



**Diversidade de *Camponotus* spp. (Hymenoptera: Formicidae) em áreas verdes urbanas**

**Amanda Aparecida de Oliveira**

# **INSTITUTO BIOLÓGICO**

## **PÓS-GRADUAÇÃO**

**Diversidade de *Camponotus* spp. (Hymenoptera: Formicidae) em áreas verdes urbanas**

**Amanda Aparecida de Oliveira**

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.  
Área de Concentração Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Harakava  
Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Eugênia de Carvalho Campos

**São Paulo  
2015**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo**  
**Núcleo de Informação e Documentação – IB**

---

Oliveira, Amanda Aparecida de.

Diversidade de *Camponotus spp.* (Hymenoptera: Formicidae) em áreas verdes urbanas. / Amanda Aparecida de Oliveira. – São Paulo, 2015.

62 p.

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Linha de pesquisa: Biodiversidade: caracterização, interações, interações ecológicas em agroecossistemas.

Orientador: Ricardo Harakava.

Versão do título para o inglês: Diversity of *Camponotus spp.* (Hymenoptera: Formicidae) in urban green areas.

1. Riqueza de espécies 2. COI 3. Identificação 4. Formiga-carpinteira.  
Oliveira, Amanda Aparecida de II. Harakava, Ricardo III. Instituto Biológico (São Paulo). IV. Título

*IB/Bibl./2015/003*

---

## *Ofereço*

*Á minha avó Cacilda por todo apoio e fé.*

## *Dedico*

*A minha mãe pelo apoio e paciência imensurável,*

*por todo amor e companheirismo.*

*Ao meu pai José (in memoriam) por ser meu eterno companheiro.*

## *Agradecimentos*

À Deus pelo dom da vida e toda força que me proporciona sempre e por essa oportunidade de realizar mais uma etapa da minha vida.

Ao Instituto Biológico e ao Programa de Pós-Graduação pela oportunidade de desenvolver esse projeto. Juntamente aos excelentes pesquisadores e profissionais capacitados, que de alguma forma contribuíram para minha formação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa.

Ao Dr. Eduardo A.B de Almeida pela participação na qualificação e suas considerações.

Ao Dr. Marcio Roberto Pie pela paciência e receptividade, e suas sugestões na dissertação.

Ao Dr. Ricardo Harakava, meu orientador por aceitar como sua orientada, pela oportunidade de desenvolver esse projeto. Que sempre esteve aberto, acessível para conversas, ideias, ensinamentos, dicas, todo conhecimento disponibilizado, sem mencionar a confiança e amizade conquistada. Agradecer, por ser participativo e que todo o aprendizado desenvolvido ao longo desse tempo, será de valor imensurável para minha formação acadêmica. Pela paciência, confiança e sem dúvida por ser esse exemplo de profissionalismo.

À Dra. Ana Eugênia de Carvalho Campos, por sempre se fazer muito presente e disponível ao longo do desenvolvimento deste trabalho. Por todo ensinamento em mirmecologia, ecologia em ambientes urbanos, auxílio com taxonomia, todas as ideias, sugestões, comentários de extrema importância, por toda paciência e didática.

À pesquisadora Harumi Hojo, por todo companheirismo, amizade, confiança e apoio durante todo o período desde que cheguei no Instituto Biológico.

Ao Dr. Valmir Antônio Costa por aceitar participar da banca, todas e fundamentais sugestões ao trabalho pelo auxílio sobre questões taxonômicas gerais e por toda ajuda com as belíssimas fotos.

Ao pesquisador João Justi Junior pela disponibilidade efetiva e auxílio com fotografias.

À Dra. Priscila Larcher Longo, por auxílio com as técnicas de extração de DNA.

Aos funcionários de apoio viabilizando a realização do trabalho, Maria Emília, Edvaldo, Sr. Carlos o meu muito obrigado.

Ao Marcos Silva funcionário do Horto Florestal que foi fundamental para disponibilização das armadilhas e toda acessória enquanto estava lá.

Aos meus amigos que disponibilizaram espécimes para contribuir com esse trabalho: Denise Lange, Leonardo Rodrigues, Carina Djamila, Marco Aurélio, Eduardo De Masi, Marcely Silva, André Arruda, Manuela Ramalho, Adriano Marcelino, Bruna Messora entre outros, meus sinceros agradecimentos.

Ao Msc Thiago Ranzani Silva pela validação dos espécimes no Museu de Zoologia e incansáveis discussões taxonômicas.

À Bruna Messora pelo companheirismo nas horas necessárias e importantíssimas como coletas, triagem, montagem, identificações e risadas, é claro.

Aos meus colegas de turma em especial ao André Arruda (Andrezinho) companheiro desde as disciplinas e viagens para Campinas e hoje um amigo fundamental.

À Renata Comparoni (Batatinha) por conversas, conselhos, diversões, “gordices”, amizade e certamente por ganhar uma irmãzinha no curso, mas que levarei para vida.

À Luara Cassiano (Ribeirão) pelas inúmeras horas de conversas, trabalhos, risadas e companheirismo.

À Renata Marraschi (Bigato), companheira de travessuras e altas discussões de Bioestatística aos fins de semana.

À minha querida amiga Áurea pelo exemplo de pessoa determinada e admirável que és. E todos eles que com seu jeito único me ensinou coisas novas e boas, tornando-me uma pessoa melhor: Talita Brombrilla (Tali), Renato Brogia (Rê), Patrícia Ballone (Paty), Fabíola, Marisilda, Simone, Gabriela e Stefano.

Aos meus amigos da Bioquímica Fitopatológica que me acolheram como membro da família e sempre me fizeram sentir em casa. Patricia Haddad por ser sempre presente e disposta a ajudar, amiga para todas as horas: risadas, gordices, trabalhos, uma pessoa super do bem. Cleusa Lucon por toda conversa, dicas, discussões, amizade e pelo seu alto astral de sempre. As meninas lindas Martinha e Laurinha, que me acompanharam parte deste trabalho.

Ao Dr. Wagner Campos por sua contribuição em questões moleculares, sequenciamentos, padronizações com a PCR, inúmeras dicas fundamentais e pela amizade conquistada.

Aos meus outros amigos que seja por e-mail, encontros anuais ou telefonemas fizeram-se presentes e me apoiaram nessa jornada com dicas e opiniões. Valeu galera! Mário Kokubu (Harry) companheiro de todas as horas, coxinhas, risadas e surtos. Daysi Andrade (Mini Daysi) por sua paciência inigualável, Anderson Fujita (Japonês) pelos conselhos, Iris Braz (Castanha) e Roberto Silva (Robert).

Toda equipe do Centro Experimental de Controle Biológico, que sempre me recebeu de braços e portas abertas. Em especial a Roselaine Bueno, por ser eterna mãezona, Mariana, Tatiane, Ana Paula Pinto, Milena e Lucas, Ana Beatriz.

À minha amada avó que sempre faz suas orações para minha proteção, por todas suas guloseimas e mimos em todos os momentos, parceria para sempre. Valeu Dona Cacilda! À minha madrinha Amélia pelo apoio e auxílio que sempre forneceu, a gorda Amaynara pelo simples fato de alegrar meus dias.

Todos meus primos, familiares, amigos, colegas que sempre estiveram na torcida pela conclusão dessa etapa.

Ao Márcio Martins, primeiro pela paciência durante todo esse tempo, você sabe o quanto foi árduo e trabalhoso, por ser companheiro, fiel, amigo e além de tudo essa pessoa linda que tive sorte de encontrar.

Aos meus pais Salete e José (*in memoriam*), por sempre participarem efetivamente em todos os projetos designados, serem companheiros e sem dúvida meus primeiros mentores na vida, por toda dedicação de suas vidas, amor incondicional, por confiar e acreditar na minha capacidade e em meu sonho e que se não fosse o apoio, orações, paciência, participação isso nunca seria possível.

À Salete, apesar de tê-la citado antes, por sua fiel companhia em todas as coletas de formigas, risadas, paciência, dedicação, amizade e sem qualquer sombra de dúvida por ser minha base de tudo, amo a senhora.

OLIVEIRA, A.A. DIVERSIDADE DE *Camponotus* spp.(HYMENOPTERA:FORMICIDAE) EM ÁREAS VERDES URBANAS. São Paulo. 2015. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

## RESUMO

Os ecossistemas urbanos são marcados por intensa atividade humana e o processo de urbanização é considerado uma das maiores ameaças à biodiversidade. A preservação de áreas verdes urbanas é extremamente importante, pois podem atuar como repositório da diversidade biológica. Um táxon muito utilizado para mensurar condições ambientais é a família Formicidae. Por ter grande diversidade de espécies e funções ecológicas distintas é possível classificar as formigas em grupos funcionais, nos quais os gêneros apresentam comportamentos e preferências por alimentos e habitats distintos. Um gênero frequentemente encontrado em áreas urbanas é *Camponotus*, conhecida popularmente como formiga-carpinteira. Dentre as formigas, é o maior gênero em número de espécies, abrangendo cerca de 200 espécies apenas na Região Neotropical. A hiperdiversidade e o polimorfismo encontrados neste gênero geram entraves para a identificação taxonômica. Métodos moleculares têm se mostrado como ferramentas auxiliares valiosas para a distinção e identificação de insetos de difícil separação com base em características morfológicas. O objetivo do presente estudo foi identificar a riqueza de espécies do gênero *Camponotus* em duas áreas verdes de São Paulo com perfis distintos de urbanização (Horto Florestal e Instituto Biológico), empregando métodos tradicionais e moleculares para a identificação dos espécimes coletados ativamente ou com armadilha luminosa. A identificação morfológica foi realizada por meio de chaves dicotômicas e por comparação com espécimes depositados em coleções oficiais. As análises moleculares envolveram o sequenciamento de fragmento do gene codificador da citocromo oxidase I mitocondrial e de marcadores do tipo EPIC (*exon-primed intron-crossing*). A identificação baseada na morfologia resultou em nove espécies e sete morfoespécies somando os dois locais de coleta. No Horto Florestal foi encontrada maior riqueza de espécies provavelmente devido à

maior proximidade a uma área remanescente de Mata Atlântica. Sequências do gene COI obtidas para espécimes alados permitiu relacioná-los às respectivas operárias. As análises filogenéticas indicaram a existência de espécies crípticas de *C. balzani* e *C. atriceps*, com ampla divergência genética. O marcador EPIC ant.1281 confirmou os principais achados obtidos com o gene COI, mas apresentou maior variabilidade intraespecífica, principalmente na forma de inserções/deleções, podendo ser útil em estudos de populações. Os resultados mostraram que áreas verdes urbanas abrigam uma riqueza de espécies significativa desse gênero e auxiliam na manutenção da diversidade local.

Palavras-chave: Riqueza de espécies, COI, Identificação, Formiga-carpinteira, espécie críptica

OLIVEIRA, A.A. DIVERSITY OF *Camponotus* spp.(HYMENOPTERA:FORMICIDAE) IN URBAN GREEN AREAS. São Paulo. 2015. Dissertation (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico

### ABSTRACT

Urban ecosystems are marked by intense human activity and the process of urbanization is considered one of the greatest threats to biodiversity. Thus, to preserve urban green areas is extremely important because it serves as a repository of biological diversity. A taxon widely used to measure environmental conditions is the Formicidae family. It has a large diversity of species and different ecological functions allowing classifying them into functional groups, where each one shows behavior and preference for food and habitat. A genus often found in urban areas is *Camponotus*, commonly known as carpenter ant. Among the ants, it is the largest genus in number of species, harboring 200 species only in the Neotropical Region. Due to its hiperdiversity and being a polymorphic group, obstacles in taxonomic identification are found frequently. In these cases, molecular methods have proved to be valuable tools for distinguishing and identifying the specimens. The aim of this study was to verify the richness of the *Camponotus* genus in two green areas of São Paulo city with different urbanization profiles (Horto Florestal and Instituto Biológico), using traditional and molecular methods for the identification of specimens collected actively or by luminous trap. Morphological identification was performed by dichotomous keys and through comparison with specimens deposited at official collections. Molecular analyzes involved sequencing of a fragment of the mitochondrial cytochrome oxidase I gene and EPIC (exon-primed intron-crossing) markers. The identification based on morphology resulted in nine species and seven morphospecies in the two collection sites. The Horto Florestal housed a larger richness species due to this site being closer to a remnant of the Atlantic Forest. Sequences of COI gene from alate specimens allowed correlating them to their respective workers. Phylogenetic analysis

indicated the occurrence of cryptic species of *C. balzani* and *C. atriceps*, with wide genetic divergence. EPIC marker ant.1281 confirmed the main results obtained with the COI gene but showed higher intraspecific variability and it is suitable for population studies. The results indicate that urban green areas are home to a significant richness of species of this genus and help to maintain local diversity.

Keywords: species richness, COI, identification, carpenter ant, cryptic specie

**LISTAS DE TABELAS**

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1. Espécies de formigas do gênero <i>Camponotus</i> capturadas em armadilha luminosa e por coleta ativa no Instituto Biológico e no Horto Florestal, no período de janeiro de 2014 a janeiro de 2015. .... | 22 |
| Tabela 2. Espécies de formigas do gênero <i>Camponotus</i> coletadas no Instituto Biológico e no Horto Florestal no período de janeiro de 2014 a janeiro de 2015. ....  | 23 |
| Tabela 3. Espécies do gênero <i>Camponotus</i> encontradas em três levantamentos realizados em áreas urbanas em diferentes estados do Brasil .....  | 24 |
| Tabela 4. Matriz de divergência genética (%) entre espécimes de <i>C. balzani</i> . ....  | 32 |
| Tabela 5. Matriz de divergência genética (%) entre espécimes de <i>C. atriceps</i> .....  | 35 |
| Tabela 6. Matriz de divergência genética (%) entre espécimes de <i>C. rufipes</i> e <i>C. renggeri</i> . ....   | 36 |

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Instituto Biológico de São Paulo, localizado próximo ao Parque do Ibirapuera, região central da cidade de São Paulo. .... 13
- Figura 2. Parque Estadual Alberto Löfgren (Horto Florestal - SP), localizado próximo à Serra da Cantareira, na Zona Norte da cidade de São Paulo.. .... 14
- Figura 3. Árvore filogenética construída pelo método de Neighbor Joining com base nos valores de divergência calculados pelo método de Kimura 2-Parameter para as sequências do gene COI de espécimes de *Camponotus*. *Formica fusca* foi utilizada como grupo externo para enraizamento da árvore. Espécimes indicados por círculo preenchido são alados. .... 28
- Figura 4. Árvore filogenética construída pelo método de Máxima Verossimilhança com base nos valores de divergência calculados pelo modelo GTR+G+I para as sequências do gene COI de espécimes de *Camponotus*. *Formica fusca* foi utilizada como grupo externo para enraizamento da árvore. Espécimes indicados por círculo preenchido são alados. .... 29
- Figura 5. Árvore filogenética construída pelo método de Neighbor Joining com base nos valores de divergência calculados pelo método de Kimura 2-Parameter, com gaps eliminados após comparação de sequências pareadas, para as sequências do marcador EPIC ant.1281 de espécimes de *Camponotus*. Espécimes indicados por círculo preenchido são alados. .... 30
- Figura 6. Árvore filogenética construída por inferência Bayesiana para as sequências do marcador EPIC ant.1281 de espécimes de *Camponotus* e com os gaps codificados em matriz de ausência/presença segundo Simmons e Ochoterena (2000). Os números junto aos ramos indicam a probabilidade posterior..... 31
- Figura 7. Comparação morfológica entre espécimes de *C.balzani*, dispostas em clados distintos na árvore filogenética..... 32
- Figura 8. Operárias menores de *C. atriceps* espécimes CE01 e IB05. A e C – fotos das cabeças, B e D – vista dorsal..... 33
- Figura 9. Operárias maiores de *C. atriceps* espécimes SP02 e NZP01. A e C – fotos das cabeças, B e D – vista dorsal..... 34
- Figura 10. Vistas laterais de (A) – *C. renggeri* RC01 e (B) – *C. rufipes* MG01 ..... 36

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| RESUMO.....   | VI |
| LISTAS DE TABELAS .....   | X  |
| LISTA DE FIGURAS .....  | XI |
| 1 INTRODUÇÃO.....   | 1  |
| 2 OBJETIVOS .....   | 3  |
| 2.1 Objetivo geral.....   | 3  |
| 2.2 Objetivos específicos.....  | 3  |
| 3 REVISÃO DE LITERATURA .....   | 4  |
| 3.1 Ecologia de áreas verdes urbanas.....   | 4  |
| 3.2 Uso de formigas como bioindicadores e sua diversidade em áreas verdes.....                                    | 5  |
| 3.3 O gênero <i>Camponotus</i> .....  | 6  |
| 3.4 Emprego de ferramentas moleculares para a identificação de espécies biológicas.....                           | 7  |
| 3.5 Identificação morfológica e molecular de formigas do gênero <i>Camponotus</i> ...                             | 9  |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS .....  | 13 |
| 4.1 Áreas de estudo.....  | 13 |
| 4.2 Coleta de formigas .....  | 15 |
| 4.3 Identificação morfológica .....   | 16 |
| 4.4 Extração de DNA.....  | 16 |
| 4.5 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) .....  | 17 |
| 4.6 Purificação dos produtos de PCR .....   | 18 |
| 4.7 Sequenciamento de DNA.....  | 18 |
| 4.8 Análises filogenéticas .....  | 19 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....  | 21 |
| 5.1 Espécimes de <i>Camponotus</i> coletadas.....   | 21 |
| 5.2 Identificação molecular e análise filogenética dos espécimes de <i>Camponotus</i> utilizando o gene COI ..... | 25 |
| 5.3 Análise filogenética de espécimes de <i>Camponotus</i> utilizando marcadores EPIC .....                       | 26 |
| 5.4 Espécies crípticas em <i>Camponotus</i> .....   | 32 |
| 5.5 <i>C. renggeri</i> e <i>C. rufipes</i> : uma ou duas espécies? .....  | 35 |
| 6 CONCLUSÕES.....   | 37 |
| 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....  | 38 |

## 1 INTRODUÇÃO

Estudos em ambientes urbanos têm demonstrado grande importância de áreas verdes, pois auxiliam na redução da poluição sonora e do ar, estabelecem um microclima, amenizam altas temperaturas promovidas pelo excesso de áreas cinzas (asfalto e prédios), reduzem a intensidade dos ventos, absorvem águas pluviais e também cumprem uma função paisagística (MARTINS et al., 2007). Também abrigam parcela da fauna e flora locais, o que, devido ao crescente processo de urbanização, demanda aumenta o número de estudos sobre a qualidade destes ambientes (MCINTYRE et al., 2001).

