

ANA LÚCIA BIGGI DE SOUZA

**ESTUDOS GENÉTICOS E COMPORTAMENTAIS EM
ESPÉCIES DE *Wasmannia* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S729e
2007

Souza, Ana Lúcia Biggi de, 1969-

Estudos genéticos e comportamentais em espécies de
Wasmannia (Hymenoptera : Formicidae) / Ana Lúcia
Biggi de Souza. – Viçosa, MG, 2007.
xiii, 61f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Texto em português e inglês.

Orientador: José Eduardo Serrão.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Formiga - Genética. 2. Formiga - Comportamento.
 3. Formiga - Populações. 4. Formiga - Citogenética.
 5. Polimorfismo do DNA ampliado ao acaso.
 6. *Wasmannia*. I. Universidade Federal de Viçosa.
- II. Título.

CDD 22.ed. 595.79613

ANA LÚCIA BIGGI DE SOUZA

**ESTUDOS GENÉTICOS E COMPORTAMENTAIS EM
ESPÉCIES DE *Wasmannia* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 28 de fevereiro de 2007.

**Prof. Lucio Antonio de Oliveira
Campos
(Co-orientador)**

**Prof^a. Mara Garcia Tavares
(Co-orientadora)**

Dr^a. Riviane Rodrigues da Hora

Prof. Jacques Hubert Charles Delabie

**Prof. José Eduardo Serrão
(Orientador)**

Dedico de todo o coração:
aos meus pais, Urânio e Nurimar;
aos meus irmãos, Luciana, Jailson e Luana.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo privilégio de ter realizado um curso de Pós-graduação na Universidade Federal de Viçosa e pelo seu sustento durante a minha estada em Viçosa.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, pela liberação durante quatro anos para que eu pudesse me capacitar na UFV.

Ao meu orientador, Prof. José Eduardo Serrão, pelo seu apoio, disponibilidade, incentivo, amizade, confiança e valiosos ensinamentos, sempre presentes durante a nossa convivência. Muito obrigada.

Ao meu primeiro orientador, Prof. Jacques H. C. Delabie, pelo seu apoio incondicional em todo o Doutorado e desde a Iniciação Científica no Laboratório de Mirmecologia da CEPLAC, na Bahia, há “alguns anos atrás”. Obrigada pela primeira oportunidade em trabalhar com pesquisa. Também agradeço pela doação de material biológico para a tese, pela participação na banca examinadora, dentre outras coisas.

À Profa. Mara Garcia Tavares, pela sua co-orientação, disponibilidade e sugestões valiosas para o desenvolvimento do trabalho de biologia molecular; pela participação na banca examinadora. E à sua orientada, Andréia, pela paciência e ajuda na fase inicial de extração do DNA das formigas.

À Profa. Silvia G. Pompolo, pela sua preciosa orientação, boa vontade e disponibilidade na condução do trabalho de citogenética. À sua orientada, Luísa, pela enorme colaboração. Valeu.

À amiga Cléa, pela sua prontidão e disposição em me auxiliar na preparação das primeiras lâminas de citogenética lá na Bahia. Muito obrigada.

À Dra. Riviane Rodrigues, amiga e colega desde a graduação, pela sua ajuda no trabalho de biologia molecular. Suas sugestões foram muito valiosas. Quem diria que um dia você iria participar da minha banca. Obrigada.

Ao Prof. Lucio Antonio O. Campos, pelo seu interesse no meu trabalho e pela sua enorme disponibilidade no esclarecimento de dúvidas quando recorri a ele; pela participação na banca examinadora e como co-orientador. Muito obrigada.

À Profa. Terezinha M. C. Della Lucia, pela sua ajuda e disponibilidade sempre que precisei, em vários momentos. Sou muito grata.

Ao Prof. Cosme Damião Cruz, pelo seu auxílio e boa vontade na análise estatística dos dados do trabalho de biologia molecular, sempre que precisei.

Ao Prof. Ronaldo Reis e à colega de curso Ana Paula Araújo, pelo auxílio, disponibilidade e boa vontade na análise dos dados comportamentais.

Aos dedicados professores da UFV, que contribuíram para a minha formação.

À Profa. Martha R. B. Smith, por ter me convidado para ir ao Laboratório de Mirmecologia da CEPLAC a fim prestar seleção para um estágio de Iniciação Científica, durante a graduação, sob orientação do Prof. Jacques H. C. Delabie. Foi graças ao seu convite que fui apresentada ao “mundo das formigas”.

À D. Paula, secretária do Programa de Pós-graduação em Entomologia da UFV, pela sua competência e enorme boa vontade em me atender. À atual secretária Miriam, muito obrigada pela colaboração.

Ao Monteiro, técnico do Laboratório de Biologia Celular e Biofísica da UFV, pela sua colaboração quando necessitei.

Ao querido Sr. Manoel, funcionário da UFV, pelo seu generoso auxílio, disposição e muito boa vontade nas idas ao campo para coletar formigas.

Aos amigos José Raimundo e José Crispim, técnicos da CEPLAC, pela valiosa ajuda nas coletas dos ninhos de “pixixica”, pela pronta disposição e boa vontade.

Ao meu irmão Jailson, pela sua enorme ajuda no campo, nas coletas em Jequié e na Fazenda Cordilheira, em Ilhéus. Sua participação foi imprescindível.

Aos colegas do Depto. de Ciências Biológicas da UESB, Josmar e Ana Cristina, por terem cedido a casa deles para hospedagem durante o período de coletas de formigas em Jequié.

À querida aluna de graduação da UFV, Larissa Tavares Cyrino, pelo seu precioso auxílio nas atividades de laboratório da tese e pela sua amizade. Obrigada.

Aos colegas do curso de PG em Entomologia, não me esquecerei de vocês.

Aos colegas do Laboratório de Mirmecologia da CEPLAC, não me esqueço de vocês.

Às minhas amigas, Ilka, Acácia, Paula, Fabrícia, Gabriela e Mariáurea, sempre presentes e dispostas a ajudar. Obrigada pelos momentos felizes que compartilhamos.

Especialmente à Fabrícia, por providenciar as cópias da tese pra mim. Serei eternamente grata.

Aos queridos colegas do Laboratório de Biologia Celular e Biofísica da UFV, pelo companheirismo, pela boa vontade em ajudar, pelos momentos de conversa e

descontração: Acácia, Adriana, Andréia, Carol, Cirlei, Conceição, Daniela, Dihego, Edmilson, Felipe, Gustavo, Letícia, Madu, Maria Ignês, Milton, Rafael, Rejane, Simone, Solange e Taiane.

