07 0.06 0.06 0.06 0.16 0.07
[11] 0.00 0.00 0.04 0.00 0.00 0.00 0.00 0.12 0.00 0.06
[12] 0.00 0.00 0.04 0.01 0.00 0.00 0.00 0.12 0.00 0.07 0.00
[13] 0.00 0.00 0.04 0.00 0.00 0.00 0.00 0.12 0.00 0.06 0.00 0.00
[14] 0.04 0.04 0.00 0.05 0.04 0.04 0.04 0.12 0.04 0.06 0.04 0.04 0.04
[15] 0.06 0.06 0.06 0.06 0.06 0.06 0.06 0.15 0.06 0.00 0.06 0.06 0.06 0.06
[16] 0.06 0.06 0.06 0.06 0.06 0.06 0.06 0.06 0.15 0.06 0.01 0.06 0.06 0.06 0.06 0.01
[17] 0.00 0.00 0.04 0.00 0.00 0.00 0.00 0.12 0.00 0.06 0.00 0.00 0.00 0.04 0.06 0.06
[18] 0.06 0.06 0.06 0.06 0.06 0.06 0.06 0.15 0.06 0.00 0.06 0.06 0.06 0.06 0.00 0.01 0.06
[19] 0.04 0.04 0.02 0.04 0.04 0.04 0.04 0.14 0.04 0.07 0.04 0.04 0.04 0.02 0.06 0.06 0.04 0.07
[20] 0.00 0.00 0.04 0.00 0.00 0.00 0.00 0.12 0.00 0.06 0.00 0.00 0.00 0.04 0.06 0.06 0.00 0.06 0.04
[21] 0.06 0.06 0.06 0.07 0.06 0.06 0.06 0.15 0.06 0.01 0.06 0.06 0.06 0.06 0.01 0.01 0.06 0.00 0.06 0.06
[22] 0.00 0.00 0.04 0.00 0.00 0.00 0.00 0.12 0.00 0.06 0.00 0.00 0.00 0.04 0.06 0.06 0.00 0.06 0.04 0.00 0.06
[23] 0.00 0.00 0.04 0.00 0.00 0.00 0.00 0.12 0.00 0.06 0.00 0.00 0.00 0.04 0.06 0.06 0.00 0.06 0.04 0.00 0.06 0.00
[24] 0.00 0.00 0.05 0.01 0.00 0.00 0.01 0.13 0.01 0.07 0.00 0.01 0.00 0.05 0.06 0.06 0.00 0.07 0.04 0.00 0.07 0.00 0.00
[25] 0.06 0.06 0.06 0.07 0.06 0.06 0.06 0.16 0.07 0.00 0.06 0.07 0.06 0.06 0.00 0.01 0.06 0.00 0.07 0.06 0.01 0.06 0.06 0.07
[26] 0.00 0.00 0.04 0.00 0.00 0.00 0.00 0.12 0.00 0.07 0.00 0.00 0.00 0.04 0.06 0.06 0.00 0.06 0.04 0.00 0.06 0.00 0.00 0.01 0.07
[27] 0.00 0.00 0.04 0.00 0.00 0.00 0.00 0.12 0.00 0.06 0.00 0.00 0.00 0.04 0.06 0.06 0.00 0.06 0.04 0.00 0.06 0.00 0.00 0.00 0.06 0.00
[28] 0.00 0.00 0.04 0.00 0.00 0.00 0.00 0.12 0.00 0.06 0.00 0.00 0.00 0.04 0.06 0.06 0.00 0.06 0.04 0.00 0.06 0.00 0.00 0.00 0.06 0.00 0.00

```

APENDICE 3. Matriz de distância da região ITS1 de espécies do grupo *foetida*, utilizando o algoritmo de Kimura-2-parâmetros.

```

[ 1] #Ceplac_4_inversa
[ 2] #ceplac_6_inversa
[ 3] #Una_1_villosa
[ 4] #Itajuípe_1_villosa
[ 5] #Urucuca_sede_3_villosa
[ 6] #Itajuípe_3_villosa
[ 7] #Porto_Seguro_2_villosa
[ 8] #Porto_Seguro_4_villosa
[ 9] #Barro_7.2_bactronica
[10] #Barro_5_villosa
[11] #Barro_6_bactronica
[12] #Barro_7_bactronica
[13] #Urucuca_sede_1_villosa
[14] #Barro_1_villosa
[15] #Ceplac_3_villosa
[16] #Urucuca_apicalis
[17] #Uesc_2_villosa
[18] #Marau_villosa
[19] #Uruuca_sede_2_villosa
[20] #Itajuípe_2_villosa
[21] #Una_2_villosa
[22] #Una_3_villosa
[23] #Barro_2_villosa
[24] #Barro_3_villosa
[25] #Ceplac_2_villosa