O conhecimento da diversidade biológica permite avaliar a condição de um determinado ambiente e como os fatores antrópicos a afeta. A utilização de organismos bioindicadores auxilia neste desafio, pois mínimas alterações do ambiente interferem a composição de suas comunidades (MORINI et al., 2007).

Um grupo muito utilizado como bioindicador é o das formigas, por apresentar grande diversidade de espécies, ser facilmente coletados, ser um táxon conhecido e por sua identificação ser de relativa facilidade. Formigas são agrupadas por suas funções ecológicas, formando grupos funcionais ou guildas (SILVESTRE; SILVA, 2001).

Um gênero muito encontrado em áreas verdes urbanas é *Camponotus*, popularmente conhecidos como formiga-carpinteira por nidificar em troncos de árvores vivas ou mortas. É um gênero hiperdiverso, abrigando em torno de 1.500 espécies identificadas com um total de 200 espécies apenas para a Região Neotropical. Por ser um grupo altamente polimórfico, a identificação morfológica é de difícil execução, pois as chaves taxonômicas são geralmente baseadas em operárias maiores (soldados) (DASH, 2004).

Ferramentas moleculares têm auxiliado em estudos taxonômicos dos mais diversos grupos de seres vivos (JINBO; KATO; ITO, 2011). Uma metodologia amplamente utilizada é o sequenciamento do gene mitocondrial codificador da enzima citocromo oxidase I (COI), empregando-o como um código de barras (*barcode*) para a identificação de espécies e a realização de inferências filogenéticas (HEBERT et al, 2003). Em ambientes megadiversos, comumente encontrados na Região Neotropical, a utilização do código de barras permite uma avaliação mais rápida da diversidade de espécies de uma determinada comunidade, previamente à sua identificação morfológica que demanda estudos detalhados e demorados realizados por escassos pesquisadores especializados nos táxons envolvidos (SMITH et al, 2005; SMITH et al., 2013).

Espécimes alados de formigas são pouco utilizados em levantamentos de biodiversidade devido às dificuldades na sua identificação. Entretanto, a captura destes

espécimes por meio de diferentes tipos de armadilhas pode resultar em um levantamento mais abrangente da diversidade de um determinado ambiente quando comparado com a captura de operárias somente. O sequenciamento de DNA auxilia na correta identificação destes alados pela comparação com sequências obtidas para operárias devidamente identificadas morfológicamente (WARD, 2007).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a diversidade de formigas do gênero *Camponotus* em duas áreas verdes do município de São Paulo com perfis de urbanização distintos, empregando métodos tradicionais baseados na morfologia e métodos moleculares baseados no sequenciamento de DNA.

### 2.2 Objetivos específicos

- Identificar alados e operárias de formigas do gênero *Camponotus* coletados no Horto Florestal e Instituto Biológico, por meio de chaves dicotômicas e por comparação com espécimes depositados em coleções oficiais.

- Sequenciar fragmento do gene codificador da citocromo oxidase I (COI) mitocondrial dos espécimes coletados e verificar a correspondência entre os agrupamentos genéticos e a identificação morfológica

- Sequenciar marcadores nucleares do tipo EPIC (exon-primed intron-crossing) de espécimes representativos dos agrupamentos obtidos pelo gene COI e comparar as inferências genéticas obtidas com ambos marcadores

- Identificar espécimes alados pela comparação com sequências obtidas de operárias identificadas morfológicamente

- Comparar a riqueza de espécies nos dois locais de coleta

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Ecologia de áreas verdes urbanas

Os ecossistemas urbanos são marcados por intensa atividade e considerados como uma das maiores ameaças à biodiversidade pela homogeneização biótica (MCINTYRE et al., 2001; MCKINNEY, 2002). Essa perturbação criada pela urbanização destrói o habitat de uma grande variedade de espécies endêmicas e muitas vezes cria um habitat atraente para espécies capazes de se adaptar às condições urbanas (MCKINNEY; LOCKWOOD, 1999). O estudo dos processos ecológicos em ambientes urbanos é um campo de pesquisas ainda pouco explorado (MARTIN et al., 2015; SAVAGE et al., 2015)

As áreas verdes são componentes importantes dos ecossistemas urbanos, além da função paisagística, proporcionam inúmeros benefícios à população, tais como: redução da poluição do ar devido aos processos de oxigenação, diminuição da poluição sonora, diminuição das temperaturas extremas, redução na velocidade dos ventos, sombreamento, abrigo à fauna existente, influência no balanço hídrico, etc.

As áreas verdes urbanas abrangem os jardins públicos, as praças, os parques, complexos recreativos e esportivos, cemitérios, e outras áreas que podem ser classificadas em três categorias: (i) Urbanas privadas e semi-públicas – fazendo parte desta categoria os jardins residenciais, hortos urbanos. (ii) Urbanas públicas – onde estão inclusos os parques urbanos, as praças, complexos recreativos e esportivos, jardim botânico e zoológico, cemitérios, entre outros; (iii) Sub-Urbanas – tendo como exemplo nesta categoria os cinturões verdes (BENINI; MARTIN, 2011; MARTINS et al., 2011).

Uma forma de avaliar o papel das áreas verdes no ecossistema urbano é conhecendo a biodiversidade que ali está abrigada. O estudo das espécies não é uma tarefa fácil, pois exige metodologias variadas de coleta, *expertise* em taxonomia de diferentes grupos de seres vivos, além de mão-de-obra e tempo para os levantamentos (RIBAS et al., 2007).

Selecionar organismos bioindicadores, ou seja, espécies, grupos de espécies ou comunidades biológicas cujas presenças, abundância e condições são indicativas de uma determinada condição ambiental, é importante para correlacionar um determinado fator antrópico ou um fator natural com seu potencial impactante. Os bioindicadores permitem avaliar a integridade ecológica, definida como a condição de “saúde” de uma área, feita pela comparação da estrutura e função de uma comunidade biológica entre uma área impactada e áreas de referência (CALLISTO; GONÇALVES JR; MORENO, 2005)

Mcintyre (2000) considera que o uso de artrópodes como bioindicadores para o estudo dos efeitos da urbanização é uma escolha lógica por cinco razões: (1) são diversificados e fornecem um instantâneo da diversidade biológica total da área; (2) o tempo de geração relativamente curto implica que podem responder rapidamente a mudanças antropogênicas no solo ou vegetação; (3) são razoavelmente fáceis de amostrar e o público em geral não costuma se opor à coleta de artrópodes, ao contrário da coleta de vertebrados; (4) representam um espectro de níveis tróficos; e (5) podem ser componentes sociológicos, agrônômicos ou econômicos importantes de habitats alterados pelo homem.

### 3.2 Uso de formigas como bioindicadores e sua diversidade em áreas verdes

As formigas constituem um grupo com grande aptidão para atuarem como bioindicadores em programas de monitoramento ambiental. As características favoráveis deste grupo são: elevada abundância e diversidade, dominância ecológica e amostragem e identificação relativamente fáceis (AGOSTI; SCHULTZ; MAJER, 2000; FONSECA; DIEHL, 2004; RIBAS et al., 2007; UNDERWOOD; FISHER, 2006)

Como exemplos de impactos ambientais ou de ações para sua remediação monitorados utilizando-se formigas, podem ser citados: recuperação após atividades de mineração (OTTONETTI; TUCCI; SANTINI, 2006; VALENTIM, 2010), danos por queimada (BOSCARDIN et al., 2014), poluição industrial (NUMMELIN et al., 2007), agroecologia (SANTOS; ALEGRE; MULINA, 2007), práticas agrícolas (GÓMEZ et al., 2003), retirada de vegetação (DUNN, 2004) e outros usos da terra (SCHNELL; PIK; DANGERFIELD, 2003). Apesar da existência de extensa literatura sobre o uso de formigas como bioindicadoras, os mecanismos de resposta às diversas condições estudadas são pouco conhecidos. Frequentemente, somente um parâmetro da comunidade é analisado, como a riqueza de espécies, por exemplo, limitando o uso desta técnica à descrição das respostas das comunidades, impedindo generalizações e avanços no entendimento dos processos que causam as respostas observadas (RIBAS et al. 2007).

Estudos sobre a diversidade de formigas que ocorrem em áreas verdes urbanas no Brasil têm demonstrado a sua importância como repositórios da biodiversidade regional (ESTRADA et al., 2014; LUTINSKI et al., 2013; RIBEIRO et al., 2012; SOARES, 2005; SOARES et al., 2006). Na região urbana de Uberlândia, MG, foi constatada a presença de 14 espécies de formigas, predominando os gêneros *Camponotus*, *Monomorium* e *Tapinoma* (SOARES et al., 2006). Em estudo comparativo de dois métodos de coleta, *pitfall* e extrator de Winkler, em área verde na cidade de São Paulo, SP, foram constatadas 36 espécies com predominância de *Wasmannia auropunctata*, seguida de formigas dos gêneros *Pheidole* e *Solenopsis* (RIBEIRO et al., 2012). Em parques e praças do município de Três Rios, RJ, foram

coletadas 26 espécies de formigas no solo e 37 nas árvores, com predominância de espécies dos gêneros *Camponotus*, *Pheidole* e *Pseudomyrmex* (ESTRADA et al., 2014). Em dez municípios do estado de Santa Catarina, com populações variando de 10.000 a 180.000 habitantes, foram encontradas 140 espécies de formigas, tendo os gêneros *Camponotus*, *Pheidole*, *Solenopsis*, *Crematogaster* e *Acromyrmex* apresentado os maiores valores de riqueza de espécies (LUTINSKI et al., 2013). A maior diversidade de formigas observada no estudo realizado em SC pode ser explicada pelo maior número de municípios envolvidos, inclusão de fragmentos florestais e maior esforço de coleta. Constata-se também que o gênero *Camponotus*, objeto de estudo do presente trabalho, apresenta ampla distribuição em áreas verdes urbanas em diferentes regiões do Brasil.

### 3.3 O gênero *Camponotus*

*Camponotus* é um gênero pertencente à subfamília Formicinae, encontrado em uma grande variedade de habitats, incluindo áreas urbanas, com cerca de 1500 espécies no mundo, dentre as quais 200 espécies ocorrendo na Região Neotropical (DASH, 2004).

A maioria das espécies do gênero *Camponotus* é arborícola, forrageiam principalmente no período noturno, possuem hábito alimentar generalista e procuram por carboidratos e proteínas (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Podem proteger insetos sugadores de seiva em troca de *honeydew* (substância eliminada por pulgões, cochonilhas e cigarrinhas oriunda da seiva vegetal ingerida). Formigas deste gênero podem ser observadas em nectários extraflorais (JUNQUEIRA; DIEHL; DIEHL-FLEIG, 2001), podendo atuar na polinização de algumas espécies de plantas (GÓMEZ et al., 1996). São chamadas de formigas carpinteiras devido à sua preferência por nidificar em madeira morta, em decomposição ou que possuam antigas galerias de cupins. Porém, o dano dessas formigas é limitado, pois não se alimentam da madeira (JACKMAN; DREES, 1998).

As colônias em áreas internas são muitas vezes localizadas em fissuras e fendas, mas podem também construir túneis na madeira para formar galerias de nidificação. Espécies menores geralmente forrageiam durante o dia e apresentam coloração preta ou muito escura, enquanto as espécies maiores são frequentemente noturnas, com coloração marrom avermelhada clara para amarela (LONGINO, 2002).

Dentro de residências, algumas espécies como *Camponotus atriceps* e *Camponotus balzani* podem nidificar em aparelhos eletrônicos tais como: impressoras, computadores, estabilizadores, fax entre outros. Demonstrem preferência por material celulósico como batentes, vigas de madeira, rodapés, azulejos e etc. Causam incômodo por sua presença

indesejada e, no caso de algumas espécies, serem altamente agressivas (CAMPOS-FARINHA, 1995).

### **3.4 Emprego de ferramentas moleculares para a identificação de espécies biológicas**

O Conceito Biológico de Espécie (CBE) definido por Mayr, (1942) é caracterizado por um grupo de organismos ou uma população isolada reprodutivamente de outros grupos ou populações. A capacidade de grupos de organismos e/ou populações se entrecruzar e deixar descendentes férteis ou não, tornou-se um fundamento chave para definir limites interespecíficos (ALEIXO, 2007). Populações que permanecerem separadas geograficamente, mas conservarem a capacidade de se entrecruzar e gerar proles férteis a partir de um contato ocasional são consideradas populações de uma mesma espécie, independente se houver outras diferenças entre elas (ALEIXO, 2007). Por outro lado, populações diferenciadas e com um histórico de evolução independente, mesmo que recente, das outras populações relacionadas filogeneticamente são consideradas espécies distintas pelo Conceito Filogenético de Espécie (CFE), enquanto o CBE as trata apenas como subespécies integrantes de uma única espécie (ALEIXO, 2009)-

O CFE se baseia na ideia de que a taxonomia deve refletir a história evolutiva dos organismos e as espécies devem ser delimitadas com base em filogenias. se utiliza da ideia de divergência evolutiva que ocorre quando espécies com grau de parentesco próximo, ou seja, semelhantes geneticamente, divergem para ambientes distintos e com o tempo, devido à seleção natural, passam a apresentar características diferentes. Desta forma, espécies aparentemente diferentes podem ser geneticamente muito semelhantes. Por outro lado, a convergência evolutiva faz com que existam espécies morfológicamente semelhantes, com grau de parentesco distante, que convivam em um mesmo habitat. A seleção exercida pelo ambiente molda, ao longo das gerações, espécies filogeneticamente distintas a convergirem para formas semelhantes.

Tanto a divergência como a convergência evolutivas podem resultar na ocorrência de espécies crípticas, que são definidas por Seifert (2009), como duas ou mais espécies que não são separáveis por percepção visual ou acústica primária (no caso de pássaros, por exemplo) de um especialista, ou seja, as espécies não são separáveis com segurança por meio das vias inatas do sistema cognitivo humano. Em vez disso, sua identificação confiável requer a aplicação de métodos elaborados como análise de DNA ou bioquímica. A divergência evolutiva entre duas espécies pode não ser observável externamente em casos de retenção da morfologia ancestral, o mesmo podendo ocorrer em casos de convergência adaptativa de duas espécies geneticamente distintas.

Segundo De Queiroz (1998), tanto o CBE quanto o CFE são variações de um único “conceito” de espécie, pois subentendem que as espécies são segmentos de linhagens evolutivas de nível populacional. A diferença estaria no “critério” utilizado para determinar em que ponto do processo de divergência (cladogênese), duas linhagens poderiam ser consideradas espécies distintas. Assim, de Queiroz propõe que CBE e CFE constituem somente critérios distintos e alternativos de um mesmo conceito unificado de espécie batizado por ele de “*General Lineage Species Concept*” ou Conceito Filético Geral de Espécie (CFGE) (ALEIXO, 2007). O CFGE adota dois critérios para distinguir espécies: a existência de características diagnosticáveis e a monofilia (independência evolutiva em relação a outras populações).

Uma das formas para determinar a identidade dos organismos é estreitar as relações da taxonomia com outras áreas do saber, tornando-a integrativa. A taxonomia Integrativa propõe delimitar a “espécie” sob perspectivas múltiplas e complementares, tais como morfologia comparativa, filogeografia, genética, ecologia, comportamento, entre outros (DAYRAT, 2005).

Dentre estas perspectivas, a genética tem recebido grande ênfase como estratégia para a descoberta de caracteres diagnósticos para a separação de espécies. O emprego de ferramentas moleculares levou à criação do termo Unidade Taxonômica Operacional Molecular (MOTU – *Molecular Operational Taxonomic Unit*), que são taxa gerados pelo agrupamento de espécimes através de sequências de DNA, podendo também ser denominadas como filotipos ou genoespécies (BLAXTER, 2004). Alguns dados ecológicos podem ser inferidos pelos dados moleculares de forma a complementar os índices de biodiversidade clássicos tais como: riquezas de espécies, índice de Simpson e índice Shannon (VALENTINI; POMPANON; TABERLET, 2009). Dessa forma, MOTU podem ser utilizados para rapidamente caracterizar a diversidade de espécies de um determinado ambiente, mesmo na ausência de um taxonomista especializado que possa identificar os espécimes pelos métodos tradicionais. Em vista da escassez destes especialistas e da urgência da caracterização da diversidade de seres vivos em ambientes que estão sofrendo rápida degradação, a utilização de MOTU é de grande valia em estudos ecológicos.

Um exemplo da eficiência do emprego de MOTU foi demonstrado em trabalho realizado em quatro localidades na ilha de Madagascar (SMITH; FISHER; HEBERT, 2005). Padrões de riqueza de formigas medidos por meio de MOTU e por separação de morfoespécies não apresentaram diferenças significativas entre si. Entretanto, a utilização de métodos baseados em sequências apresentou tendência a gerar valores maiores de riqueza e índices de similaridade significativamente menores entre localidades. Em alguns casos onde uma morfoespécie abrangeu grupos moleculares distintos, foi observada divergência média de 16% nas sequências, apontando para espécies que necessitam estudos mais aprofundados de genética, morfologia, ciclo de vida e comportamento (SMITH et al. 2005). Na maioria dos

casos, os caracteres fenotípicos utilizados na classificação taxonômica de seres vivos não refletem o mesmo nível de diferenciação como os marcadores genéticos (GOODMAN et al., 2009).