À Carol e Dihego, pela ajuda no computador quando precisei, principalmente com imagens.

À Simone, pela sua ajuda na confecção de pranchas quando necessitei.

À Conceição, pelos papos gostosos e divertidos.

Agradeço aos amigos Marcus e Adriana, por terem me recebido de braços abertos quando cheguei a Viçosa, fazendo com que eu me sentisse “em casa”.

À minha família pelo apoio sempre presente. Amo vocês.

À FAPEMIG e FAPESB/PRONEX/CNPq 048/2003 pelo apoio logístico.

BIOGRAFIA

ANA LÚCIA BIGGI DE SOUZA, filha de Urânio de Souza e Nurimar Biggi de Souza, nasceu no Rio de Janeiro, RJ, em 12 de abril de 1969.

Em 1992, graduou-se em Ciências Biológicas (Licenciatura), pela Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), em Ilhéus, Bahia.

Durante o último ano de graduação foi bolsista de iniciação científica no Laboratório de Mirmecologia da CEPLAC, Ilhéus, Bahia, sob a orientação do Professor Jacques Hubert Charles Delabie.

De 1993 até o início de 1994 foi bolsista de aperfeiçoamento pelo CNPq na UNESP de Rio Claro, sob a orientação do Prof. Harold Gordon Fowler.

Em março de 1994, iniciou o Mestrado em Ciências Biológicas (Zoologia) pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), campus de Botucatu, vindo a defender a dissertação em 10 de dezembro de 1996.

Entre os anos de 1997 e 1999 foi professora visitante na UESC, ministrando aulas para o curso de Ciências Biológicas.

De 1999 até o final de 2002 passou a lecionar na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), tendo sido liberada em 2003 para cursar o doutorado em Entomologia na Universidade Federal de Viçosa, vindo a defender tese em 28 de fevereiro de 2007.

SUMÁRIO

| | Página |
|--|--------|
| RESUMO | ix |
| ABSTRACT | xi |
| 1. INTRODUÇÃO GERAL | 1 |
| 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 9 |
| CAPÍTULO 1: Variabilidade genética de populações nativas de <i>Wasmannia auropunctata</i> e <i>W. sp. aff. rochai</i> (Hymenoptera: Formicidae, Myrmicinae) e suas implicações biogeográficas | 17 |
| Resumo | 17 |
| Abstract | 18 |
| Introdução | 19 |
| Material e Métodos | 21 |
| Resultados | 23 |
| Discussão | 27 |
| Referências | 30 |
| CAPÍTULO 2: Estudo citogenético da formiga neotropical <i>Wasmannia auropunctata</i> (Roger, 1863) (Hymenoptera: Formicidae, Blepharidattini) | 35 |
| Resumo | 35 |
| Abstract | 35 |
| Introdução | 36 |
| Material e Métodos | 38 |
| Resultados | 38 |
| Discussão | 40 |
| Referências | 43 |

| | |
|---|----|
| CAPÍTULO 3: Intercolonial and interspecific aggressiveness of <i>Wasmannia auropunctata</i> (Roger, 1863) (Hymenoptera: Formicidae) | 50 |
| Resumo | 50 |
| Abstract | 50 |
| Introduction | 51 |
| Material and Methods | 52 |
| Results | 53 |
| Discussion | 56 |
| References | 58 |
| 3. CONCLUSÕES GERAIS | 61 |

RESUMO

SOUZA, Ana Lúcia Biggi de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2007. **Estudos genéticos e comportamentais em espécies de *Wasmannia* (Hymenoptera: Formicidae)**. Orientador: José Eduardo Serrão. Co-orientadores: Lucio Antonio de Oliveira Campos e Mara Garcia Tavares.

Wasmannia auropunctata (Roger, 1863) (Myrmicinae) é um dos principais problemas nos cacauais das regiões sudeste e sudoeste da Bahia, Brasil, devido as suas ferroadas poderosas. *Wasmannia* sp. aff. *rochai* pode ser confundida como *W. auropunctata* no campo. Este estudo foi desenvolvido com o propósito de caracterizar *W. auropunctata* e *W. sp. aff. rochai* dos pontos de vista genético e/ou comportamental, a fim de distinguir populações de ambas as espécies. Foram analisados a estrutura genética de populações nativas de *W. auropunctata* e *W. sp. aff. rochai*, o cariótipo e a marcação cromossômica heterocromática de *W. auropunctata*, e a agressividade intercolonial e interespecífica entre operárias de *W. auropunctata* na sua região de origem. Marcadores moleculares RAPD (polimorfismo de DNA amplificado ao acaso) permitiram a distinção entre as populações de *W. auropunctata* e *W. sp. aff. rochai*, e a análise da variabilidade genética de populações destas espécies provenientes do Brasil (estado da Bahia) e/ou da Guiana Francesa. As distâncias genéticas entre as populações de *W. auropunctata* e *W. sp. aff. rochai* (55,8 – 71,4%) evidenciam a diferenciação genética entre as mesmas. As elevadas distâncias entre as populações de *W. auropunctata* da Ceplac/Ilhéus (26,8 – 34,6%), assim como entre as demais populações de Ilhéus em relação às da Ceplac/Ilhéus (23,3 – 40,8%), podem ser justificadas relacionando-se esta informação com a existência de comportamentos agressivos entre operárias de *W. auropunctata* não companheiras de ninho da região sudeste da Bahia, o que reflete a estrutura multicolonial nesta espécie em áreas nativas de Ilhéus. O elevado polimorfismo (99,5%) e os valores das heterozigosidades estimadas (Ilhéus: 0,407; Jequié: 0,415; Guiana Francesa: 0,386) sugerem que as populações de *W. auropunctata* oriundas da faixa que vai da Guiana Francesa ao sudeste da Bahia (Ilhéus) localizam-se no centro geográfico da área de dispersão desta espécie. O estudo citogenético conduzido com populações de *W. auropunctata* revelou um cariótipo de $2n = 32$, sendo dez pares metacêntricos (M) e seis pares acrocêntricos (A). Um dos braços das cromátides irmãs do décimo par foi positivo para CMA₃ e

laranja de acridina, sugerindo a ocorrência de regiões organizadoras de nucléolo. A região pericentromérica da maioria dos cromossomos e algumas partes dos núcleos interfásicos foram marcadas com DAPI. Este é o primeiro registro citogenético para uma espécie de *Blepharidattini*. Os testes de agressividade entre operárias de *W. auropunctata* de colônias distintas e entre operárias de *W. auropunctata* frente a operárias de *Pheidole* sp., provenientes dos estados da Bahia (Ilhéus) e Minas Gerais (Viçosa), demonstraram que operárias de *W. auropunctata* foram mais ou igualmente agressivas nos confrontos intercoloniais do que nos interespecíficos. Os dados mostraram que os confrontos intercoloniais mais agressivos ocorreram entre operárias de *W. auropunctata* geneticamente distantes, como confirmado pelo estudo molecular realizado com algumas das colônias utilizadas nos confrontos. Sendo assim, assume-se que *W. auropunctata* apresenta estrutura multicolonial na sua região nativa e que outras espécies de formigas podem coexistir com ela na mesma área, desde que os seus limites territoriais sejam mantidos.