[      1  2  3  4  5  6  7  8  9  10  11  12  13  14  15  16  17  18  19  20  21  22  23  24  25 ]
[ 1]
[ 2] 0.00
[ 3] 0.02 0.02
[ 4] 0.02 0.02 0.00
[ 5] 0.02 0.02 0.00 0.00
[ 6] 0.02 0.02 0.00 0.00 0.00
[ 7] 0.02 0.02 0.00 0.00 0.00 0.00
[ 8] 0.02 0.02 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00
[ 9] 0.01 0.01 0.02 0.02 0.02 0.02 0.02 0.02
[10] 0.02 0.02 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.02
[11] 0.01 0.01 0.02 0.02 0.02 0.02 0.02 0.02 0.00 0.02
[12] 0.01 0.01 0.02 0.02 0.02 0.02 0.02 0.02 0.00 0.02 0.00
[13] 0.02 0.02 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.02 0.00 0.02 0.02
[14] 0.02 0.02 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.02 0.00 0.02 0.02 0.00
[15] 0.02 0.02 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.02 0.00 0.02 0.02 0.00 0.00
[16] 0.07 0.07 0.07 0.07 0.07 0.07 0.07 0.07 0.07 0.07 0.07 0.07 0.07
[17] 0.02 0.02 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.02 0.00 0.02 0.02 0.00 0.00 0.07
[18] 0.02 0.02 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.02 0.00 0.02 0.02 0.00 0.00 0.07 0.00
[19] 0.02 0.02 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.02 0.00 0.02 0.02 0.00 0.00 0.07 0.00 0.00
[20] 0.02 0.02 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.02 0.00 0.02 0.02 0.00 0.00 0.07 0.00 0.00 0.00
[21] 0.02 0.02 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.02 0.00 0.02 0.02 0.00 0.00 0.07 0.00 0.00 0.00 0.00
[22] 0.02 0.02 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.02 0.00 0.02 0.02 0.00 0.00 0.07 0.00 0.00 0.00 0.00
[23] 0.02 0.02 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.02 0.00 0.02 0.02 0.00 0.00 0.07 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00
[24] 0.02 0.02 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.02 0.00 0.02 0.02 0.01 0.00 0.07 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00
[25] 0.02 0.02 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.02 0.00 0.02 0.02 0.00 0.00 0.07 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00

```

APENDICE 4. Matriz de distância dos dados concatenados de espécies do grupo *foetida*, utilizando o algoritmo de Kimura-2-parâmetros.

```

[ 1] #Ceplac_4_inversa
[ 2] #ceplac_6_inversa
[ 3] #Una_1_villosa
[ 4] #Itajuípe_1_villosa
[ 5] #Urucuca_sede_3_villosa
[ 6] #Porto_Seguro_4_villosa
[ 7] #Barro_5_villosa
[ 8] #Barro_6_bactronica
[ 9] #Barro_7_bactronica
[10] #Urucuca_sede_1_villosa
[11] #Barro_1_villosa
[12] #Urucuca_apicalis
[13] #Uesc_2_villosa
[14] #Marau_villosa
[15] #Uruuca_sede_2_villosa
[16] #Una_2_villosa
[17] #Una_3_villosa
[18] #Barro_2_villosa
[19] #Barro_3_villosa
[20] #Ceplac_2_villosa

[      1  2  3  4  5  6  7  8  9  10  11  12  13  14  15  16  17  18  19  20 ]
[ 1]
[ 2] 0.01
[ 3] 0.06 0.06
[ 4] 0.06 0.06 0.00
[ 5] 0.07 0.08 0.02 0.02
[ 6] 0.06 0.06 0.00 0.00 0.02
[ 7] 0.06 0.06 0.00 0.00 0.02 0.00
[ 8] 0.06 0.06 0.06 0.06 0.07 0.06 0.06
[ 9] 0.06 0.06 0.06 0.06 0.07 0.06 0.06 0.00
[10] 0.06 0.06 0.00 0.00 0.02 0.00 0.00 0.06 0.06
[11] 0.06 0.06 0.00 0.00 0.02 0.00 0.00 0.06 0.06 0.00
[12] 0.13 0.13 0.12 0.12 0.13 0.12 0.12 0.12 0.12 0.12 0.12
[13] 0.06 0.06 0.00 0.00 0.02 0.00 0.00 0.06 0.06 0.00 0.00 0.12
[14] 0.06 0.06 0.00 0.00 0.02 0.00 0.00 0.06 0.06 0.00 0.00 0.12 0.00
[15] 0.06 0.06 0.00 0.00 0.02 0.00 0.00 0.06 0.06 0.00 0.00 0.12 0.00 0.00
[16] 0.06 0.06 0.00 0.00 0.02 0.00 0.00 0.06 0.06 0.00 0.00 0.12 0.00 0.00 0.00
[17] 0.06 0.06 0.00 0.00 0.02 0.00 0.00 0.06 0.06 0.00 0.00 0.12 0.00 0.00 0.00 0.00
[18] 0.06 0.06 0.00 0.00 0.02 0.00 0.00 0.06 0.06 0.00 0.00 0.12 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00
[19] 0.06 0.06 0.00 0.00 0.02 0.00 0.00 0.06 0.06 0.00 0.00 0.12 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00
[20] 0.06 0.06 0.00 0.00 0.02 0.00 0.00 0.06 0.06 0.00 0.00 0.12 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00

```