De interesse particular em estudos entomológicos, o sequenciamento de DNA permite a identificação de espécimes independentemente da fase de vida em que se encontram (ovo, larva, juvenis e adultos) e, no caso de formigas, a associação de adultos alados com as respectivas operárias, sendo estas últimas as mais utilizadas para a identificação morfológica das espécies (WARD, 2007).

### **3.5 Identificação morfológica e molecular de formigas do gênero *Camponotus***

A identificação das espécies do gênero *Camponotus* é uma das mais difíceis dentre os gêneros do Novo Mundo, sendo realizada principalmente pelas operárias máximas (soldados). Entretanto, há um grande número de espécies com características morfológicamente difíceis de definir, que podem variar dentro de um complexo de espécies ou na mesma espécie, além da presença de vários subgêneros mal definidos (MACKAY; MACKAY, 2004). As espécies do gênero *Camponotus* são geralmente polimórficas ou dimórficas, mas as chaves taxonômicas são baseadas principalmente nas operárias máximas, embora na Austrália a descrição das operárias menores é mais útil devido à maior facilidade de captura (MCARTHUR, 2007 e 2008). Existem poucas chaves taxonômicas disponíveis para a identificação de espécies de *Camponotus* da Região Neotropical.

A frequente utilização das operárias em trabalhos de taxonomia e sistemática se deve pela facilidade de serem coletadas, enquanto a coleta de reprodutores (alados) é dificultada por fatores fenológicos e pela necessidade de armadilhas especiais (KASPARI et al., 2001). Sendo assim, são poucas as espécies identificadas que possuem alados depositados em coleções. A coleta de alados permite a detecção de espécies em um determinado ambiente que pode ser de difícil captura pelos outros métodos de levantamento, como espécies hipogéicas, por exemplo, caracterizando melhor a diversidade de formigas no local de estudo.

Diversas ferramentas de biologia molecular têm sido utilizadas para estudos de sistemática, filogenia e de populações de formigas do gênero *Camponotus*. Dentre elas podemos citar a técnica de RAPD (*random amplified polymorphic DNA*), análise de microssatélites e o sequenciamento do gene da citocromo oxidase I ou código de barras de DNA (GOODISMAN; HAHN, 2004; GOODISMAN et al., 2005; MATTA; MORINI; HILSDORF, 2013; GADAU; BRADY; WARD, 1999; BRADY; GADAU; WARD, 2000; ).

A diversidade genética em espécies de *Camponotus* pode ser demonstrada através da análise molecular de microssatélites. Estes segmentos de DNA repetitivo apresentam grande polimorfismo entre populações da mesma espécie e constituem uma ferramenta valiosa para estudos de estruturas genética e social e sistemas de acasalamento em espécies de formigas. Através destes marcadores moleculares foi observado que a estrutura social de ninhos de *Camponotus ocreatus*, estudados em área natural no estado do Arizona, EUA, é normalmente caracterizada pela monoginia (uma única rainha fértil por ninho), porém a poliginia (duas ou mais rainhas férteis por ninho) também foi detectada em uma minoria de ninhos avaliados (1 em 15) (GOODISMAN; HAHN, 2004). Utilizando a mesma ferramenta, observou-se que diferentes formas do complexo de espécies de formiga carpinteira do deserto, *C. festinatus*, possuem o mesmo sistema social (poliginia e polidomia), mas são geneticamente isoladas. (GOODISMAN et al., 2005).

Outra ferramenta que pode ser útil na análise da variabilidade genética de formigas é o RAPD. Trabalho que utilizou essa ferramenta verificou que ninhos próximos entre si de formigas carpinteiras da espécie *Camponotus rufipes* apresentam baixa diferenciação genética, sugerindo que as colônias são monogínicas e que ninhos formados por rainhas geneticamente relacionadas tendem a ser formados em locais próximos (MATTA; MORINI; HILSDORF, 2013).

Sequenciamento de um trecho de 385 pb do gene mitocondrial codificador da citocromo oxidase I (COI), utilizando 45 espécimes do gênero *Camponotus* e dos gêneros relacionados *Polyrhachis* e *Dendromyrmex*, constatou uma monofilia dos três gêneros estudados e uma possível polifilia dentre as espécies de *Camponotus*, que não pôde ser confirmada estatisticamente (BRADY; GADAU; WARD, 2000). Sequenciamento do mesmo gene de uma espécie endêmica da Califórnia, *Camponotus quercicola*, permitiu chegar à conclusão que esta não pertence ao clado de *C. herculeanus*, conforme se acreditava anteriormente (GADAU; BRADY; WARD, 1999).

O gene mitocondrial COI tem sido amplamente utilizado como código de barras universal (*barcode*) para a identificação de espécies (HEBERT; RATNASINGHAM; DE WAARD, 2003). O banco de dados GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)) têm sido largamente usado em comparações de sequências, no entanto, por ser uma base de dados aberta, apresenta frequentemente erros de identificação. A sua utilização requer um trabalho criterioso de triagem das sequências com base na qualificação dos depositantes, experiência do grupo de pesquisa responsável pelo depósito, publicação de artigo científico associado às sequências e preservação de espécimes em coleções oficiais.

Uma questão fundamental quando se utiliza o sequenciamento do gene COI para a distinção de espécies é qual o limite de divergência que separa uma espécie de outra. Essa distância genética que separaria as espécies tem sido denominada “intervalo do código de barras de DNA” (*DNA barcode gap*). Para que esse intervalo efetivamente exista, a distância

genética média intraespecífica deve ser consistentemente menor que a interespecífica. Na literatura, tanto estudos que suportam como os que negam a existência do intervalo podem ser encontrados em abundância (HEBERT; RATNASINGHAM; DE WAARD, 2003; HEBERT et al., 2004; SMITH; FISHER; HEBERT, 2005; WIEMERS; FIEDLER, 2007; MEIER et al., 2006). Em um estudo sobre espécies de lepidópteros determinou-se que divergência de 3% entre as sequências era capaz de revelar 98% das espécies identificadas pela taxonomia morfológica convencional (HEBERT; RATNASINGHAM; DE WAARD, 2003). Para pássaros, verificou-se que um valor de 2,7%, era capaz de revelar 90% de um total de 260 espécies da América do Norte (HEBERT et al., 2004). Estudos sobre formigas na América do Norte mostraram que a divergência média intraespecífica foi de 1,9%, indicando que a utilização de um limite entre 2 e 3% seria apropriado para a separação de espécies (SMITH, et al. 2005 citado por SMITH; FISHER; HEBERT, 2005). Meier et al. (2006) e Wiemers e Fieldler (2007), estudando dípteros e lepidópteros, respectivamente, observaram sobreposição na amplitude das distâncias genéticas intra e interespecíficas, resultando em identificações errôneas com base nas sequências.

Apesar de seu relevante papel na identificação de espécies, a análise de código de barras não substitui um estudo taxonômico amplo. Portanto, quando algum espécime desconhecido não apresentar uma estreita correspondência com os registros existentes na biblioteca de código de barras, isto não o qualifica para designação como uma nova espécie. Ao invés disso, estes espécimes podem ser selecionados para uma análise taxonômica mais aprofundada, com grande potencial para a descoberta de novas espécies. Em grupos ainda pouco estudados, o código de barras pode rapidamente separar os espécimes em grupos geneticamente divergentes, antes mesmo da execução do estudo taxonômico convencional (HAJIBABAEI et al., 2007).

Com relação a marcadores moleculares, outro aspecto a ser destacado é que a utilização de somente um marcador genético de herança uniparental como o gene COI mitocondrial pode gerar, em alguns casos, uma árvore filogenética pouco representativa devido à ação preferencial de mecanismos seletivos sobre as mitocôndrias como a introgressão e varreduras seletivas (AVISE, 2000; WIENS; KUCZYNSKI; STEPHENS, 2010).

Uma forma de complementar as informações obtidas com o gene COI é a utilização de marcadores nucleares, como os genes housekeeping e regiões intrônicas de genes conservados. Em insetos, os marcadores nucleares do tipo EPIC (*Exon-primed intron-crossing*), apesar de ainda pouco utilizados, são promissores (STRÖHER et al., 2013). Nestes marcadores, um par de *primers* é desenvolvido de forma a se anelar em regiões conservadas de éxons consecutivos de um gene, amplificando a região intrônica que separa esses éxons e apresenta uma maior taxa de mutação que as regiões codificadoras (LI; RIETHOVEN; MA, 2010). Para formigas, 15 marcadores EPIC foram desenvolvidos através da análise dos

genomas nucleares completos de *Harpegnathos saltator* (Ponerinae), *Linepithema humile* (Dolichoderinae), *Camponotus floridanus* (Formicinae), *Solenopsis invicta* (Myrmicinae), *Pogonomyrmex barbatus* (Myrmicinae) e *Atta cephalotes* (Myrmicinae) (STRÖHER et al., 2013). A identidade observada para estes marcadores nesse conjunto de formigas variou de 93,5% a 97%. Os marcadores foram avaliados experimentalmente para as espécies *Gnamptogenys striatula* (Ectatomminae), *Hylomyrma reitteri* (Myrmicinae), *Brachymyrmex* sp. (Formicinae), *Pheidole incisa* (Myrmicinae) e *Linepithema* sp. (Dolichoderinae), tendo sido possível amplificá-los em todos os casos. Para quatro amostras de *G. striatula* originárias de diferentes estados brasileiros, a identidade encontrada para seis destes marcadores variou de 91,1% a 99,78%. Concluiu-se que estes marcadores poderiam ser úteis para estudos filogeográficos e filogenéticos de formigas de uma forma geral (STRÖHER et al., 2013).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Áreas de estudo

O estudo foi conduzido em duas regiões na cidade de São Paulo, o primeiro ponto amostral foi no Instituto Biológico de São Paulo ( $23^{\circ}35'19.2''S$   $46^{\circ}38'54.5''W$ ), próximo ao Parque do Ibirapuera (Figura 1). O Instituto possui uma área 122.918.00 m<sup>2</sup> no total e 28.760.00 m<sup>2</sup> de área construída, abriga um cafezal urbano ocupando 10.000 m<sup>2</sup> com cerca de 1600 pés de café das variedades Catuaí e Mundo Novo. No entorno existem árvores como pau-brasil, seringueira, pau-ferro, araucária, abacate, manga, acerola, oliveira, manacá da serra, paineira, palmeiras, gerivá, goiabeira, amoreiras, jabuticabeira, cerejeiras entre outras. (HOJO, comunicação pessoal 2015).

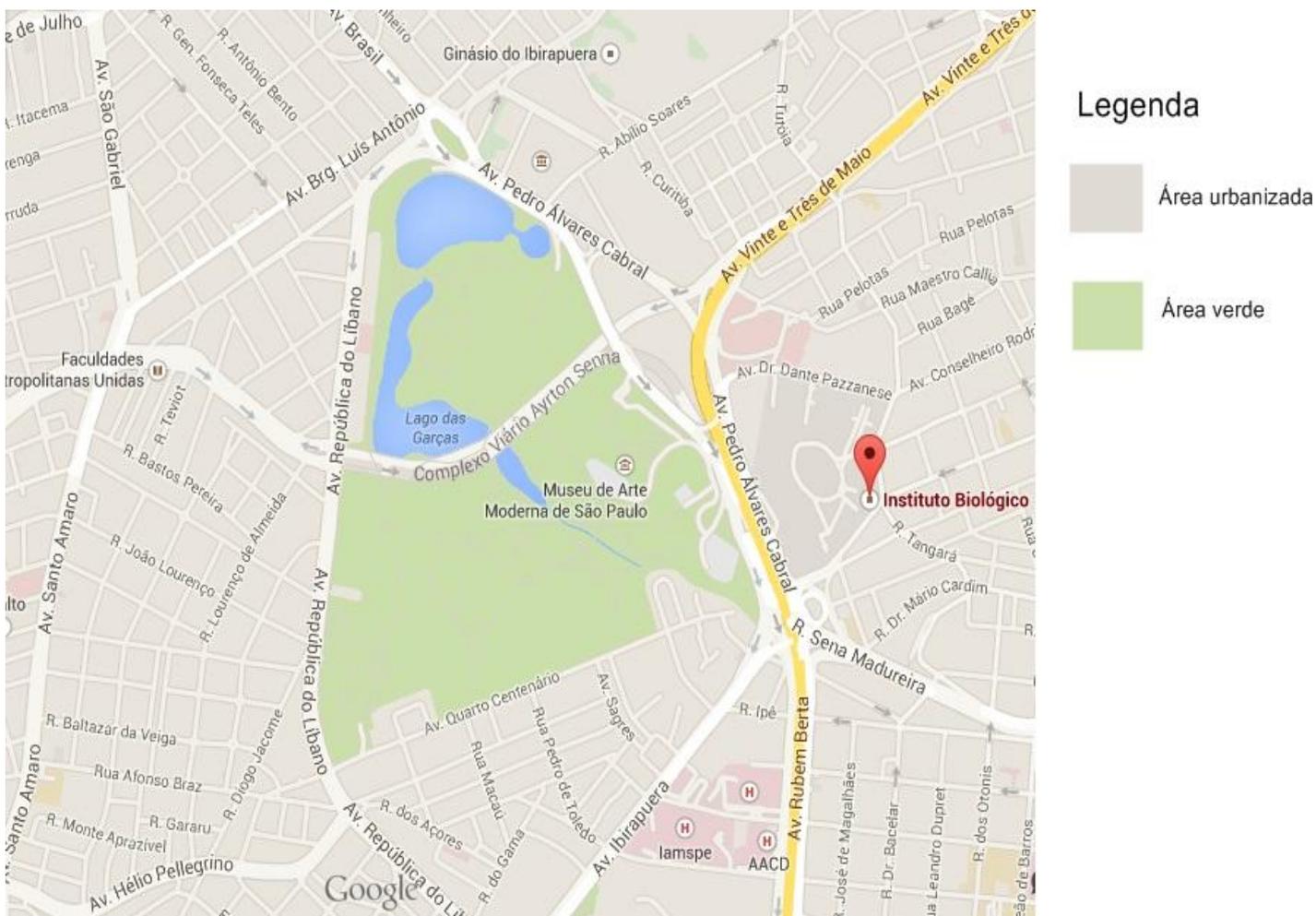
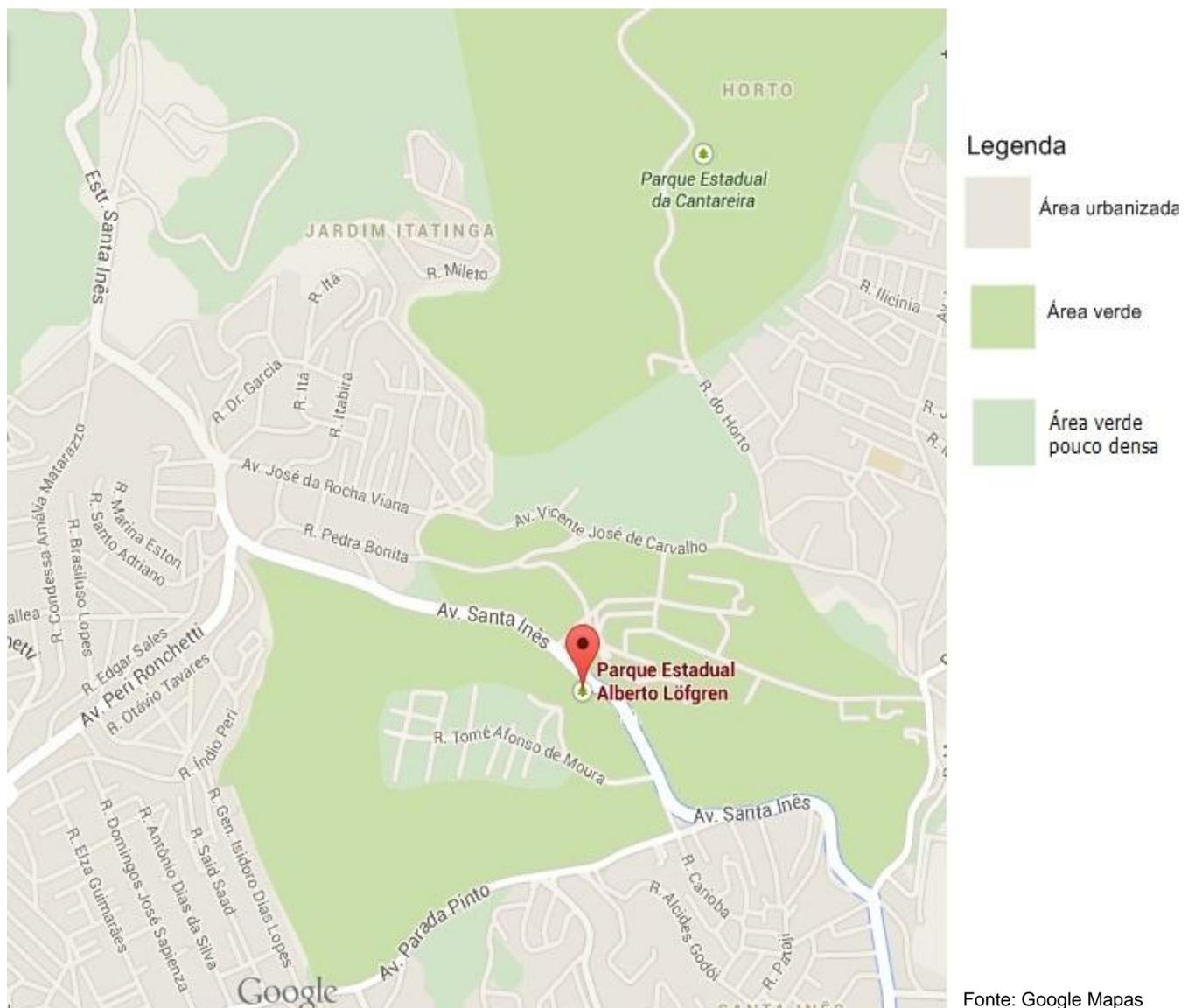


Figura 1. Instituto Biológico de São Paulo, localizado próximo ao Parque do Ibirapuera, região central da cidade de São Paulo.