ABSTRACT

SOUZA, Ana Lúcia Biggi de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2007. **Genetic and behavioral studies in species of *Wasmannia* (Hymenoptera: Formicidae)**. Adviser: José Eduardo Serrão. Co-Advisers: Lucio Antonio de Oliveira Campos and Mara Garcia Tavares.

Wasmannia auropunctata (Roger, 1863) (Myrmicinae) is the main problem in cocoa plantations in the Southeast and Southwest regions of Bahia, Brazil, due to its painful stings. *Wasmannia* sp. aff. *rochai* may be misidentified as *W. auropunctata* in the field. This study was performed to characterize the genetic and behavioral patterns of *W. auropunctata* and *W.* sp. aff. *rochai*, in order to distinguish populations of both species. The genetic structure of native *W. auropunctata* and *W.* sp. aff. *rochai* populations, the karyotype and heterochromatic chromosomal staining of *W. auropunctata*, and the intercolonial and interspecific aggressiveness between workers of *W. auropunctata* in its region of origin were analyzed. Random amplified polymorphic DNA markers (RAPD) was a useful tool for the distinction among the populations of both *Wasmannia* species, and the analyses of genetic variability of native *W. auropunctata* and *W.* sp. aff. *rochai* populations from Brazil (state of Bahia) and from French Guiana, in the former species. The genetic distances among populations of *W. auropunctata* and *W.* sp. aff. *rochai* (55.8 – 71.4%) reflect the genetic difference among them. The high genetic distances among the *W. auropunctata* populations from Ceplac/Ilhéus (26.8 – 34.6%), as well as among other populations from Ilhéus in comparison to Ceplac/Ilhéus (23.3 – 40.8%), may be due to the existence of aggressive behavior between conspecific non-nestmates of *W. auropunctata* from Southeast region of Bahia, reflecting that this species has a multicolonial structure in native areas from Ilhéus. The high polymorphism (99.5%) and the values of estimated heterozygosities (Ilhéus: 0.407; Jequié: 0.415; French Guiana: 0.386) suggest that *W. auropunctata* populations from French Guiana to the Southeast region of Bahia (Ilhéus) may be situated in the geographic center of dispersal area of this species. The cytogenetic study of *W. auropunctata* showed a karyotype of $2n = 32$, with ten pairs of metacentric (M) and six pairs of acrocentric (A) chromosomes. One chromosome arm of sister chromatids of pair ten was positive for CMA₃ and acridine orange, suggesting the occurrence of nucleolus organizing regions. The pericentromeric region from many chromosomes and some

portions of interfasic nucleus were DAPI positive. This is the first cytogenetic report for a species of Blepharidattini ants. The aggressiveness tests among *W. auropunctata* workers of distinct colonies and among *W. auropunctata* workers and *Pheidole* sp. workers, from Bahia (Ilhéus) and Minas Gerais (Viçosa), showed that *W. auropunctata* workers were more or equally aggressive in the intercolonial confrontations than in the interspecific ones. The data showed that the more aggressive intercolonial confrontations occurred among *W. auropunctata* workers distant genetically, as confirmed for molecular study carried out in the same colonies used in the confrontations. Therefore, *W. auropunctata* has multicolonial structure in its native region and other species of ants may coexist with it in the same area, since territorial limits remain.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Wasmannia auropunctata (Roger, 1863) (Myrmicinae: Blepharidattini) é uma formiga amarelo-avermelhada de 1,5 mm que apresenta antena de 11 segmentos, com clava antenal de três segmentos, um par de espinhos no epinoto e é equipada com ferrão (Delabie, 1988). A cabeça e o tórax são esculpturados com estrias e sulcos. Os pêlos corporais são longos e esparsos. O pedicelo, entre o tórax e o gáster, tem dois segmentos, o pecíolo e o pós-pecíolo (Wetterer & Porter, 2003).

Aspectos gerais da biologia de *W. auropunctata* foram estudados por Ulloa-Chacon & Cherix (1988, 1989) em condições de laboratório, sendo determinados os estágios de desenvolvimento da casta operária e a duração do ciclo biológico: ovo (nove dias), larva (17 dias), pupa (11-12 dias), totalizando 35 dias de ovo a adulto. A fecundidade das rainhas indica uma alta taxa de oviposição: 599 ± 193 ovos por rainha/12 semanas. O período de vida das rainhas é de aproximadamente um ano.

A distribuição geográfica de *W. auropunctata* é ampla, sendo encontrada na Argentina (Kusnezov, 1952), Venezuela (Goitia *et al.*, 1992), Brasil (Delabie, 1990), Porto Rico (Smith, 1936; Torres, 1984), Jamaica (Wheeler, 1908), Costa Rica e Panamá (Tennant, 1994). Esta espécie foi introduzida em ilhas do Pacífico, como na Nova Caledônia (Fabres & Brown, 1978) e em Galápagos (Clark *et al.*, 1982; Lubin, 1984; La Vega, 1994), no México (Horvitz & Schemske, 1984), Estados Unidos (Spencer, 1941; Fernald, 1947), Canadá (Naumann, 1994) e em países africanos, como Camarões (Bruneau de Miré, 1969) e Gabão (Wetterer *et al.*, 1999). Em 2004, ela chegou a Israel (Abraham Hefetz, comunicação pessoal).

Wasmannia auropunctata nidifica em diferentes habitats, em climas semi-áridos a úmidos (Spencer, 1941; Kusnezov, 1952), mas prefere condições de umidade elevada (Lubin, 1984). Seus ninhos são geralmente estabelecidos ao nível do solo, próximos à superfície e localizam-se sob pedras, por entre folhas caídas no chão, em galhos ocos, tocos podres (Clark *et al.*, 1982; Torres, 1984; Naumann, 1994), em torno de raízes, em cavidades de plantas (Spencer, 1941; Ulloa-Chacon & Cherix, 1988), sob os “tapetes” de briófitas e cascas grossas das árvores, e sob as bases das folhas de palmeiras (Wheeler, 1908; Kusnezov, 1952; Fabres & Brown, 1978).