As coletas no segundo ponto amostral foram realizadas no Parque Estadual Alberto Löefgren (23°27'43.8"S 46°38'13.8"W) que apresenta uma área de 174 hectares (ha), próximo à Serra da Cantareira (Figura 2). Trata-se de um grande fragmento de Mata Atlântica Floresta Ombrófila Densa/Floresta Estacional Semidecidual/Urbano (VELOSO et al.1991 ;“Instituto Florestal de São Paulo”, 2015). A flora é mesclada com arborização de espécies exóticas e nativas em arboretos ou isolada com regeneração espontânea de espécies nativas e exóticas. A vegetação anterior existente e de seu entorno é classificada como Floresta Ombrófila Densa Montana. Possui algumas espécies em extinção: Pinheiro-brasileiro, peroba-rosa, pau-marfim, pau-brasil, cambuci, cedro-rosa, cedro-do-brejo, jacarandá-da-bahia, braúna, sassafrás, imbuía, bolsa-de-pastor. A fauna abriga animais como o macaco-prego, tucano, gambá, socó, garça, tico-tico, serelepe e martim pescador. O clima é tropical úmido serrano da Cantareira. A precipitação média anual é de aproximadamente 1500 mm. A temperatura média anual é de 19,3°C (média máxima de 27,7°C e mínima de 14,4°C) (TARIFA; ARMANI; TARIFA, 2000)



**Figura 2. Parque Estadual Alberto Löfgren (Horto Florestal - SP), localizado próximo à Serra da Cantareira, na Zona Norte da cidade de São Paulo..**

Além destas duas áreas de estudo, espécimes de *Camponotus* também foram coletados esporadicamente em outras localidades na cidade de São Paulo - SP, Campinas – SP, Guarulhos – SP, Nazaré Paulista – SP, Rio Claro – SP, Sorocaba – SP, Andradas – MG, Uberlândia – MG, Curitiba – PR e Fortaleza – CE. Estas coletas visaram aumentar a diversidade de espécimes estudados e permitir uma melhor caracterização da variabilidade intraespecífica de alguns grupos.

#### **4.2 Coleta de formigas**

As formigas foram coletadas com armadilhas luminosas e coletas ativas. Armadilhas de luz modelo “Luiz de Queiroz” equipada com lâmpada “Blackblue” capturam espécimes em voos nupciais noturnos e foram penduradas em árvores a 5 m de altura. Os locais de amostragem foram: Parque do Instituto Biológico próximo ao Laboratório de Anatomia Patológica e o Horto Florestal, próximo à área administrativa. As armadilhas luminosas estavam equipadas com fotocélulas e acendiam ao entardecer e se apagavam ao amanhecer. O período de coleta foi de fevereiro de 2014 a janeiro de 2015.

Os insetos capturados pelas armadilhas foram coletados semanalmente, levados para a Unidade Laboratorial de Referência em Pragas Urbanas para triagem e identificação. As formigas aladas foram fixadas em etanol a 70% e três exemplares de cada espécie, sendo três fêmeas e três machos, foram montados para incorporação na Coleção Entomológica Adolph Hempel (CEAH) do Instituto Biológico.

Coletas ativas foram realizadas quinzenalmente durante os meses de fevereiro a maio de 2014 e de novembro de 2014 a janeiro de 2015, sendo estas divididas em dois períodos: diurno (11h00 – 13h00) e vespertino (16h00 – 18h00), contemplando uma possibilidade maior de captura de espécies que demonstrem preferências por um dos períodos, totalizando um esforço de coleta de quatro horas. As coletas foram concentradas em solo, arbustos e árvores. A área escolhida foi repetida em todas as coletas em ambos os períodos. Os espécimes foram triados e identificados em morfoespécie para posterior identificação taxonômica e um espécime de cada morfoespécie foi reservado para os estudos moleculares. Para as morfoespécies mais frequentes, mais de um espécime foi sequenciado, procurando-se obter sequências de espécimes de diferentes origens a fim de melhor avaliar a variabilidade intraespecífica.

### 4.3 Identificação morfológica

Os espécimes foram montados em triângulo de papel e identificados com as chaves dicotômicas segundo Bolton et al. (2006). Quando a identificação não foi possível pelas chaves, os espécimes foram comparados com tipos ou holótipos depositados na Coleção Entomológica Adolph Hempel (CEAH) no Instituto Biológico e na Coleção de Hymenoptera no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo.

Para a análise das espécies crípticas foram selecionados representantes de cada clado com mesmo tamanho ou o mais próximo possível para análise de caracteres morfológicos usualmente utilizados para separação de morfoespécies. Foram observados tamanho da carena frontal, formato do clipeo, abundância de pelos na margem inferior do clipeo, número de dentes, abundância e distribuição de pelos no mesossoma, pecíolo e gáster, formato do pecíolo, comprimento do escapo entre outros. Também foram utilizadas fotos em alta resolução de espécimes depositados em coleções, incluindo espécimes tipo (CASENT0173394, CASENT0905198 disponíveis no site AntWeb) (“AntWeb”, 2015).

### 4.4 Extração de DNA

O espécime foi colocado sobre papel de filtro a fim de retirar o excesso de álcool, transferido para microtubo de 1,5 mL e submetido à secagem em centrífuga a vácuo por 5-10 minutos. O DNA genômico foi extraído utilizando-se o kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN) conforme as instruções do fabricante. Após seco, o espécime foi congelado com nitrogênio líquido e triturado com o auxílio de pistilo de plástico, a fim de fragmentar o exoesqueleto e triturar os órgãos internos. Foram acrescentados 180 µL de tampão ATL e 20 µL de proteinase K (20 mg/mL) e agitado brevemente em vortex. Os microtubos foram incubados a 56°C em banho seco com agitação por um período de 2-3 horas. Foram adicionados 200 µL de tampão AL à amostra, seguido de agitação em vortex. Foram adicionados 200 µL de etanol (96-100%) seguido de nova agitação em vortex. A mistura foi transferida para coluna contendo um filtro de sílica para retenção do DNA, a qual estava inserida em tubo de 2 mL sem tampa. As amostras foram centrifugadas a 8.000 g por 1 minuto. O filtrado foi descartado e a coluna transferida para novo tubo de 2 mL. Foram acrescentados 500 µL de tampão de lavagem AW1 seguido de centrifugação a 8.000 g por 1 minuto novamente. O filtrado foi descartado e a coluna foi transferida para novo tubo de 2 mL. Foram acrescentados 500 µL de tampão de lavagem AW2 e centrifugado a 14.000 g por 3 minutos. O filtrado foi descartado novamente e a coluna transferida para um microtubo de 1,5 mL. Foram adicionados 80 µL de tampão AE para eluição

do DNA e centrifugado a 8.000 g por 5 minutos. A coluna foi descartada e o DNA purificado foi armazenado em freezer a -20°C.

#### 4.5 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Para a amplificação de um fragmento de aproximadamente 460 pb do gene COI foi desenhado o par de iniciadores COI-F (5'-GATTTTTTGGKCA YCCMGAAG-3') e COI-R (5'-CRAATACRGCTCCTATWGATAAWAC-3'), baseado em regiões conservadas do gene em diversas espécies de artrópodes (desenvolvido no Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico).

Para a reação de PCR, foram utilizados 1 µL do DNA, 1 µL de cada iniciador a 10 µM, 10 µL de tampão 5X para PCR, 1 µL de dNTPs a 10 mM, 0,2 µL de GoTaq DNA polimerase 5U/µL (Promega) e 35,8 µL de água MilliQ estéril, volume total de 50 µL. As amplificações foram realizadas em termociclador (BIORAD-T100™ Thermal Cycler) com o seguinte programa:

- 94 °C por 2 minutos – desnaturação inicial
  - 94 °C por 15 segundos – desnaturação
  - 50 °C por 30 segundos – anelamento
  - 72 °C por 30 segundos – extensão
  - 72 °C por 4 minutos – extensão final
  - 12 °C por tempo indeterminado
- } 40 ciclos

Para verificação da amplificação do produto esperado foi realizada eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TAE, adicionado de brometo de etídeo na concentração final de 0,1 µg/mL. Para cada amostra foram aplicados 4 µL do produto amplificado adicionado de 0,4 µL de tampão de carregamento BlueJuice 10X (Life Technologies). O marcador de tamanho molecular 1 Kb DNA ladder (Life Technologies) foi utilizado para estimar o tamanho do produto amplificado. A eletroforese foi realizada a 90 V por 30 min. A imagem do gel sobre transiluminador de luz ultravioleta foi capturada em equipamento fotodocumentador digital (Alpha Innotech).

Para a amplificação dos marcadores EPIC, foram selecionados os iniciadores ant.1281-F (3'-GACGCAGGTTGYAACGAAATCAC-5') e ant.1281-R (3'-GCCRCTAATATCCAGCTTCACGAG-5'), que amplificam produto de aproximadamente 500 pares de bases e ant.346-F (3'-GTGGTCCACCATCCGKGGATCT-5') e ant.346-R (3'-GGATTGTTTTGTGTAATCTGCGTTTCG-5'), que amplificam produto de aproximadamente 400 pares de bases (STRÖHER; LI; PIE, 2013).

Ambos produtos foram amplificados utilizando as mesmas concentrações de reagentes utilizados para o gene COI e o programa a seguir:

- 94 °C por 2 minutos – desnaturação inicial
  - 94 °C por 15 segundos – desnaturação
  - 58 °C por 30 segundos – anelamento
  - 72 °C por 30 segundos – extensão
  - 72 °C por 4 minutos – extensão final
  - 12 °C por tempo indeterminado
- } 40 ciclos

#### 4.6 Purificação dos produtos de PCR

Os produtos da PCR foram purificados seguindo-se o protocolo descrito por Schmitz e Riesner (2006). Foi adicionado ao produto da PCR ( $\pm 46 \mu\text{L}$ ),  $1,6 \mu\text{L}$  de EDTA 0,5 M,  $21,0 \mu\text{L}$  de PEG a 50% e  $8,1 \mu\text{L}$  de NaCl 5 M. Após incubação em temperatura ambiente por 10 minutos, centrifugou-se durante 10 minutos a 14.000 rpm e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados  $125 \mu\text{L}$  de etanol 70%, centrifugado a 14.000 rpm por 5 min e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi seco em uma centrífuga a vácuo por 10 minutos. O DNA foi suspenso em  $30 \mu\text{L}$  água de MilliQ esterilizada.

#### 4.7 Sequenciamento de DNA

Os produtos purificados foram sequenciados pelo método de terminação de cadeia (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977).

A reação de sequenciamento foi realizada em placas de 96 poços de  $200 \mu\text{L}$  e constituiu de  $5 \mu\text{L}$  do produto da PCR purificado,  $1,5 \mu\text{L}$  de tampão de diluição 5X,  $1 \mu\text{L}$  de Big Dye 3.1 (Applied Biosystems) e  $0,32 \mu\text{L}$  de iniciador a  $10 \mu\text{M}$  e  $2,18 \mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ . O programa utilizado no termociclador T100 (BioRad) constituiu de:

- 96 °C por 60 segundo
  - 96 °C por 5 segundos
  - 50 °C por 30 segundos
  - 60 °C por 4 minutos
- } 25 ciclos

- 12 °C por tempo indeterminado

A reação de sequenciamento foi precipitada pela adição de 40 µL de isopropanol 75% em cada amostra e centrifugação a 4.000 g por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e a placa foi centrifugada invertida sobre papel toalha a 1.000 g por 1 minuto. Foram adicionados 100 µL de isopropanol 75% por amostra, o qual foi descartado em seguida. Após nova centrifugação com a placa invertida sobre papel toalha a 1.000 g por 1 minuto, a mesma foi mantida em estufa a 37°C por 30 minutos para secar. As amostras foram retomadas em 10 µL de formamida HiDi (Applied Biosystems) e desnaturadas em termociclador por 2 minutos a 95°C. As amostras foram analisadas em sequenciador capilar 3500 XL (Applied Biosystems).

As sequências obtidas foram analisadas e editadas manualmente com o uso do programa BioEdit versão 7.2.5 (HALL, 2013).

#### 4.8 Análises filogenéticas

Para uma possível identificação dos espécimes procurou-se por sequências semelhantes no GenBank através do programa Blast-n (ALTSCHUL et al., 1990). As sequências foram alinhadas empregando-se o programa ClustalW (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994).

Para as sequências do gene COI, árvore filogenética foi construída pelo método de Neighbor-Joining a partir dos valores de divergência genética calculados pelo método de Kimura 2-Parameter. Esta forma de análise tem sido utilizada na maioria dos estudos que utilizaram o código de barras de DNA, entretanto, as razões para a sua utilização não são bem fundamentadas (SRIVATHSAN; MEIER, 2012). Como alternativa, também foi construída árvore filogenética pelo método de máxima verossimilhança, selecionando-se o melhor modelo de substituição de nucleotídeos indicado pela ferramenta Find Best DNA Model do software MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013). O modelo indicado para as sequências COI foi o GTR+G+I (General Time Reversible + Gamma distribution + Invariable sites). Ambas as árvores foram submetidas ao teste de *bootstrap* com 1000 repetições. Foram incluídas sequências encontradas no GenBank que apresentavam nível de similaridade acima de 90% com as sequências dos espécimes do presente estudo. Sequência de *Formica fusca* (AY334398) foi utilizada como grupo externo.

As sequências obtidas com o marcador EPIC Ant1281, devido à presença de grandes inserções/deleções, foi submetida a duas análises filogenéticas distintas. Uma árvore foi construída pelo método de Neighbor Joining a partir da divergência evolutiva calculada pelo método de Kimura 2-parameter com remoção de *gaps* de sequências pareadas (*pairwise*

*deletion*) e teste de bootstrap com 1000 repetições. Desta forma, somente os gaps formados a cada par de sequências alinhadas foi eliminado da comparação. Outra árvore foi construída por inferência Bayesiana considerando as informações contidas nos *gaps* utilizando o programa MrBayes 3.2 (RONQUIST et al., 2011). Previamente à análise Bayesiana, o alinhamento nucleotídico foi realizado no programa BioEdit (HALL, 2013) e as inserções/deleções (*indels*) foram codificadas em uma matriz de presença/ausência pelo método de Simmons; Ochoterena (2000) utilizando o programa FastGap v1.2 (BORCHSENIUS, 2009). A análise Bayesiana foi realizada por 500 mil gerações com árvores amostradas a cada 1.000 gerações.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Espécimes de *Camponotus* coletadas

Foram coletados 1.357 espécimes de formigas do gênero *Camponotus*, tanto por coleta ativa como por armadilhas luminosas, sendo 644 operárias e 713 alados. Foram submetidos às análises moleculares 97 espécimes sendo 65 operárias e 32 alados.

Os meses em que alados de *Camponotus* spp foram capturados foram março, novembro e dezembro de 2014 e janeiro de 2015. A maior diversidade de alados (3 espécies e 6 morfoespécies) foi capturada em Dezembro de 2014 (Tabela 1).

Quanto à riqueza de espécies de *Camponotus*, foram identificadas dezesseis espécies nos pontos amostrais, sendo nove no Instituto Biológico e treze no Horto (Tabela 2). O número de espécies na área do Instituto Biológico foi menor em relação ao Horto Florestal, entretanto, houve seis espécies que foram recorrentes em ambas as localidades, *C. atriceps*, *C. balzani*, *C. cingulatus*, *C. crassus*, *C. lespeii* e *Camponotus* sp.3. Isto indica uma maior tolerância ou adaptação dessas espécies aos ambientes com grau de perturbação maior ou mesmo área com cobertura verde reduzida. A maioria das espécies relatadas no presente estudo também foi encontrada em um levantamento realizado por (LUTINSKI et al., 2013) como *C. sericeiventris*, *C. sexguttatus*, *C. atriceps*, *C. cingulatus*, *C. rufipes*, *C. lespeii* e *C. melanoticus* em dez cidades do estado de Santa Catarina no qual foram encontradas 21 espécies e morfoespécies apenas para o gênero *Camponotus*, demonstrando a alta diversidade desse grupo em áreas verdes urbanas. Lutinski et al. (2013) realizou amostragens através de iscas e coletas ativas, enquanto que, no presente estudo, foram realizadas somente coletas ativas e disposição de armadilhas luminosas em dois pontos da cidade de São Paulo. Levantamento realizado no município de Uberlândia, MG, com armadilhas no interior de domicílios, mostrou em comum ao presente estudo a presença das espécies *C. crassus* e *C. atriceps* (SOARES et al., 2006) enquanto que no município de Três Rios, RJ, com iscas em parques urbanos, a espécie em comum foi somente *C. crassus* (ESTRADA et al., 2014).

Tabela 1. Espécies de formigas do gênero *Camponotus* capturadas em armadilha luminosa e por coleta ativa no Instituto Biológico e no Horto Florestal, no período de fevereiro de 2014 a janeiro de 2015.

| MESES                            | 2014 |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 2015 |      |   |
|----------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|---|
|                                  | Fev. | Mar. | Abr. | Maió | Jun. | Jul. | Ago. | Set. | Out. | Nov. | Dez. | Jan. |   |
| ESPÉCIES                         | AL   | CA   |   |
| <i>Camponotus atriceps</i>       |      | X    |      |      | X    |      |      |      |      |      | X    | X    | X |
| <i>Camponotus balzani</i>        | X    |      | X    |      | X    |      |      |      |      |      | X    | X    | X |
| <i>Camponotus cingulatus</i>     | X    |      |      |      |      |      |      |      |      |      | X    |      | X |
| <i>Camponotus crassus</i>        |      |      | X    |      |      |      |      |      |      | X    | X    |      | X |
| <i>Camponotus melanoticus</i>    | X    |      | X    |      | X    |      |      |      |      | X    | X    | X    | X |
| <i>Camponotus sericeiventris</i> | X    |      | X    |      |      |      |      |      |      | X    | X    |      | X |
| <i>Camponotus sexguttatus</i>    |      | X    | X    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| <i>Camponotus lespesii</i>       | X    |      | X    |      | X    |      |      |      |      | X    | X    |      | X |
| <i>Camponotus rufipes</i>        |      |      | X    |      |      |      |      |      |      |      | X    |      | X |
| <i>Camponotus</i> sp.1           | X    |      | X    |      | X    |      |      |      |      | X    | X    |      | X |
| <i>Camponotus</i> sp. 2          |      |      |      |      |      |      |      |      |      | X    | X    |      | X |
| <i>Camponotus</i> sp. 3          | X    |      |      |      |      |      |      |      |      | X    | X    | X    | X |
| <i>Camponotus</i> sp. 4          |      |      |      |      |      |      |      |      |      | X    | X    |      |   |
| <i>Camponotus</i> sp.5           |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | X    |      |   |
| <i>Camponotus</i> sp.6           |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | X    |      |   |
| <i>Camponotus</i> sp.7           |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | X    |      |   |

AL= Armadilha Luminosa CA= Coleta Ativa

Tabela 2. Espécies de formigas do gênero *Camponotus* coletadas no Instituto Biológico e no Horto Florestal no período de janeiro de 2014 a janeiro de 2015.

| Espécie/Morfoespécie                   | Instituto Biológico | Horto Florestal |
|--|---------------------|-----------------|
| <i>Camponotus atriceps</i>             | ✓                   | ✓               |
| <i>Camponotus balzani</i>              | ✓                   | ✓               |
| <i>Camponotus cingulatus</i>           | ✓                   | ✓               |
| <i>Camponotus crassus</i>              | ✓                   | ✓               |
| <i>Camponotus lespesii</i>             | ✓                   | ✓               |
| <i>Camponotus melanoticus</i>          |                     | ✓               |
| <i>Camponotus rufipes</i>              |                     | ✓               |
| <i>Camponotus sericeiventris</i>       |                     | ✓               |
| <i>Camponotus sexguttatus</i>          | ✓                   |                 |
| <i>Camponotus</i> sp.1                 |                     | ✓               |
| <i>Camponotus</i> sp.2                 |                     | ✓               |
| <i>Camponotus</i> sp.3                 | ✓                   | ✓               |
| <i>Camponotus</i> sp.4                 |                     | ✓               |
| <i>Camponotus</i> sp.5                 | ✓                   |                 |
| <i>Camponotus</i> sp.6                 |                     | ✓               |
| <i>Camponotus</i> sp.7                 | ✓                   |                 |
| <b>Total de espécies/morfoespécies</b> | <b>9</b>            | <b>13</b>       |

As espécies *C. melanoticus*, *C. rufipes* e *C. sericeiventris* são comumente coletadas em fragmentos de Mata Atlântica (ROSUMEK et al., 2008). No presente estudo, essas espécies foram coletadas no Horto Florestal, uma área caracterizada por possuir grande região arborizada no entorno. A presença de *C. melanoticus* e *C. rufipes* em domicílios do município de Uberlândia, MG, se deve à proximidade dos bairros à zona rural e veredas (SOARES et al., 2006).

Na Tabela 3 são apresentadas as diversidades de espécies observadas no presente estudo e as obtidas por Lutinski et al. (2013), no estado de Santa Catarina, e por Estrada et al. (2014), no estado do Rio de Janeiro. Embora as diferenças nos métodos e esforços de amostragem dos três estudos não permitam uma comparação rigorosa, é possível observar que dez espécies co-ocorreram em pelo menos dois desses levantamentos *C. fastigatus*, *C. novogranadensis*, *C. sexguttatus*, *C. atriceps*, *C. cingulatus*, *C. rufipes* e *C. lespesii* e duas espécies *C. crassus* e *C. melanoticus*, ocorreram nos três levantamentos.

Os resultados do presente estudo estão de acordo com as observações de Pacheco e Vasconcelos (2007) que a proximidade de parques urbanos a outros ambientes naturais e a

presença de vegetação nativa nestes parques possibilitam a existência e manutenção de uma mirmecofauna relativamente diversificada.

Tabela 3. Espécies do gênero *Camponotus* encontradas em três levantamentos realizados em áreas urbanas em diferentes estados do Brasil

| Espécie/Morfoespécies  | Lutinski et al., 2013 (SC) | Estrada et al., 2014 (RJ) | Presente estudo (SP) |
|--|----------------------------|---------------------------|----------------------|
| <i>Camponotus (Myrmaphaenus) blandus</i> Smith, 1858                 | ✓                          |                           |                      |
| <i>Camponotus (Myrmaphaenus) cameranoi</i> Emery, 1894               | ✓                          |                           |                      |
| <i>Camponotus (M.) fastigatus</i> Roger, 1863                        | ✓                          | ✓                         |                      |
| <i>Camponotus (M.) novogranadensis</i> Mayr, 1870                    | ✓                          | ✓                         |                      |
| <i>Camponotus (M.) personatus</i> Emery, 1894                        | ✓                          |                           |                      |
| <i>Camponotus (Myrmepomis) sericeiventris</i> Guérin-Méneville, 1838 | ✓                          |                           | ✓                    |
| <i>Camponotus (Myrmobrachys) crassus</i> Mayr, 1862                  | ✓                          | ✓                         | ✓                    |
| <i>Camponotus (M.) mus</i> Roger, 1863                               | ✓                          |                           |                      |
| <i>Camponotus (Myrmocladoecus) hedwigae</i> Forel, 1912              | ✓                          |                           |                      |
| <i>Camponotus (Myrmosphincta) sexguttatus</i> Fabricius, 1793        | ✓                          |                           | ✓                    |
| <i>Camponotus (Myrmothrix) atriceps</i> Smith, 1858                  | ✓                          |                           | ✓                    |
| <i>Camponotus (Myrmotrix) cingulatus</i> Mayr, 1862                  | ✓                          |                           | ✓                    |
| <i>Camponotus (Myrmotrix) renggeri</i> Emery, 1894                   |                            |                           | ✓                    |
| <i>Camponotus (Myrmotrix) rufipes</i> Fabricius, 1775                | ✓                          |                           | ✓                    |
| <i>Camponotus (Pseudocolobopsis) alboannulatus</i> Mayr, 1887        | ✓                          |                           |                      |
| <i>Camponotus (Tanaemyrmex) lespesii</i> Forel, 1886                 | ✓                          |                           | ✓                    |
| <i>Camponotus (Tanaemyrmex) melanoticus</i> Emery, 1894              | ✓                          | ✓                         | ✓                    |
| <i>Camponotus (Tanaemyrmex) punctulatus</i> Mayr, 1868               | ✓                          |                           |                      |
| <i>Camponotus (Tanaemyrmex) balzani</i> Emery, 1894                  |                            |                           | ✓                    |
| <i>Camponotus prox. brettessi</i> Forel, 1899                        |                            | ✓                         |                      |
| <i>Camponotus senex</i> Smith, 1858                                  |                            | ✓                         |                      |
| <i>Camponotus</i> sp. 1 – SC   | ✓                          |                           |                      |
| <i>Camponotus</i> sp. 2 – SC   | ✓                          |                           |                      |
| <i>Camponotus</i> sp. 3 – SC   | ✓                          |                           |                      |
| <i>Camponotus</i> sp. 4 – SC   | ✓                          |                           |                      |
| <i>Camponotus</i> sp. 1 – RJ   |                            | ✓                         |                      |
| <i>Camponotus</i> sp. 1 – SP   |                            |                           | ✓                    |
| <i>Camponotus</i> sp. 2 – SP   |                            |                           | ✓                    |
| <i>Camponotus</i> sp. 3 – SP   |                            |                           | ✓                    |
| <i>Camponotus</i> sp. 4 – SP   |                            |                           | ✓                    |
| <i>Camponotus</i> sp. 5 – SP   |                            |                           | ✓                    |
| <i>Camponotus</i> sp. 6 – SP   |                            |                           | ✓                    |
| <i>Camponotus</i> sp. 7 – SP   |                            |                           | ✓                    |
| <b>Total</b>   | <b>21</b>                  | <b>7</b>                  | <b>17</b>            |

## 5.2 Identificação molecular e análise filogenética dos espécimes de *Camponotus* utilizando o gene COI

Nos estudos sobre o uso do código de barras de DNA para a identificação de espécimes de *Camponotus* e sobre sua diversidade genética, além dos espécimes coletados no IB e HF foram acrescentados espécimes oriundos de outras localidades tanto na cidade de São Paulo, como em outras cidades em SP, MG, PR e CE. A inclusão destes espécimes permitiu melhor avaliar a variabilidade intra-específica e obter uma pequena amostra da diversidade genética do gênero *Camponotus* no Brasil.

A utilização do código de barras de DNA para a identificação dos espécimes de *Camponotus* foi bem sucedida para três espécimes de *C. rufipes* e quatro de *C. sericeiventris*, que apresentaram similaridade maior que 97% com sequências depositadas no GenBank.

Esse relativo insucesso é devido ao pequeno número de sequências de espécies de *Camponotus* da Região Neotropical depositadas no GenBank. As poucas sequências de espécimes coletados nas Américas são de trabalho de Brady; Gadau; Ward (2000), que realizaram estudo preliminar sobre a sistemática de *Camponotus* utilizando sequenciamento do gene COI. O espécime SP11 apresentou similaridade de 98,7% com *C. rufipes* (AF187957) e os espécimes SP14 e MG01 apresentaram 98,7% e 98,9%, respectivamente, com *C. rufipes* (AF187956). As sequências de *C. rufipes*, de acordo com Brady; Gadau; Ward (2000), são de espécimes coletados no Rio de Janeiro e El Bagual (Argentina), porém nos acessos do GenBank os autores não especificaram a origem de cada um. O espécime de alado SP09-A e os espécimes HF06, SP03 e PR03 apresentaram similaridades de 97,7% e 98,2%, respectivamente, com *C. sericeiventris* (AF187959) coletado em Misiones (Argentina). Esses autores também sequenciaram dois espécimes de *C. atriceps* de Trinidad e Tobago e do México e um de *C. floridanus* da Flórida (EUA), que apresentaram similaridades variando entre 88,1% e 93,1% com os espécimes CE01, MG06, IB26-A, HF38, SP16 e SP17, valores inferiores ao usualmente utilizado para a identificação específica de formigas, que é de 97-98%.

As árvores filogenéticas construídas pelos métodos de Neighbor Joining a partir das divergências genéticas calculadas pelo método de Kimura 2-parameter (K2P) e por Máxima Verossimilhança baseada no modelo General Time Reversible com distribuição Gamma discreta e permitindo que algumas bases fossem evolutivamente invariáveis (GTR+G+I) não apresentaram diferenças notáveis nos agrupamentos formados.

Para cinco espécimes ou agrupamentos de espécimes alados, HF26/HF28/HF33, IB30, IB21, HF30, HF31/HF32/HF34 não foram encontradas as respectivas operárias. Este resultado confirma que a captura de alados constitui uma estratégia promissora para o levantamento da diversidade de formigas em um ambiente, possibilitando encontrar espécies que não seriam

constatadas por outros métodos de captura, tal como a coleta ativa utilizada no presente estudo.

O sequenciamento permitiu associar espécimes alados com as respectivas operárias das seguintes espécies: *C. atriceps*, *C. balzani*, *C. lespeii*, *C. melanoticus*, *C. sericeiventris*, *C. sexguttatus* e as morfoespécies *Camponotus* sp.1 e *Camponotus* sp.3. Este é um resultado relevante do presente estudo, pois confirma a utilidade do sequenciamento de DNA para a identificação de espécimes alados, o que é de difícil execução com base na morfologia ou quando não são capturados conjuntamente a operárias. Esta aplicação do sequenciamento permitiu que Ward (2007) identificasse um macho da espécie de formiga subterrânea *Leptanilloides mckennae*. Formigas de hábito hipogéico apresentam operárias com várias características morfológicas em comum como tamanho reduzido, tegumento pálido, ausência de olhos, ausência de lobos frontais, entre outras, constituindo uma convergência adaptativa a este modo de vida que pode dificultar estudos taxonômicos. Ward (2007) confirmou que as semelhanças superficiais entre *Leptanilloides* e *Leptanilla* não passam disso, tendo essas espécies surgido em pontos distantes da filogenia de formigas. O código de barras de DNA também permitiu relacionar um espécime de macho alado com operárias de *Odontomachus* cf. *ruginodis* em estudo realizado na Isla del Coco, Costa Rica, realizado por Smith et al. (2013).

Os resultados do presente estudo mostram que a captura de espécimes alados tem grande capacidade para revelar a diversidade de formigas de uma determinada área e que a identificação destes espécimes, embora difícil do ponto de vista morfológico, pode ser auxiliada pelo emprego do código de barras de DNA. Para tal, uma base de dados com sequências obtidas de operárias devidamente identificadas morfológicamente é fundamental e, nesse sentido, este estudo dá um passo inicial fornecendo, pela primeira vez, sequências de pelo menos 18 espécies/morfoespécies de formigas do gênero *Camponotus*.

Outros aspectos importantes observáveis nas árvores construídas como o gene COI são a polifilia de *C. balzani*, a formação de um complexo de espécies de *C. atriceps* e a clara separação entre *C. rufipes* e *C. renggeri*. Estes aspectos serão discutidos com maior detalhamento separadamente.

### **5.3 Análise filogenética de espécimes de *Camponotus* utilizando marcadores EPIC**

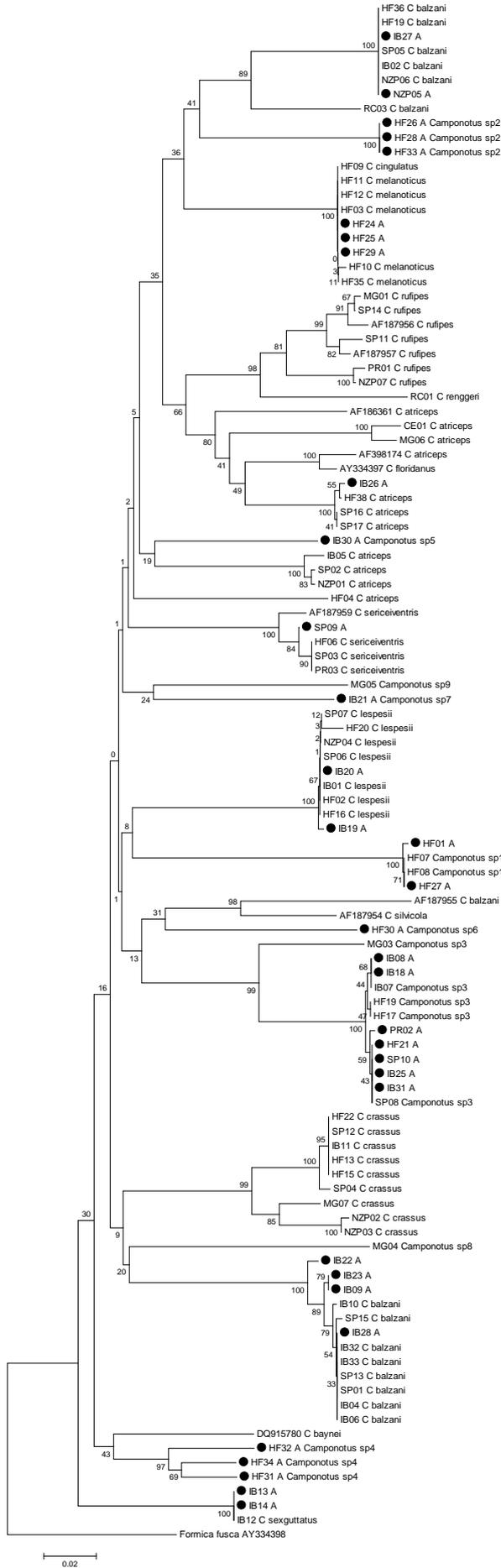
Os iniciadores selecionados para os marcadores EPIC ant.346 e ant.1281, permitiram a amplificação de produtos com tamanhos próximos ao esperado, com maior variabilidade de tamanhos para o marcador ant.1281. Análise preliminar das sequências obtidas mostrou que o marcador ant.346 apresentou menor variabilidade de sequências e poucas diferenças com relação a inserções/deleções entre espécimes de *Camponotus*. Por outro lado, o marcador ant.1281 apresentou grande variabilidade, principalmente na forma de inserções/deleções, com

tamanhos dos produtos amplificados variando de 424 pb (*Camponotus* sp.1) a 569 pb (*C. rufipes*). Por se tratar de região intrônica, essa modalidade de polimorfismo era esperada. Stroher; Li; Pie (2013), estudando a variação intraespecífica de espécimes de *Gnamptogenys striatula* oriundos de diferentes estados brasileiros distantes até 2900 km, observaram divergências genéticas entre 1,1 a 1,4% para os marcadores ant.263, ant.965 e ant.1281 e de 8,9% para ant.346. Entretanto, a variação intergenérica nos tamanhos dos produtos amplificados com estes marcadores para *Brachymyrmex* sp., *Pheidole incisa*, *Hylomyrma reitteri* e *Gnamptogenys striatula* foi maior para ant.1281 (400 a 550 pb) do que para ant.346 (400 a 500 pb).