Wasmannia auropunctata é oportunista e polífaga, alimentando-se de “seiva” (honeydew) eliminada por insetos sugadores (Spencer, 1941; Clark *et al.*, 1982),

materiais vegetais (sementes, flores e folhas) (Clark *et al.*, 1982; Torres, 1984), néctar floral e extra-floral (Lubin, 1984), uma grande variedade de presas (artrópodos, gastrópodos e anelídeos) e insetos mortos (Spencer, 1941; Kusnezov, 1952; Torres, 1984). Nas residências humanas, as formigas desta espécie são atraídas por gordura ou material oleoso (Fernald, 1947). Por ser polidômica, ou seja, formar ninhos fragmentados, de forma que uma mesma colônia é distribuída por vários ninhos (Wetterer & Porter, 2003), e devido ao seu sistema de recrutamento massal, *W. auropunctata* é capaz de encontrar e explorar um grande número de fontes alimentares, localizando-as mais rapidamente do que outras espécies de formigas. Além disso, ela produz alomônio que impede o acesso de outras espécies ao alimento (Meier, 1985; La Vega, 1994). Este alomônio é o alquilpirazine produzido pelas glândulas mandibulares, que também é utilizado como feromônio de defesa e de alarme (Howard *et al.*, 1982).

As colônias de *W. auropunctata* são frequentemente poligínicas (Smith, 1965; Fabres & Brown, 1978; Delabie, 1988; Ulloa-Chacon & Cherix, 1989), isto é, na mesma colônia coexistem duas ou mais rainhas que põem ovos (Hölldobler & Wilson, 1990). As jovens rainhas podem ser fertilizadas no próprio formigueiro (Ulloa-Chacon & Cherix, 1989).

A estrutura colonial focalizando a unicolonialidade e multicolonialidade em *W. auropunctata* foi estudada por Errard *et al.* (2002), Le Breton *et al.* (2004) e Errard *et al.* (2005). Na estrutura unicolonial, existe uma ausência de comportamento agressivo entre indivíduos de diferentes ninhos de uma mesma espécie, sendo que esta tolerância facilita a troca de indivíduos de ninhos distintos, o que não significa que exista ausência de reconhecimento colonial, de modo que a abertura da sociedade unicolonial tem certos limites (Passera, 1994; Tsutsui & Suarez, 2003). Já na estrutura multicolonial há ocorrência de comportamento agressivo entre não companheiros de ninho (Le Breton *et al.*, 2004).

Wasmannia auropunctata é considerada praga em situação de desequilíbrio ecológico, causando danos agrícolas (Delabie & Cazorla, 1991; Souza *et al.*, 1998) e sendo responsável pelo deslocamento da fauna nativa de formigas (Clark *et al.*, 1982; Lubin, 1984; Meier, 1994). No entanto, em floresta tropical primária, onde vive naturalmente ela não é dominante como ocorre em ambientes alterados (Levings & Franks, 1982), coexistindo com diversas espécies de formigas (Tennant, 1994). Esta formiga é nativa da zona Neotropical (Passera, 1994) e foi acidentalmente

introduzida em várias regiões do mundo (Fernald, 1947; Lubin, 1984), tendo sido espalhada pelo tráfego comercial (Kempf, 1972).

Grande parte dos estudos com *W. auropunctata* trata sobre o seu potencial invasivo (Clark *et al.*, 1982; Abedrabbo, 1994; La Vega, 1994; Meier, 1994; Ambrecht & Ulloa-Chacon, 2003), uma vez que ela é uma formiga “vagabunda” (*tramp ant*) (Hölldobler & Wilson, 1990; Passera, 1993, 1994) e pertence à categoria de espécies invasoras (McGlynn, 1999). Segundo Hölldobler & Wilson (1990), formigas “vagabundas” são caracterizadas por serem poligínicas, unicloniais, cujos ninhos se multiplicam por brotamento, dispersarem-se pelo mundo através do transporte humano e viverem em íntima associação com estes. Passera (1993, 1994) complementou esta definição acrescentando que as formigas “vagabundas” são pequenas, com casta de operárias estéreis e que apresentam uma redução ou ausência de vôo nupcial. McGlynn (1999) faz uma distinção entre formiga “vagabunda” e formiga invasora. Ele argumenta que as “vagabundas” tendem a ocupar nichos vazios quando colonizam novos ambientes, raramente deslocando as espécies nativas, já as espécies invasoras competem com as formigas nativas, afastando-as, e monopolizam seus recursos alimentares.

Wasmannia auropunctata apresenta um conjunto de características que contribuem para o seu sucesso ecológico, podendo ser citada a sua capacidade como colonizadora, capaz de aproveitar-se de alterações temporárias em certos ecossistemas e a de deslocar algumas espécies de formigas de seus nichos de origem, utilizando, então, os lugares de nidificação, como ocorre com *Pheidole williamsi*, ou por competição alimentar, como com *Dorymyrmex albemarlensis* nas Ilhas Galápagos (Lubin, 1984). Neste sentido, *W. auropunctata* pode ser classificada como uma formiga invasora.

Tentativas de erradicação têm sido efetuadas visando controlar a incidência de *W. auropunctata* nas regiões aonde se tornou praga, como na Ilha Santa Fé, em Galápagos (Abedrabbo, 1994). Estudos feitos com hormônios reguladores de crescimento (Ulloa-Chacon & Cherix, 1990; Ulloa-Chacon & Cherix, 1994) e substâncias químicas à base de Amdro (Williams & Whelan, 1992) têm permitido a formulação de iscas visando o seu controle.

A presença de *W. auropunctata* em determinados ecossistemas e cultivos situados na sua área de distribuição nativa não tem ocasionado apenas efeitos negativos, mas também positivos. Em plantações de cacauzeiros de Barlovento,

Venezuela, a presença desta formiga não só favoreceu a polinização das flores em 46%, agindo diretamente como polinizador ou inter-atuando com os polinizadores, como também contribuiu para a diminuição da incidência do inseto fitófago *Selenothrips rubrocinctus* Giard (Thripidae) (Goitia *et al.*, 1992). Em uma floresta tropical do México, as inflorescências da planta *Calathea ovandensis* (Marantaceae) visitadas por *W. auropunctata* foram as que mais produziram sementes, embora esta formiga não tenha efetuado a dispersão das mesmas (Horvitz & Schemske, 1984).

Estudos sobre a estrutura populacional de *W. auropunctata* têm sido realizados com o uso de marcadores moleculares. Fournier *et al.* (2005a) investigaram a estrutura genética de populações nativas e introduzidas de *W. auropunctata* com microsátélites e detectaram número de alelos e heterozigosidade esperada superiores em populações nativas da Guiana Francesa do que em populações introduzidas da Nova Caledônia. Fournier *et al.* (2005b) encontraram diferenciação genética elevada entre genótipos de rainhas de *W. auropunctata* de ninhos distintos da Guiana Francesa, embora dentro de cada ninho as rainhas pertencessem a uma mesma linhagem genética, sendo produzidas através de reprodução clonal, pelo mecanismo de partenogênese telítoca apomítica (produção de fêmeas a partir de ovos diplóides por mitose, sem meiose). Machos idênticos também foram encontrados, tendo sido sugerido que foram produzidos através da eliminação do genoma materno de ovos diplóides, na tentativa de compensar a diminuição do “fitness” dos machos provocado pela produção de rainhas idênticas (Fournier *et al.*, 2005b). Em populações introduzidas de *W. auropunctata* da Nova Caledônia, Foucaud *et al.* (2006) detectaram a ocorrência de eventos raros de reprodução sexuada no sistema de reprodução clonal, levando à produção de novas linhagens clonais derivadas, de forma que o genoma de rainhas e machos não é estritamente separado um do outro como ocorre na Guiana Francesa, sugerindo que parte das rainhas é produzida por partenogênese telítoca automítica (ocorrência de meiose, sendo a diploidia restaurada pela fusão de dois ovócitos) e que os machos resultam da fertilização de óvulos “vazios”, em que falta o material genômico materno, produzidos por um número limitado de rainhas.

Marcadores RAPD (polimorfismo de DNA amplificado ao acaso), uma das derivações da PCR (reação em cadeia da polimerase), têm sido amplamente empregados em estudos genéticos com populações de insetos (Hoy, 1994; Ferreira & Grattapaglia, 1998), sendo úteis para o estudo da variabilidade genética de

populações de himenópteros eussociais, que geralmente apresentam baixa variabilidade (Wilson, 1971; Shoemaker *et al.*, 1992), permitindo a detecção de numerosos polimorfismos. Os fatores que contribuem para esta baixa variabilidade envolvem os alelos em genomas haplóides, os quais estão sujeitos a um alto nível de seleção, o pequeno tamanho efetivo da população associado à haploidia dos machos e a ocorrência de taxas de recombinação reduzidas. Além disso, o endocruzamento e a estabilidade das condições ambientais no ninho também são causas da baixa variabilidade genética (Shoemaker *et al.*, 1992).

A técnica de RAPD utiliza “primers” ou oligonucleotídeos curtos (10 pares de bases) para dirigir a reação de amplificação de vários locos anônimos no genoma. Apesar de os “primers” possuírem seqüência arbitrária, a amplificação não ocorre ao acaso e sim em lugares específicos no genoma (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Esta técnica requer pouca quantidade de DNA, sendo adequada para a investigação genética de insetos pequenos (Hoy, 1994).

Em se tratando de formigas, Shoemaker *et al.* (1994) registraram padrões de bandas RAPD que refletiram variabilidade genética considerável, os quais permitiram a distinção entre populações de *Solenopsis invicta* e *Solenopsis richteri* introduzidas nos EUA. Ross *et al.* (1999) utilizaram diversos marcadores moleculares, inclusive RAPD, para revelar a estrutura genética de populações de *S. invicta* nos EUA. Hasegawa (1995) estudou a estrutura reprodutiva de colônias de *Camponotus (Colobopsis) nipponicus* com marcadores RAPD, os quais permitiram o agrupamento das rainhas com as suas filhas em sociedades poligínicas, mesmo sem a informação paterna. Julian *et al.* (2002) usaram estes marcadores para examinar padrões genotípicos entre operárias irmãs, rainhas e machos de *Pogonomyrmex rugosus* e *Pogonomyrmex barbatus*, as quais ocorrem em simpatria e alopatria, nos EUA e México. A diferenciação genética entre as operárias e rainhas foi encontrada apenas em áreas de simpatria e parece surgir de hibridização, a qual apresenta um efeito sobre o sistema de determinação de castas e padrões de acasalamento de cada uma das espécies.

Além de estudos moleculares com formigas, trabalhos na área de citogenética têm permitido fazer inferências sobre determinados aspectos evolutivos dentro da família Formicidae. Segundo Mariano (2004), existem 514 táxons de formigas estudados citogeneticamente, com uma variação espetacular ($2n = 2$ a 106) quando comparada a outros artrópodes. Entretanto, ainda são poucas as informações

disponíveis sobre a estrutura dos cromossomos nesta família diante do grande número de espécies descritas (Delabie & Mariano, 2005).

Segundo Delabie & Mariano (2005), a diversidade cariotípica em formigas varia de acordo com a gênese do grupo estudado: nas espécies pertencentes a grupos considerados mais derivados, no caso das Attini superiores e nos gêneros com maior amplitude geográfica (*Camponotus* e *Pheidole*), os cariótipos sofrem poucas variações numéricas e estruturais (Mariano *et al.*, 2003; Pompolo & Mariano, 2003; Mariano, 2004); já em gêneros, tribos ou subfamílias “primitivos”, como parece ser o caso das *Pachycondyla* neotropicais (Delabie & Mariano, 2005), a variação cariotípica é ampla, provavelmente por estes já terem passado por uma complexa seqüência de processos de adaptação (Mariano *et al.*, 2001; Mariano, 2004).

A citogenética é uma ferramenta poderosa para estudos sistemáticos e filogenéticos, a qual pode revelar diferenças e/ou similaridades entre espécies. Em se tratando de estudos populacionais, convém que os conhecimentos citogenéticos sejam aliados aos de outras áreas, como a biologia molecular, para proporcionar resultados complementares, uma vez que a citogenética deverá oferecer argumentos sobre o isolamento reprodutivo das populações, enquanto as técnicas moleculares podem servir para caracterizar as mesmas (Delabie & Mariano, 2005).