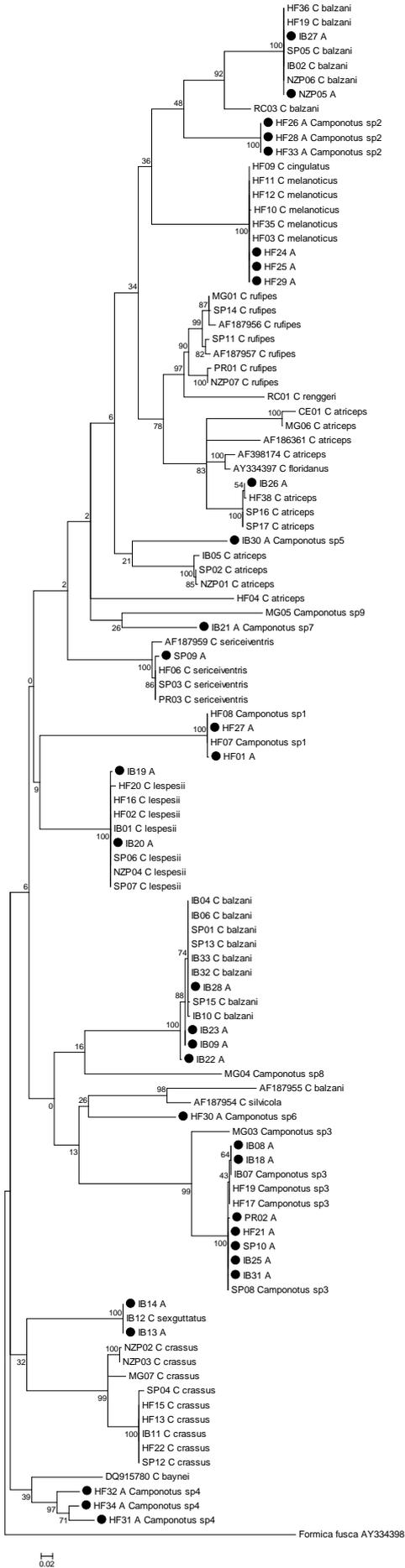
Estudos recentes têm demonstrado a importância de se utilizar as informações contidas nas inserções/deleções para a construção de árvores filogenéticas, apesar de ainda ser prática comum a remoção destas diferenças nos alinhamentos de sequências, previamente à construção das árvores (NAGY et al., 2012; OGDEN; ROSENBERG, 2007). No presente estudo, as sequências obtidas para o marcador EPIC ant.1281 foram analisadas de duas formas: (1) Neighbor Joining com base na distância genética calculada por Kimura 2-parameter e gaps eliminados na comparação de cada par de sequências (pairwise deletion) (Figura 5) e (2) inferência Bayesiana com gaps codificados em uma matriz de presença/ausência construída segundo Simmons; Ochoterena (2000) (Figura 6).

As árvores obtidas por ambos os métodos agruparam as sequências de maneiras semelhantes e que de maneira geral confirmaram os agrupamentos formados nas árvores construídas com as sequências do gene COI. Uma diferença observada entre as árvores do marcador EPIC ant.1281 e do gene COI foi uma maior separação entre *C. atriceps* e *C. rufipes* pelas sequências COI. A polifilia de *C. balzani* e a formação de um complexo de espécies de *C. atriceps*, foram confirmadas pelo marcador EPIC ant.1281.

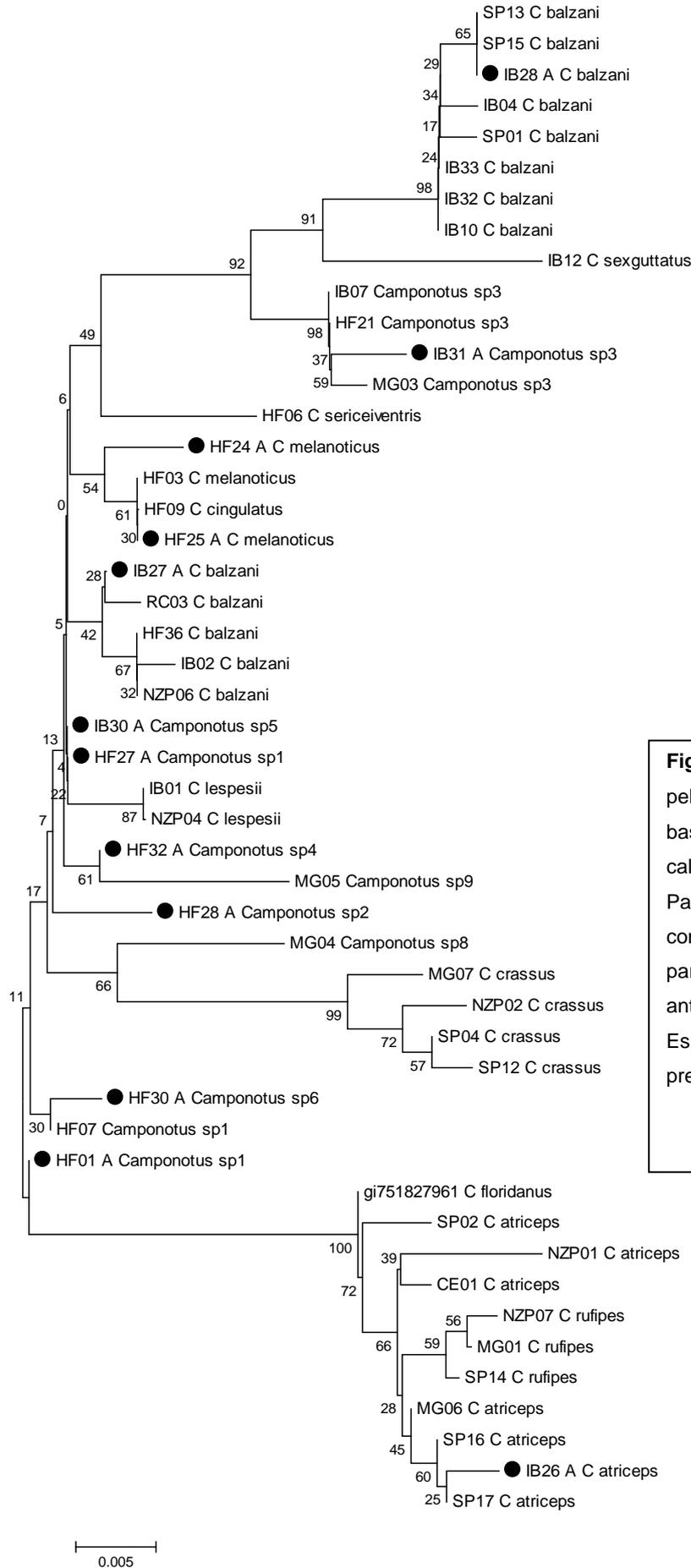
O tipo de polimorfismo observado no marcador EPIC ant.1281, principalmente de inserções/deleções, parece ter maior utilidade no estudo da variação intraespecífica, conforme proposto por Stroher; Li; Pie (2013). Espécimes de *C. balzani*, *C. melanoticus*, *C. crassus* ou *C. atriceps* que não apresentaram diferenças no gene COI puderam ser separadas pelas sequências EPIC ant.1281 (Figuras 3 e 5).



**Figura 3.** Árvore filogenética construída pelo método de Neighbor Joining com base nos valores de divergência calculados pelo método de Kimura 2-Parameter para as sequências do gene COI de espécimes de *Camponotus*. *Formica fusca* foi utilizada como grupo externo para enraizamento da árvore. Espécimes indicados por círculo preenchido são alados.



**Figura 4.** Árvore filogenética construída pelo método de Máxima Verossimilhança com base nos valores de divergência calculados pelo modelo GTR+G+I para as sequências do gene COI de espécimes de *Camponotus*. *Formica fusca* foi utilizada como grupo externo para enraizamento da árvore. Espécimes indicados por círculo preenchido são alados.



**Figura 5.** Árvore filogenética construída pelo método de Neighbor Joining com base nos valores de divergência calculados pelo método de Kimura 2-Parameter, com gaps eliminados após comparação de sequências pareadas, para as sequências do marcador EPIC ant.1281 de espécimes de *Camponotus*. Espécimes indicados por círculo preenchido são alados.

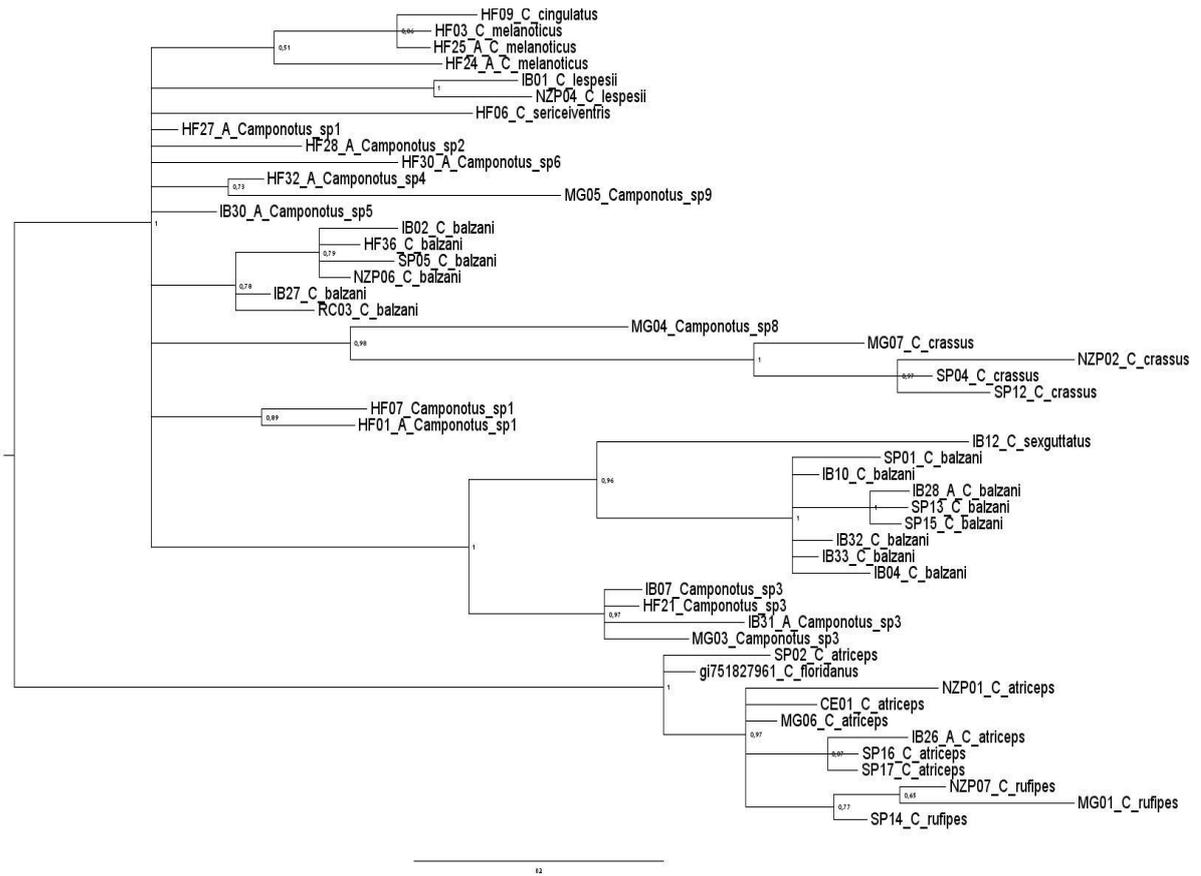


Figura 6. Árvore filogenética construída por inferência Bayesiana para as sequências do marcador EPIC ant.1281 de espécimes de *Camponotus* e com os gaps codificados em matriz de ausência/presença segundo Simmons e Ochoterena (2000). Os números junto aos ramos indicam a probabilidade posterior.

#### 5.4 Espécies crípticas em *Camponotus*

Duas espécies sequenciadas no presente estudo, *C. atriceps* e *C. balzani* já têm sequências depositadas no GenBank, porém apresentaram divergências acima de 13% para o gene COI. Além disso, em ambos os casos, espécimes considerados morfologicamente como espécie única, situaram-se em ramos distintos da árvore filogenética.

Espécimes de *C. balzani* do presente estudo separaram-se em três clados com divergências de 9,0% a 17,8% entre os clados. Um quarto clado com a sequência de *C. balzani* do GenBank (AF187955), coletado em Cuzco, Peru (BRADY; GADU; WARD, 2000) apresentou divergências entre 15,4% a 19,7% com os espécimes do presente estudo (Tabela 4).

A análise macroscópica dos espécimes Figura 7 e comparação com as fotos disponíveis em banco de dados, não permitiu a distinção morfológica dos espécimes de *C. balzani* pertencentes aos diferentes clados.

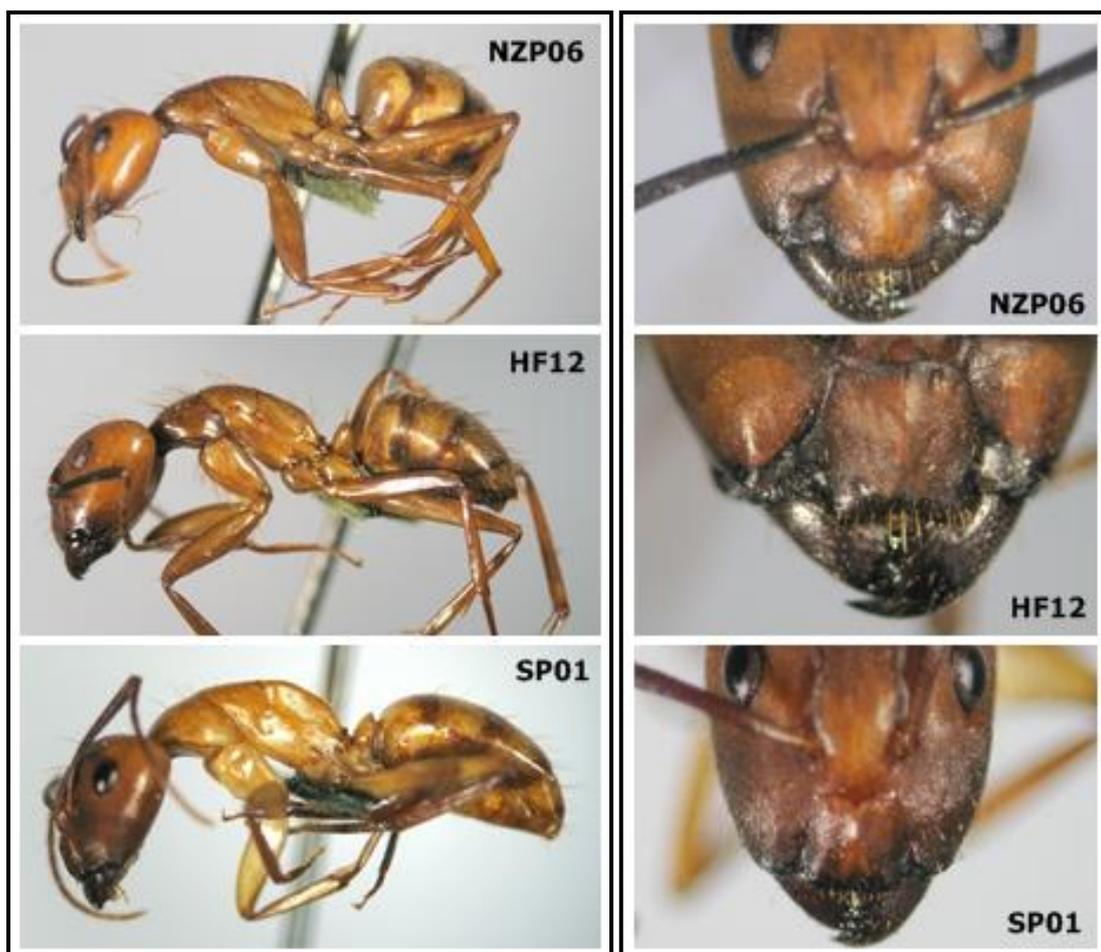


Figura 7. Comparação morfológica entre espécimes de *C. balzani*, dispostas em clados distintos na árvore filogenética.

Tabela 4. Matriz de divergência genética (%) entre espécimes de *C. balzani*. A divergência foi calculada pelo modelo Kimura 2-parameter.

|          | IB02 | RC03 | AF187955 | SP01 | IB10 | IB22 |
|----------|------|------|----------|------|------|------|
| IB02     | -    |      |          |      |      |      |
| RC03     | 9,0  | -    |          |      |      |      |
| AF187955 | 19,7 | 19,8 | -        |      |      |      |
| SP01     | 16,1 | 15,9 | 16,9     | -    |      |      |
| IB10     | 16,1 | 15,9 | 16,6     | 0,3  | -    |      |
| IB22     | 15,5 | 14,6 | 15,9     | 1,5  | 1,8  | -    |
| IB23     | 16,1 | 15,2 | 16,2     | 0,5  | 0,8  | 1,0  |

*Camponotus atriceps* é altamente polimórfica com cores que variam do marrom avermelhado até o preto, com pelos abundantes. A espécie é bem sucedida na ocupação de ambientes sinantrópicos, sendo considerada uma praga em residências (CAMPOS-FARINHA et al., 2002). Existem registros da ocorrência de *C. atriceps* (e de suas diversas sinonímias) para toda a região Neotropical, do sul da América do Sul até o sul dos Estados Unidos. É possível que *C. atriceps* corresponda a um complexo de espécies estreitamente relacionadas, em vez de uma única espécie. Extensos estudos taxonômicos e filogenéticos serão necessários antes que a questão seja resolvida (Antweb, 2014).

Os espécimes de *C. atriceps* coletados em diferentes localidades do estado de São Paulo, Minas Gerais e Ceará são morfologicamente semelhantes entre si. Com base em fotografias destes espécimes (Figura 8 e Figura 9), Dr. William Mackay (Universidade do Texas), confirmou que todos correspondiam a *C. atriceps*, semelhantes à espécie que ocorre na Argentina.