Aspectos genéticos e comportamentais também têm sido abordados em vários estudos com formigas, os quais relacionam a diversidade genética populacional com a incidência de comportamentos agressivos frente a indivíduos da mesma colônia, de colônias distintas ou mesmo de outra espécie de formiga (Vilela & Della Lucia, 1993; Suarez *et al.*, 1999; Tsutsui *et al.*, 2000; Giraud *et al.* 2002). Isto porque os sinais utilizados no sistema de reconhecimento colonial em formigas são em parte determinados geneticamente, mas também sofrem influência do ambiente (Hölldobler & Michener, 1980; Beye *et al.*, 1998). O reconhecimento de companheiros de ninho permite que os membros de uma colônia sejam aceitos e os não residentes, atacados. A intensidade da inspeção feita por uma operária com o auxílio das antenas depende da familiaridade dos sinais detectados. A hostilidade obedecerá a um gradiente de resposta que pode ir da aceitação a ataques de extrema violência (Vilela & Della Lucia, 1993).

O modelo geral de reconhecimento utilizado nos insetos sociais é designado fenótipo equivalente. De acordo com este modelo, para que haja reconhecimento, deve haver uma equivalência ou sobreposição dos sinais: rótulo (discriminador

produzido pelo membro da colônia, a partir de informação genética) e gabarito (sinal aprendido, cuja capacidade de aprendizado é determinada geneticamente). A comparação é estabelecida entre o rótulo e o gabarito ou com o padrão de odores aceitáveis aprendido pelas operárias (odor *Gestalt*). Assim, considera-se que o reconhecimento leva em consideração tanto o componente expressivo (inato ou genético) quanto o perceptivo (aprendido ou adquirido pela experiência) (Hölldobler & Wilson, 1990).

Os estudos genético-comportamentais com formigas têm demonstrado diferenças em se tratando de populações nativas e introduzidas, de modo que, nas populações introduzidas, a variação genética intercolonial é reduzida e a agressão é rara entre seus membros (Suarez *et al.*, 1999; Tsutsui *et al.*, 2000), mas é comum entre populações nativas, nas quais o reconhecimento de companheiros de ninho tem forte influência genética (Beye *et al.*, 1998). Variações genético-comportamentais foram observadas nas formigas *Linepithema humile* (Suarez *et al.*, 1999; Tsutsui *et al.*, 2000; Giraud *et al.*, 2002), *S. invicta* (Tsutsui & Suarez, 2003) e *Formica pratensis* (Beye *et al.*, 1998). Tsutsui *et al.* (2003) detectaram que colônias de *L. humile* com menor diversidade genética distribuídas na Califórnia atacaram indivíduos de colônias com maior diversidade genética desta localidade, de modo que este mecanismo deve funcionar como uma barreira para o estabelecimento de introduções de novas linhagens genéticas a partir de populações nativas, as quais poderiam prejudicar a manutenção das populações introduzidas nas áreas colonizadas por elas. Giraud *et al.* (2002) observaram alta agressividade entre as duas populações unicoloniais de *L. humile* existentes no sul da Europa, o que indica a fixação de diferentes alelos relacionados à produção dos sinais de reconhecimento nestas populações.

Tsutsui & Suarez (2003) sugerem que estudos genéticos e comportamentais devem ser estendidos a populações nativas e introduzidas de outras espécies de formigas invasoras, incluindo *W. auropunctata*, a fim de auxiliar na previsão do estabelecimento destas espécies em novas áreas.

No Brasil, especificamente nas regiões sudeste e sudoeste da Bahia, *W. auropunctata*, conhecida localmente como “pixixica”, apresenta ampla distribuição e é um dos principais problemas enfrentados pelos cacauicultores, por causa das ferroadas dolorosas sofridas pelos trabalhadores rurais quando estes estão colhendo os frutos e também devido à sua capacidade de se associar com uma grande

diversidade de insetos sugadores de seiva (e.g. Coccidae, Aphididae, Psyllidae, Aleurodidae) (Delabie, 1988). Souza *et al.* (1998) verificaram que em áreas infestadas por *W. auropunctata* as populações de *Planococcus citri* (Coccidae) em frutos de cacau foram três vezes maiores do que quando estes insetos estão associados a *W. sp. aff. rochai*, embora a ocorrência desta última tenha provocado um aumento de 20% nas populações de *P. citri*, o que pode ser economicamente significativo. Delabie & Cazorla (1991) quantificaram a influência de *P. citri* em cacauzeiros infestados por *W. auropunctata* e estimaram entre 4 a 9% a perda na produção de cacau.

Wasmannia auropunctata é facilmente confundida no campo com *W. sp. aff. rochai*, a qual apresenta distribuição mais restrita no sudeste e sudoeste da Bahia e não constitui ameaça em ecossistemas perturbados, como *W. auropunctata* (Levings & Franks, 1982), já que não é dominante no mosaico de espécies arborícolas que compõem o agrossistema regional (Majer *et al.*, 1994). Além disso, o gênero *Wasmannia* carece de revisão sistemática atualizada e há certamente diversas espécies novas a serem descritas. Devido a esta problemática, este estudo foi desenvolvido com o propósito de caracterizar *W. auropunctata* e *W. sp. aff. rochai* dos pontos de vista genético e/ou comportamental, a fim de distinguir populações de ambas as espécies. Para tanto, foram analisados os seguintes aspectos:

- A estrutura genética de populações nativas de *W. auropunctata* e *W. sp. aff. rochai*.
- O cariótipo e a marcação cromossômica heterocromática de *W. auropunctata*.
- A agressividade intercolonial e interespecífica entre operárias de *W. auropunctata* na sua região de origem.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abedrabbo, S. 1994. Control of the little fire ant, *Wasmannia auropunctata*, on Santa Fe Island in the Galapagos Islands. *In*: Williams, D. F. (Ed.). **Exotic ants: biology, impact and control of introduced species**. Colorado: Westview Press. p. 219-227.
- Ambrecht, I., Ulloa-Chácon, P. 2003. The little fire ant *Wasmannia auropunctata* (Roger) (Hymenoptera: Formicidae) as a diversity indicator of ants in tropical dry forest fragments of Colombia. **Environmental Entomology** 32 (3): 542-547.
- Beye, M. *et al.* 1998. Nestmate recognition and the genetic relatedness of nests in the ant *Formica pratensis*. **Behavioral Ecology and Sociobiology** 43: 67-72.
- Bruneau de Miré, P. 1969. Une fourmi utilisée au Cameroun dans la lutte contre les mirides du cacaoyer *Wasmannia auropunctata* Roger. **Café Cacao Thé** 13(3): 209-212.
- Clark, D. B. *et al.* 1982. The tramp ant *Wasmannia auropunctata*: autecology and effects on ant diversity and distribution on Santa Cruz Island, Galapagos. **Biotropica** 14(3): 196-207.
- Delabie, J. H. C. 1988. Ocorrência de *Wasmannia auropunctata* (Roger, 1863) (Hymenoptera, Formicidae, Myrmicinae) em cacauais na Bahia, Brasil. **Revista Theobroma** 18(1): 29-37.
- Delabie, J. H. C. 1990. The ant problems of cocoa farms in Brazil. *In*: Vander Meer, R. K., Jaffe, K., Cedeno, A. (Eds.). **Applied myrmecology: a world perspective**. Colorado: Westview Press. p. 555-569.
- Delabie, J. H. C., Cazorla, I. M. 1991. Danos causados por *Planococcus citri* Risso (Homoptera, Pseudococcidae) na produção do cacauzeiro. **Agrotrópica** 3: 53-57.

- Delabie, J. H. C., Mariano, C. S. F. 2005. Diversidade, citogenética e inflação taxonômica em Formicidae. *In*: Ulloa-Chacon, P., Chaves, M. C. (Eds.). **Memorias do V Coloquio de Insectos Sociales**. Colombia: Ed. Universidad del Valle. p. 29-34.
- Errard, C. *et al.* 2002. Discrimination intra et interspécifique chez la fourmi vagabonde *Wasmannia auropunctata*. **Actes des Colloques Insectes Sociaux** 15: 82-89.
- Errard, C. *et al.* 2005. Intercontinental chemical variation in the invasive ant *Wasmannia auropunctata* (Roger) (Hymenoptera: Formicidae): a key to the invasive success of a tramp species. **Naturwissenschaften** 92: 319-323.
- Fabres, G., Brown, W. L., Jr. 1978. The recent introduction of the pest ant *Wasmannia auropunctata* into New Caledonia. **Journal of the Australian Entomological Society** 17: 139-142.
- Fernald, H. T. 1947. The little fire ant as a house pest. **Journal of Economic Entomology** 40(3): 428.
- Ferreira, M. E., Grattapaglia, D. 1998. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. 220 p.
- Foucaud, J. *et al.* 2006. Rare sexual reproduction events in the clonal reproduction system of introduced populations of the little fire ant. **Evolution** 60(8): 1646-1657.
- Fournier, D. *et al.* 2005a. Characterization and PCR multiplexing of polymorphic microsatellite loci for the invasive ant *Wasmannia auropunctata*. **Molecular Ecology Notes** 5: 239-242.
- Fournier, D. *et al.* 2005b. Clonal reproduction by males and females in the little fire ant. **Nature** 435: 1230-1234.
- Giraud, T., Pedersen, J. S., Keller, L. 2002. Evolution of supercolonies: the argentine ants of southern Europe. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 99(9): 6075-6079.

- Goitia, W., Bosque, C., Jaffe, K. 1992. Interacción hormiga-polinizador en cacao. **Turrialba** 42(2): 178-186.
- Hasegawa, E. 1995. Parental analysis using RAPD markers in the ant *Colobopsis nipponicus*: a test of RAPD markers for estimating reproductive structure within social insect colonies. **Insectes Sociaux** 42: 337-346.
- Hölldobler, B., Michener, C. D. 1980. Mechanisms of identification and discrimination in social Hymenoptera. *In*: Markl, H. (Ed.). **Evolution of Social Behavior: Hypotheses and Empirical Tests**. Weinheim: Chemie GmbH. p. 35-57.
- Hölldobler, B., Wilson, E. O. 1990. **The ants**. Cambridge: Belknap Press of Harvard University Press. 732 p.
- Horvitz, C. C., Schemske, D. W. 1984. Effects of ants and an ant-tended herbivore on seed production of a neotropical herb. **Ecology** 65(5): 1369-1378.
- Howard, D. F. *et al.* 1982. Behavioral responses to an alkylpyrazine from the mandibular gland of the ant *Wasmannia auropunctata*. **Insectes Sociaux** 29(2): 369-374.
- Hoy, M. A. 1994. **Insect molecular genetics**. California: Academic Press. 546 p.
- Julian, G. E. *et al.* 2002. Genetic determination of the queen caste in ant hybrid zone. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 99(12): 8157-8160.
- Kempf, W. W. 1972. Catálogo abreviado das formigas da região neotropical (Hymenoptera: Formicidae). **Studia Entomologica** 15(1/4): 3-344.
- Kusnezov, N. 1952. El género *Wasmannia* en la Argentina (Hymenoptera, Formicidae). **Acta Zoologica Lilloana** 10: 173-182.

- La Vega, I. 1994. Food searching behavior and competition between *Wasmannia auropunctata* and native ants on Santa Cruz and Isabela, Galapagos islands. *In*: Williams, D. F. (Ed.). **Exotic ants: biology, impact and control of introduced species**. Colorado: Westview Press. p. 73-79.
- Le Breton, J. *et al.* 2004. Experimental evidence of large-scale unicoloniality in the tramp ant *Wasmannia auropunctata* (Roger). **Journal of Insect Behavior** 17(2): 263-271.
- Levings, S. C., Franks, N. R. 1982. Patterns of nest dispersion in a tropical ground ant community. **Ecology** 63(2): 338-344.
- Lubin, Y. D. 1984. Changes in the native fauna of the Galapagos Islands following invasion by the little fire ant, *Wasmannia auropunctata*. **Biological Journal of the Linnean Society** 21(1/2): 229-242.
- Majer, J. D., Delabie, J. H. C., Smith, M. R. B. 1994. Arboreal ant community patterns in brazilian cocoa farms. **Biotropica** 26(1): 73-83.
- Mariano, C. S. F. 2004. **Evolução cariotípica em diferentes grupos de Formicidae**. Tese (Doutorado em Entomologia) – Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Minas Gerais. 205 p.
- Mariano, C. S. F. *et al.* 2001. O complexo *Pachycondyla apicalis* Latreille – *Pachycondyla obscuricornis* Emery (Formicidae: Ponerinae): um “grupo-espécies”? *In*: **Anais do XV Encontro de Mirmecologia**. Londrina: IAPAR. p. 375-378.
- Mariano, C. S. F. *et al.* 2003. Trends in karyotype evolution in the ant genus *Camponotus* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology** 42: 831-839.
- McGlynn, T. P. 1999. The worldwide transfer of ants: geographical distribution and ecological invasions. **Journal of Biogeography** 26: 535-548.