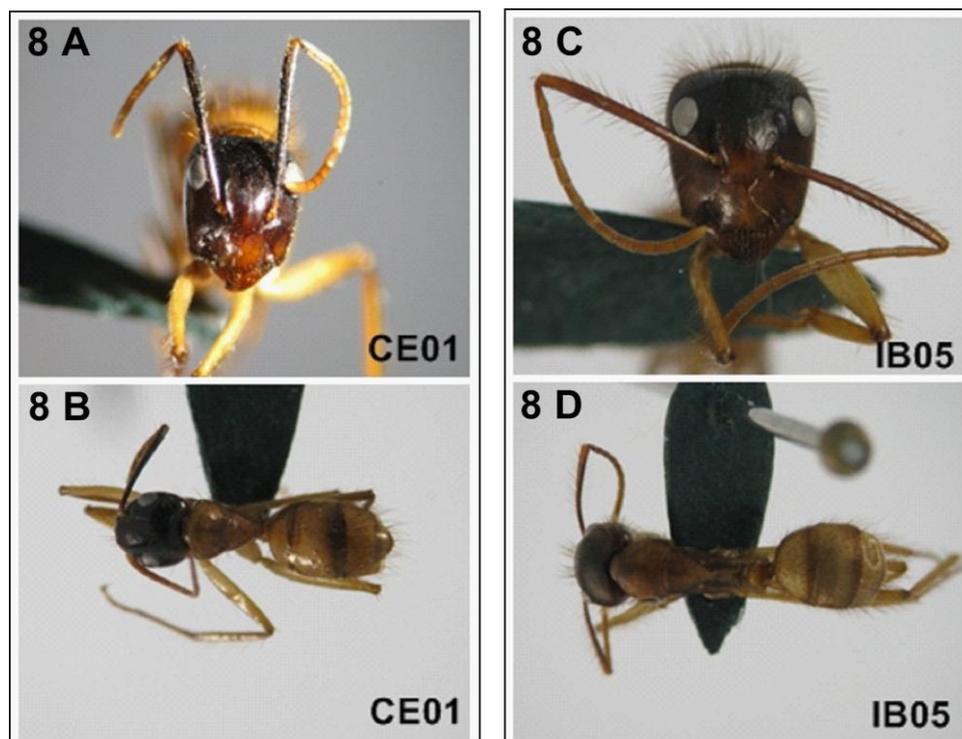


Figura 8. Operárias menores de *C. atriceps* espécimes CE01 e IB05. A e C – fotos das cabeças, B e D – vista dorsal.

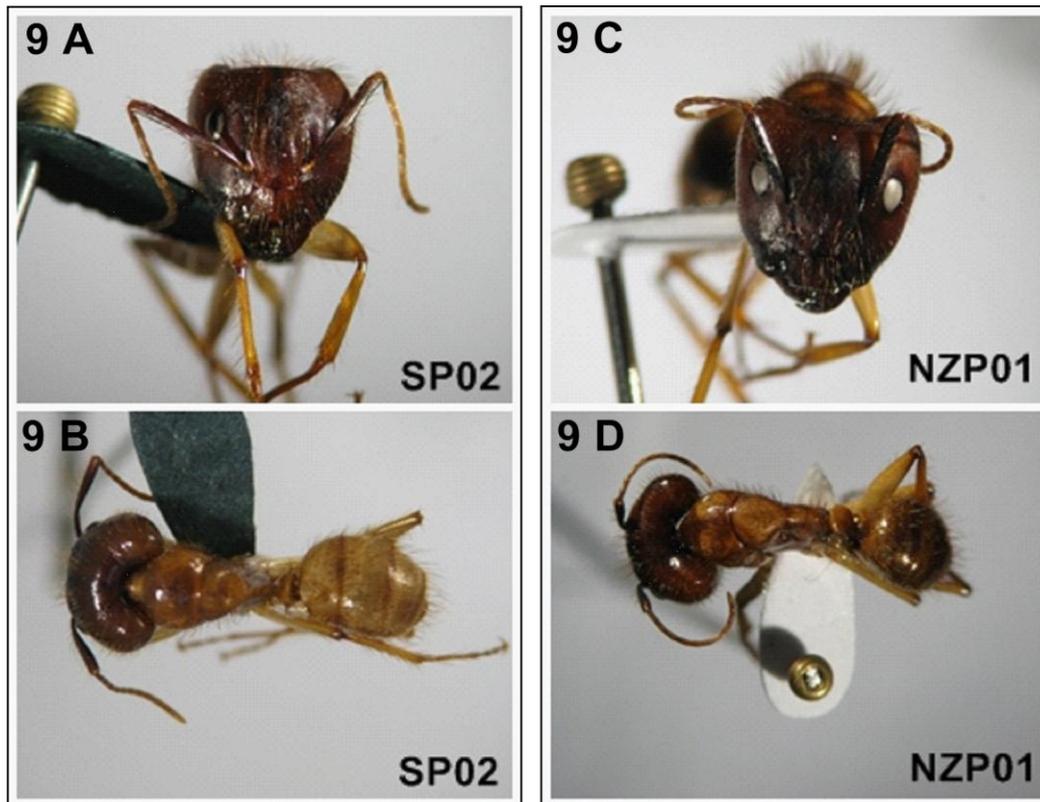


Figura 9. Operárias maiores de *C. atriceps* espécimes SP02 e NZP01. A e C – fotos das cabeças, B e D – vista dorsal.

Nas árvores filogenéticas construídas com o gene COI, os espécimes de *C. atriceps* do presente estudo separaram-se em quatro clados (CE01/MG06, IB26A/HF38/SP16/SP17, IB05/SP02/NZP01 e HF04). As distâncias genéticas entre representantes de clados distintos variaram entre 9,9% a 17,6% (Tabela 5). Os espécimes SP16 e HF38, foram os que apresentaram sequências de menor divergência (7,5% e 8,9%) com as sequências de *C. atriceps* depositadas no GenBank (AF398174 e AF186361). Os dados obtidos indicam a existência de espécies crípticas subjacentes à morfoespécie *C. atriceps*, confirmando a existência de um complexo de espécies com ampla diversidade genética.

*C. atriceps* abriga em uma única espécie diversas subespécies que anteriormente pertenciam a *C. abdominalis* (Hashmi, 1973). A diversidade genética revelada no presente estudo suscita a necessidade de rever essa fusão taxonômica, pois as divergências genéticas observadas entre espécimes localizados em diferentes clados de *C. atriceps* estão muito acima dos valores reportados para diferenciação de espécies, usualmente entre 2% e 3%.

**Tabela 5. Matriz de divergência genética (%) entre espécimes de *C. atriceps*. A divergência foi calculada pelo modelo Kimura 2-parameter.**

|  | SP02 | IB05 | CE01 | MG06 | SP16 | HF38 | HF04 | AF186361 | AF398174 |
|--|------|------|------|------|------|------|------|----------|----------|
| <b>SP02</b>                            | -    |      |      |      |      |      |      |          |          |
| <b>IB05</b>                            | 1,0  | -    |      |      |      |      |      |          |          |
| <b>CE01</b>                            | 17,6 | 16,7 | -    |      |      |      |      |          |          |
| <b>MG06</b>                            | 17,0 | 16,4 | 2,1  | -    |      |      |      |          |          |
| <b>SP16</b>                            | 15,3 | 14,1 | 10,5 | 9,9  | -    |      |      |          |          |
| <b>HF38</b>                            | 15,3 | 14,1 | 10,5 | 9,9  | 0,5  | -    |      |          |          |
| <b>HF04</b>                            | 14,2 | 14,0 | 16,8 | 17,2 | 17,5 | 17,2 | -    |          |          |
| <b>AF186361 (<i>C. atriceps</i>)</b>   | 15,7 | 15,1 | 13,2 | 12,9 | 8,9  | 8,9  | 15,0 | -        |          |
| <b>AF398174 (<i>C. atriceps</i>)</b>   | 14,3 | 13,8 | 12,7 | 12,1 | 7,5  | 7,5  | 16,2 | 9,0      | -        |
| <b>AY334397 (<i>C. floridanus</i>)</b> | 14,7 | 14,1 | 10,6 | 10,0 | 7,3  | 7,3  | 15,9 | 8,4      | 2,1      |

### 5.5 *C. renggeri* e *C. rufipes*: uma ou duas espécies?

As análises filogenéticas também ajudam a esclarecer uma questão sobre as espécies *C. renggeri* e *C. rufipes* que são morfologicamente muito semelhantes (Figura 5). Em revisão taxonômica ainda não publicada sobre o gênero *Camponotus*, mas com versão provisória disponível na Internet (<https://www.utep.edu/leb/ants/Camponotus.htm>), W. Mackay sugere que o tegumento mais brilhante e pernas com coloração mais amarelada de *C. renggeri* constituam variações morfológicas de *C. rufipes* (Figura 10). Entretanto essa sugestão contradiz as evidências ecológicas e comportamentais observadas por Ronque (2013), que distingue claramente as duas espécies, principalmente sobre preferências de nidificação, onde *C. renggeri* constrói ninhos em troncos mortos, solo ou troncos mortos eretos sem associação com plantas que dispõem de nectários extraflorais, ao contrário de *C. rufipes* sempre associado com plantas com nectários extraflorais ou insetos sugadores de seiva como pulgões, cigarrinhas e cochonilhas.

As análises filogenéticas suportam essas observações, pois o espécime de *C. renggeri* RC01 apresentou divergência genética de 8,4% a 10,2% quando comparado com espécimes de *C. rufipes* (Tabela 6).

Os espécimes de *C. rufipes* coletados no presente estudo foram separados em dois clados (MG01/SP14/SP11 e PR01/NZP07). As diferenças intraclados máximas foram de 3,1% e 0,5%, enquanto que a diferença mínima entre espécimes de clados diferentes foi de 5,0%. Esses valores sugerem a existência de duas espécies ou subespécies diferentes.



Figura 10. Vistas laterais de (A) – *C. renggeri* RC01 e (B) – *C. rufipes* MG01

Tabela 6. Matriz de divergência genética (%) entre espécimes de *C. rufipes* e *C. renggeri*. A divergência foi calculada pelo modelo Kimura 2-parameter

|                                   | MG01 | AF187956 | SP11 | AF187957 | PR01 | NZP07 |
|-----------------------------------|------|----------|------|----------|------|-------|
| <b>MG01</b>                       |      |          |      |          |      |       |
| <b>AF187956 <i>C. rufipes</i></b> | 1,0  |          |      |          |      |       |
| <b>SP11</b>                       | 2,1  | 3,1      |      |          |      |       |
| <b>AF187957 <i>C. rufipes</i></b> | 2,3  | 2,9      | 1,3  |          |      |       |
| <b>PR01</b>                       | 5,9  | 6,4      | 5,9  | 5,6      |      |       |
| <b>NZP07</b>                      | 5,3  | 5,9      | 5,3  | 5,0      | 0,5  |       |
| <b>RC01</b>                       | 9,5  | 8,4      | 10,1 | 10,2     | 9,2  | 9,2   |

## 6 CONCLUSÕES

A riqueza de espécies de *Camponotus* no Horto Florestal foi maior que a observada no Instituto Biológico, estando de acordo com o esperado devido a maior proximidade do primeiro à reserva natural da Serra da Cantareira.

A coleta de alados permitiu encontrar espécies que não foram obtidas pela coleta ativa de operárias.

O sequenciamento do gene COI mitocondrial revelou a existência de espécies crípticas constituindo um complexo de espécies de *C. atriceps* e *C. balzani*, com ampla variabilidade genética.

O sequenciamento também permitiu a associação de espécimes alados com suas respectivas operárias, quando sequências de ambas as formas foram obtidas.

Polifilia de *C. balzani* e complexo de *C. atriceps* foram confirmados pelo marcadores EPIC Ant1281.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTI, D.; SCHULTZ, T.; MAJER, J. D. **Ants**. [s.l.] Smithsonian Institution Press, 2000.

ALEIXO, A. Conceitos de espécie e o eterno conflito entre continuidade e operacionalidade: uma proposta de normatização de critérios para o reconhecimento de espécies pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 15, n. 2, p. 297–310, 2007.

ALEIXO, A. Conceitos de espécie e suas implicações para a conservação. v. 5, 2009.

ALTSCHUL, S. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990.

**AntWeb**. Disponível em:

<<http://www.antweb.org/images.do?name=balzani&genus=camponotus&rank=species&project=paraguayants>>. Acesso em: 23 abr. 2015.

AVISE, J. C. **Phylogeography: The History and Formation of Species**. [s.l.] Harvard University Press, 2000.

BENINI, S. M.; MARTIN, E. S. Decifrando as áreas verdes públicas. **Revista Formação**, v. 2, n. 17, p. 63–80, 2011.

BLAXTER, M. L. The promise of a DNA taxonomy. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 359, n. 1444, p. 669–79, 29 abr. 2004.

BOLTON, B. et al. **Bolton's catalogue of ants of the world: 1758-2005**. [s.l.] Harvard University Press Cambridge, MA, 2006.

BORCHSENIUS, F. **FastGap 1.2**. Disponível em: <[http://www.aubot.dk/FastGap\\_home.htm](http://www.aubot.dk/FastGap_home.htm)>. Acesso em: 20 abr. 2015.

BOSCARDIN, J. et al. EFEITO DO FOGO SOBRE A RIQUEZA DE FORMIGAS (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) ASSOCIADAS À *Pinus elliottii* ENGELM. NO SUL DO BRASIL. **Ciência Florestal**, v. 24, n. 4, p. 1027–1036, 2014.

- BRADY, S. G.; GADAU, J.; WARD, P. . Systematics of the Ant Genus *Camponotus* (Hymenoptera: formicidae): a preliminary Analysis using data from the Mitochondrial Gene Cytochrome. In: **Hymenoptera: Evolution, Biodiversity and Biological Control: Evolution, Biodiversity and Biological Control**. [s.l.] CSIRO PUBLISHING, 2000. p. 131.
- CALLISTO, M.; GONÇALVES JR, J. F.; MORENO, P. Invertebrados aquáticos como bioindicadores. **Navegando o Rio das Velhas das Minas aos Gerais**, v. 1, p. 1–12, 2005.
- CAMPOS-FARINHA, A. E. DE C. et al. As formigas urbanas no Brasil: Retrospecto. **Biológico**, v. 64, n. 2, p. 129–133, 2002.
- DASH, S. T. **Species Diversity and Biogeography of Ants (Hymenoptera Formicidae) in Louisiana, With Notes on Their Ecology**. [s.l: s.n.].
- DAYRAT, B. Towards integrative taxonomy. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 85, n. 3, p. 407–415, 2005.
- DE QUEIROZ, K. The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation: a conceptual unification and terminological recommendations. **Endless forms: species and speciation**, p. 57–75, 1998.
- DUNN, R. R. Recovery of faunal communities during tropical forest regeneration. **Conservation Biology**, v. 18, n. 2, p. 302–309, 2004.
- ESTRADA, M. A. et al. Influência de Áreas Verdes Urbanas sobre a Mirmecofauna. **Floresta e Ambiente**, v. 21, n. 2, p. 162–169, 2014.
- FONSECA, R. C.; DIEHL, E. Riqueza de formigas (Hymenoptera, Formicidae) epigéicas em povoamentos de *Eucalyptus* spp. (Myrtaceae) de diferentes idades no Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 48, n. 1993, p. 95–100, 2004.
- FOWLER, H. G. et al. Ants as potential vectors of pathogens in hospitals in the state of São Paulo, Brazil. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 14, n. 03, p. 367–370, 1993.
- GADAU, J.; BRADY, S. G.; WARD, P. S. Systematics, distribution, and ecology of an endemic California *Camponotus quercicola* (Hymenoptera : Formicidae). **ANNALS OF THE ENTOMOLOGICAL SOCIETY OF AMERICA**, v. 92, n. 4, p. 514–522, 1999.

GÓMEZ, C. et al. Structure of ground-foraging ant assemblages in relation to land-use change in the northwestern Mediterranean region. **Biodiversity & Conservation**, v. 12, n. 10, p. 2135–2146, 2003.

GÓMEZ, J. M. et al. Experimental study of pollination by ants in Mediterranean high mountain and arid habitats. **Oecologia**, v. 105, n. 2, p. 236–242, 1996.

GOODISMAN, M. A. D. et al. Evolution of insect metamorphosis: a microarray-based study of larval and adult gene expression in the ant *Camponotus festinatus*. **Evolution; international journal of organic evolution**, v. 59, n. 4, p. 858–870, 2005.

GOODMAN, S. M. et al. The Use of Molecular Phylogenetic and Morphological Tools to Identify Cryptic and Paraphyletic Species: Examples from the Diminutive Long-fingered Bats (Chiroptera: Miniopteridae: Miniopterus) on Madagascar. **American Museum Novitates**, v. 3669, p. 1–34, 2009.

HAJIBABAEI, M. et al. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. **Trends in Genetics**, v. 23, n. 4, p. 167–172, 2007.

HALL, T. A. **BioEdit v 7.2. 3. Biological sequence alignment editor for Win 95/98/NT/2K/XP** Ibis Biosciences Carlsbad, California, , 2013.

HEBERT, P. D. N. et al. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 14812–14817, 2004.

HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; DE WAARD, J. R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 270, n. Suppl 1, p. S96–S99, 2003a.

HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; DE WAARD, J. R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, v. 270 Suppl, p. S96–S99, 2003b.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The ants**. [s.l.] Harvard Univ. Press, Cambridge, MA, 1990.

**Instituto Florestal de São Paulo**. Disponível em: <<http://iflorestal.sp.gov.br/areas-protegidas/parques-estaduais/alberto-lofgren/>>. Acesso em: 1 jan. 2015.

- JACKMAN, J. A.; DREES, B. M. **A Field Guide to Common Texas Insects**. [s.l.] Taylor Trade Publishing, 1998.
- JINBO, U.; KATO, T.; ITO, M. Current progress in DNA barcoding and future implications for entomology. **Entomological Science**, v. 14, p. 107–124, 2011.
- JUNQUEIRA, L. K.; DIEHL, E.; DIEHL-FLEIG, E. Formigas (Hymenoptera: Formicidae) visitantes de *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 1, p. 161–164, 2001.
- KASPARI, M. et al. The phenology of a Neotropical ant assemblage: evidence for continuous and overlapping reproduction. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 50, n. 4, p. 382–390, 2001.
- LI, C.; RIETHOVEN, J.-J. M.; MA, L. Exon-primed intron-crossing (EPIC) markers for non-model teleost fishes. **BMC Evolutionary Biology**, v. 10, n. 1, p. 90, 2010.
- LONGINO, J. T. **Camponotus overview**. Disponível em:  
<<http://academic.evergreen.edu/GENERA/Camponotus/Camponotus.html>>. Acesso em: 22 mar. 2015.
- LUTINSKI, J. A.; LOPES, B. C.; MORAIS, A. B. B. DE. Diversidade de formigas urbanas (Hymenoptera: Formicidae) de dez cidades do sul do Brasil. **Biota Neotrop**, v. 13, n. 3, p. 332–342, 2013.
- MACKAY, W. P.; MACKAY, E. **Genus Camponotus**. Disponível em:  
<<http://www.utep.edu/leb/ants/Camponotus.htm>>. Acesso em: 23 mar. 2015.
- MARTIN, L. J. et al. Evolution of the indoor biome. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 30, n. 4, p. 223–232, 2015.
- MARTINS, C. R. et al. Avaliação da qualidade de vida subjetiva dos idosos: uma comparação entre os residentes em cidades rurais e urbanas. **Estudos Interdisciplinares sobre o Envelhecimento**, v. 11, 2007.
- MARTINS, L. et al. Efeito da complexidade estrutural do ambiente sobre a comunidade de formigas (Hymenoptera: Formicidae) no município de Resende, RJ, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n. 2, 2011.

MATTA, S. L. S. F. DA; MORINI, M. S. D. C.; HILSDORF, A. W. S. Genetic relationship among *Camponotus rufipes* Fabricius (Hymenoptera: Formicidae) nests by RAPD molecular markers. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 35, p. 89–92, 2013.

MAYR, E. **Systematics and the origin of species, from the viewpoint of a zoologist**. [s.l.] Harvard University Press, 1942.

MCARTHUR, A. J. A key to *Camponotus* Mayr of Australia. 2007.

MCINTYRE, N. E. et al. Ground arthropod community structure in a heterogeneous urban environment. **Landscape and urban planning**, v. 52, n. 4, p. 257–274, 2001.

MCKINNEY, M. L. Urbanization, Biodiversity, and Conservation. **BioScience**, v. 52, n. 10, p. 883–890, 2002.

MCKINNEY, M. L.; LOCKWOOD, J. L. Biotic homogenization: A few winners replacing many losers in the next mass extinction. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 14, n. 11, p. 450–453, 1 nov. 1999.

MORINI, M. S. DE C. et al. Comunidades de formigas (Hymenoptera, Formicidae) em fragmentos de Mata Atlântica situados em áreas urbanizadas. **Iheringia, Serie Zoologia**, v. 97, n. 3, p. 246–252, 2007.

NAGY, L. G. et al. Re-mind the gap! Insertion–deletion data reveal neglected phylogenetic potential of the nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) of fungi. **PloS one**, v. 7, n. 11, p. e49794, 2012.

NUMMELIN, M. et al. Predatory insects as bioindicators of heavy metal pollution. **Environmental Pollution**, v. 145, n. 1, p. 339–347, 2007.

OGDEN, T. H.; ROSENBERG, M. S. How should gaps be treated in parsimony? A comparison of approaches using simulation. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 42, n. 3, p. 817–826, 2007.

OTTONETTI, L.; TUCCI, L.; SANTINI, G. Recolonization patterns of ants in a rehabilitated lignite mine in Central Italy: Potential for the use of Mediterranean ants as indicators of restoration processes. **Restoration Ecology**, v. 14, n. 1, p. 60–66, 2006.

PACHECO, R.; VASCONCELOS, H. L. Invertebrate conservation in urban areas: ants in the Brazilian Cerrado. **Landscape and Urban Planning**, v. 81, n. 3, p. 193–199, 2007.

RÉ, T. M. **O uso de formigas como bioindicadores no monitoramento ambiental de revegetação de áreas mineradas** Universidade de São Paulo, , 2007.

RIBAS, C. R. et al. Formigas podem ser utilizadas como bioindicadoras de recuperação após impactos ambientais ? **Biológico, São Paulo**, v. 69, p. 57–60, 2007.

RIBEIRO, F. M. et al. Analysis of Ant Communities Comparing Two Methods for Sampling Ants in an Urban Park in the City of Sao Paulo, Brazil. **Sociobiology**, v. 59, p. 971–984, 2012.

RONQUE, M. U. V. História natural, comportamento e ecologia de *Camponotus rufipes* e *Camponotus renggeri* (Formicidae: Formicinae): um estudo comparativo em vegetação do Cerrado. 2013.

ROSUMEK, F. B. et al. Formigas de solo e de bromélias em uma área de Mata Atlântica, Ilha de Santa Catarina, sul do Brasil: Levantamento de espécies e novos registros. **Biotemas**, v. 21(4), n. August 2004, p. 81–89, 2008.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1977.

SANTOS, I. A; ALEGRE, J.; MULINA, L. Mesa Agricultura Sem Fogo Na Amazônia Oriental : Formiga Como Indicador Agroecológico. **Challenges**, p. 53–56, 2007.

SAVAGE, A. M. et al. Fine-scale heterogeneity across Manhattan's urban habitat mosaic is associated with variation in ant composition and richness. **Insect Conservation and Diversity**, v. 8, n. 3, p. 216–228, 2015.

SCHMITZ, A.; RIESNER, D. Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. **Analytical biochemistry**, v. 354, n. 2, p. 311–313, 2006.

SCHNELL, M. R.; PIK, A. J.; DANGERFIELD, J. M. Ant community succession within eucalypt plantations on used pasture and implications for taxonomic sufficiency in biomonitoring. **Austral Ecology**, v. 28, n. 5, p. 553–565, 2003.

SEIFERT, B. Cryptic species in ants (Hymenoptera: Formicidae) revisited: we need a change in the alpha taxonomic approach. **Myrmecol. Nachr.**, v. 12, n. September, p. 149–166, 2009.

SILVESTRE, R.; SILVA, R. R. DA. Guildas de formigas da Estação Ecológica Jataí, Luis Antônio-SP- sugestões para aplicação do modelo de guildas como bio-indicadores ambientais. **Biotemas**, v. 14, n. 1, p. 37–69, 2001.

SMITH, M. A. et al. Dna Barcoding a Collection of Ants (Hymenoptera: Formicidae) from Isla Del Coco, Costa Rica. **Florida Entomologist**, v. 96, n. 4, p. 1500–1507, dez. 2013.

SMITH, M. A.; FISHER, B. L.; HEBERT, P. D. N. DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 360, n. 1462, p. 1825–1834, 2005.

SOARES, N. S. **Formigas domiciliares em região urbana de cerrado e sua diversidade genética**. [s.l.] Universidade Federal de Uberlândia., 2005.

SOARES, N. S. et al. Levantamento da diversidade de formigas (Hymenoptera: Formicidae) na região urbana de Uberlândia, MG. **Neotropical Entomology**, v. 35, n. 3, p. 324–328, jun. 2006.

STRÖHER, P. R.; LI, C.; PIE, M. R. Exon-primed intron-crossing (EPIC) markers as a tool for ant phylogeography. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 57, n. 4, p. 427–430, 2013.

TAMURA, K. et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 2013.

TARIFA, J. R.; ARMANI, G.; TARIFA, J. R. As unidades climáticas urbanas da cidade de São Paulo. **Atlas Ambiental do Município de São Paulo. São Paulo**, v. 400, 2000.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic acids research**, v. 22, n. 22, p. 4673–4680, 1994.

UNDERWOOD, E. C.; FISHER, B. L. The role of ants in conservation monitoring: If, when, and how. **Biological Conservation**, v. 132, p. 166–182, 2006.

VALENTIM, C. L. **FORMIGAS COMO BIOINDICADORAS DE IMPACTOS AMBIENTAIS E DE REABILITAÇÃO DE ÁREAS APÓS ATIVIDADES DE MINERAÇÃO**. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2010.

VALENTINI, A.; POMPANON, F.; TABERLET, P. DNA barcoding for ecologists. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 24, n. December, p. 110–117, 2009.

VELOSO, H. P.; RANGEL FILHO, A. L. R.; LIMA, J. C. A. **Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal**. [s.l.] Ministério da Economia, Fazenda e Planejamento, Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Diretoria de Geociências, Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais, 1991.

WARD, P. S. The ant genus *Leptanilloides*: discovery of the male and evaluation of phylogenetic relationships based on DNA sequence data. **Memoirs of the American Entomological Institute**, v. 80, p. 637–649, 2007.

WIEMERS, M.; FIEDLER, K. Does the DNA barcoding gap exist?—a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). **Frontiers in Zoology**, v. 4, n. 8, p. 1–16, 2007.

WIENS, J. J.; KUCZYNSKI, C. A.; STEPHENS, P. R. Discordant mitochondrial and nuclear gene phylogenies in emydid turtles: Implications for speciation and conservation. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 99, p. 445–461, 2010.

## ANEXO 1. Espécimes coletados com seus respectivos códigos e locais de coleta.

| ID        | Identificação morfológica | Local de coleta                     |
|-----------|---------------------------|-------------------------------------|
| CE01      | <i>C.atriceps</i>         | Fortaleza – CE                      |
| HF04      | <i>C.atriceps</i>         | Horto Florestal – SP                |
| HF38      | <i>C.atriceps</i>         | Horto Florestal – SP                |
| IB26 (A)  | <i>C.atriceps</i>         | Instituto Biológico – SP            |
| MG06      | <i>C.atriceps</i>         | Uberlândia – MG                     |
| SP16      | <i>C.atriceps</i>         | Bragança Paulista – SP              |
| SP17      | <i>C.atriceps</i>         | Bragança Paulista – SP              |
| IB05      | <i>C.atriceps</i>         | Instituto Biológico – SP            |
| NZP01     | <i>C.atriceps</i>         | Nazaré Paulista – SP                |
| SP02      | <i>C.atriceps</i>         | Vila Mariana – SP                   |
| HF19      | <i>C.balzani</i>          | Horto Florestal – SP                |
| HF36      | <i>C.balzani</i>          | Horto Florestal – SP                |
| IB02      | <i>C.balzani</i>          | Instituto Biológico – SP            |
| IB27      | <i>C.balzani</i>          | Instituto Biológico – SP            |
| NZP05     | <i>C.balzani</i>          | Nazaré Paulista – SP                |
| NZP06 (A) | <i>C.balzani</i>          | Nazaré Paulista – SP                |
| SP05      | <i>C.balzani</i>          | Instituto Federal São Paulo – SP    |
| RC03      | <i>C.balzani</i>          | Rio Claro – SP                      |
| IB04      | <i>C.balzani</i>          | Instituto Biológico – SP            |
| IB06      | <i>C.balzani</i>          | Instituto Biológico – SP            |
| IB09 (A)  | <i>C.balzani</i>          | Instituto Biológico – SP            |
| IB10      | <i>C.balzani</i>          | Instituto Biológico – SP            |
| IB22 (A)  | <i>C.balzani</i>          | Instituto Biológico – SP            |
| IB23 (A)  | <i>C.balzani</i>          | Instituto Biológico – SP            |
| IB28 (A)  | <i>C.balzani</i>          | Instituto Biológico – SP            |
| IB32      | <i>C.balzani</i>          | Instituto Biológico – SP            |
| IB33      | <i>C.balzani</i>          | Instituto Biológico – SP            |
| SP01      | <i>C.balzani</i>          | Santo André – SP                    |
| SP13      | <i>C.balzani</i>          | Sorocaba – SP                       |
| SP15      | <i>C.balzani</i>          | Instituto Federal de São Paulo – SP |
| HF13      | <i>C.crassus</i>          | Horto Florestal – SP                |
| HF15      | <i>C.crassus</i>          | Horto Florestal – SP                |
| HF22      | <i>C.crassus</i>          | Horto Florestal – SP                |

|                 |                         |                                  |
|-----------------|-------------------------|----------------------------------|
| <b>IB11</b>     | <i>C.crassus</i>        | Instituto Biológico – SP         |
| <b>IB12</b>     | <i>C.sexguttatus</i>    | Instituto Biológico – SP         |
| <b>IB13 (A)</b> | <i>C. sexguttatus</i>   | Instituto Biológico – SP         |
| <b>IB14 (A)</b> | <i>C. sexguttatus</i>   | Instituto Biológico – SP         |
| <b>MG07</b>     | <i>C.crassus</i>        | Uberlândia – MG                  |
| <b>NZP02</b>    | <i>C.crassus</i>        | Nazaré Paulista – SP             |
| <b>NZP03</b>    | <i>C.crassus</i>        | Nazaré Paulista – SP             |
| <b>SP04</b>     | <i>C.crassus</i>        | Guarulhos – SP                   |
| <b>SP12</b>     | <i>C.crassus</i>        | Campo Limpo – SP                 |
| <b>HF16</b>     | <i>C.lespesii</i>       | Horto Florestal – SP             |
| <b>HF20</b>     | <i>C.lespesii</i>       | Horto Florestal – SP             |
| <b>IB01</b>     | <i>C.lespesii</i>       | Instituto Biológico – SP         |
| <b>IB19 (A)</b> | <i>C.lespesii</i>       | Instituto Biológico – SP         |
| <b>IB20 (A)</b> | <i>C.lespesii</i>       | Instituto Biológico – SP         |
| <b>NZP04</b>    | <i>C.lespesii</i>       | Nazaré Paulista – SP             |
| <b>SP06</b>     | <i>C.lespesii</i>       | Instituto Federal São Paulo – SP |
| <b>SP07</b>     | <i>C.lespesii</i>       | Campinas – SP                    |
| <b>HF03</b>     | <i>C.melanoticus</i>    | Horto Florestal – SP             |
| <b>HF09</b>     | <i>C.cingulatus</i>     | Horto Florestal – SP             |
| <b>HF10</b>     | <i>C.melanoticus</i>    | Horto Florestal – SP             |
| <b>HF11</b>     | <i>C.melanoticus</i>    | Horto Florestal – SP             |
| <b>HF12</b>     | <i>C.melanoticus</i>    | Horto Florestal – SP             |
| <b>HF24 (A)</b> | <i>C.melanoticus</i>    | Horto Florestal – SP             |
| <b>HF25 (A)</b> | <i>C.melanoticus</i>    | Horto Florestal – SP             |
| <b>HF29 (A)</b> | <i>C.melanoticus</i>    | Horto Florestal – SP             |
| <b>HF35</b>     | <i>C.melanoticus</i>    | Horto Florestal – SP             |
| <b>MG01</b>     | <i>C.rufipes</i>        | Andradas – MG                    |
| <b>NZP07</b>    | <i>C.rufipes</i>        | Nazaré Paulista – SP             |
| <b>SP11</b>     | <i>C.rufipes</i>        | São Paulo – SP                   |
| <b>SP14</b>     | <i>C.rufipes</i>        | Campo Limpo – SP                 |
| <b>PR01</b>     | <i>C.rufipes</i>        | Curitiba – PR                    |
| <b>RC01</b>     | <i>C.renggeri</i>       | Rio Claro – SP                   |
| <b>HF06</b>     | <i>C.sericeiventris</i> | Horto Florestal – SP             |
| <b>PR03</b>     | <i>C.sericeiventris</i> | Curitiba – PR                    |
| <b>SP03</b>     | <i>C.sericeiventris</i> | Campinas – SP                    |
| <b>SP09 (A)</b> | <i>C.sericeiventris</i> | Guarulhos – SP                   |

|                 |                        |                          |
|-----------------|------------------------|--------------------------|
| <b>HF01(A)</b>  | <i>Camponotus</i> sp.1 | Horto Florestal – SP     |
| <b>HF07</b>     | <i>Camponotus</i> sp.1 | Horto Florestal – SP     |
| <b>HF08</b>     | <i>Camponotus</i> sp.1 | Horto Florestal – SP     |
| <b>HF27 (A)</b> | <i>Camponotus</i> sp.1 | Horto Florestal – SP     |
| <b>HF26 (A)</b> | <i>Camponotus</i> sp.2 | Horto Florestal – SP     |
| <b>HF28 (A)</b> | <i>Camponotus</i> sp.2 | Horto Florestal – SP     |
| <b>HF33 (A)</b> | <i>Camponotus</i> sp.2 | Horto Florestal – SP     |
| <b>HF17</b>     | <i>Camponotus</i> sp.3 | Horto Florestal – SP     |
| <b>HF19</b>     | <i>Camponotus</i> sp.3 | Horto Florestal – SP     |
| <b>HF21 (A)</b> | <i>Camponotus</i> sp.3 | Horto Florestal – SP     |
| <b>IB07</b>     | <i>Camponotus</i> sp.3 | Instituto Biológico – SP |
| <b>IB08 (A)</b> | <i>Camponotus</i> sp.3 | Instituto Biológico – SP |
| <b>IB18 (A)</b> | <i>Camponotus</i> sp.3 | Instituto Biológico – SP |
| <b>IB25 (A)</b> | <i>Camponotus</i> sp.3 | Instituto Biológico – SP |
| <b>IB31 (A)</b> | <i>Camponotus</i> sp.3 | Instituto Biológico – SP |
| <b>MG03</b>     | <i>Camponotus</i> sp.3 | Uberlândia – MG          |
| <b>PR02 (A)</b> | <i>Camponotus</i> sp.3 | Curitiba – PR            |
| <b>SP08</b>     | <i>Camponotus</i> sp.3 | Campo Limpo – SP         |
| <b>SP10 (A)</b> | <i>Camponotus</i> sp.3 | Guarulhos – SP           |
| <b>HF31 (A)</b> | <i>Camponotus</i> sp.4 | Horto Florestal – SP     |
| <b>HF32 (A)</b> | <i>Camponotus</i> sp.4 | Horto Florestal – SP     |
| <b>HF34 (A)</b> | <i>Camponotus</i> sp.4 | Horto Florestal – SP     |
| <b>IB30 (A)</b> | <i>Camponotus</i> sp.5 | Instituto Biológico – SP |
| <b>HF30 (A)</b> | <i>Camponotus</i> sp.6 | Horto Florestal – SP     |
| <b>IB21 (A)</b> | <i>Camponotus</i> sp.7 | Instituto Biológico – SP |
| <b>MG04</b>     | <i>Camponotus</i> sp.8 | Uberlândia – MG          |
| <b>MG05</b>     | <i>Camponotus</i> sp.9 | Uberlândia – MG          |



SECRETARIA DE  
AGRICULTURA E ABASTECIMENTO



GOVERNO DO ESTADO DE  
**SÃO PAULO**  
TRABALHANDO POR VOCÊ