- Meier, R. E. 1985. Interference behavior of two tramp ants (Hymenoptera: Formicidae) at protein baits on the Galapagos Islands, Ecuador. **Experientia** 41: 1228-1229.
- Meier, R. E. 1994. Coexisting patterns and foraging behavior of introduced and native ants (Hymenoptera: Formicidae) in the Galapagos Islands. *In*: Williams, D. F. (Ed.). **Exotic ants: biology, impact and control of introduced species**. Colorado: Westview Press. p. 44-62.
- Naumann, K. 1994. An occurrence of two exotic ant (Formicidae) species in British Columbia. **Journal of the Entomological Society of the British Columbia** 91: 69-70.
- Passera, L. 1994. Characteristics of tramp species. *In*: Williams, D. F. (Ed.). **Exotic ants: biology, impact and control of introduced species**. Colorado: Westview Press. p. 23-43.
- Passera, L. 1993. Quels sont les caracteres etho-physiologiques des “fourmis vagabondes”? **Actes des Colloques Insectes Sociaux** 8: 39-45.
- Pompolo, S. G., Mariano, C. S. F. 2003. Considerações citogenéticas sobre a condição derivada da tribo Attini (Formicidae: Myrmicinae). *In*: **Anais do XVI Simpósio de Mirmecologia**. Florianópolis: Ed. UFSC. p. 267-270.
- Roger, J. 1863. Die neu aufgeführten gattungen und arten meines Formiciden verzeichnisses. **Berliner Entzeiger Zeitung** 7: 131-214.
- Ross, K. G. *et al.* 1999. Assessing genetic structure with multiple classes of molecular markers: a case study involving the introduced fire ant *Solenopsis invicta*. **Molecular Biology and Evolution** 16(4): 525-543.
- Shoemaker, D. D., Ross, K. G., Arnold, M. L. 1994. Development of RAPD markers in two introduced fire ants, *Solenopsis invicta* e *S. richteri*, and their application to the study of a hybrid zone. **Molecular Ecology** 3: 531-539.

- Smith, M. R. 1936. The ants of Puerto Rico. **The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico** 20(4): 819-875.
- Smith, M. R. 1965. House infesting ants of the Eastern United States: their recognition, biology and economic importance. **Technical Bulletin of Agricultural Research Service**. n. 1326. Washington: USDA. 105 p.
- Souza, A. L. B., Delabie, J. H. C., Fowler, H. G. 1998. *Wasmannia* spp. (Hym., Formicidae) and insect damages to cocoa in Brazilian farms. **Journal of Applied Entomology** 122: 339-341.
- Spencer, H. 1941. The small fire ant *Wasmannia* in citrus groves: a preliminary report. **Florida Entomologist** 24(1): 6-14.
- Suarez, A. V. *et al.* 1999. Behavioral and genetic differentiation between native and introduced populations of the argentine ant. **Biological Invasions** 1: 43-53.
- Tennant, L. E. 1994. The ecology of *Wasmannia auropunctata* in primary tropical rainforest in Costa Rica and Panama. *In*: Williams, D. F. (Ed.). **Exotic ants: biology, impact and control of introduced species**. Colorado: Westview Press. p. 80-90.
- Torres, J. A. 1984. Diversity and distribution of ant communities in Puerto Rico. **Biotropica** 16(4): 296-303.
- Tsutsui, N. D., Suarez, A. V. 2003. The colony structure and population biology of invasive ants. **Conservation Biology** 17: 48-58.
- Tsutsui, N. D. *et al.* 2000. Reduced genetic variation and the success of an invasive species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 97(11): 5948-5953.
- Tsutsui, N. D. *et al.* 2003. Genetic diversity, asymmetrical aggression and recognition in a widespread invasive species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 100(3): 1078-1083.

- Ulloa-Chacon, P., Cherix, D. 1988. Quelques aspects de la biologie de *Wasmannia auropunctata* (Roger) (Hymenoptera, Formicidae). **Actes des Colloques Insectes Sociaux** 4: 177-184.
- Ulloa-Chacon, P., Cherix, D. 1989. Etudes de quelques facteurs influençant la fécondité des reines de *Wasmannia auropunctata* R. (Hymenoptera, Formicidae). **Actes des Colloques Insectes Sociaux** 5: 121-129.
- Ulloa-Chacon, P., Cherix, D. 1990. The little fire ant *Wasmannia auropunctata* (R.) (Hymenoptera: Formicidae). *In*: Vander Meer, R. K., Jaffe, K., Cedeno, A. (Eds.). **Applied myrmecology: a world perspective**. Colorado: Westview Press. p. 281-289.
- Ulloa-Chacon, P., Cherix, D. 1994. Perspectives on control of the little fire ant (*Wasmannia auropunctata*) on the Galapagos islands. *In*: Williams, D. F. (Ed.). **Exotic ants: biology, impact and control of introduced species**. Colorado: Westview Press. p. 63-72.
- Vilela, E. F., Della Lucia, T. M. C. 1993. Comunicação química. *In*: Della Lucia, T. M. C. (Ed.). **As formigas cortadeiras**. Viçosa: Folha de Viçosa. p. 106-130.
- Wetterer, J. K., Porter, S. D. 2003. The little fire ant, *Wasmannia auropunctata*: distribution, impact and control. **Sociobiology** 42: 1-41.
- Wetterer, J. K., Walsh, P. D., White, L. J. T. 1999. *Wasmannia auropunctata* (Roger) (Hymenoptera: Formicidae), a highly destructive tramp ant, in wildlife refuges of Gabon, West Africa. **African Entomology** 7: 292-294.
- Wheeler, W. M. 1908. The ants of Jamaica. **Bulletin of the American Museum of Natural History** 24: 159-163.
- Williams, D. F., Whelan, P. M. 1992. Bait attraction of the introduced pest ant, *Wasmannia auropunctata* (Hymenoptera: Formicidae) in the Galapagos Islands. **Journal of Entomological Science** 27(1): 29-34.

Wilson, E. O. 1971. **The insect societies**. Cambridge: Belknap Press of Harvard University Press. 548 p.

CAPÍTULO 1

Variabilidade genética de populações nativas de *Wasmannia auropunctata* e *W. sp. aff. rochai* (Hymenoptera: Formicidae, Myrmicinae) e suas implicações biogeográficas

Resumo

Wasmannia auropunctata (Roger, 1863) (Blepharidattini) é uma formiga importante nas regiões sudeste e sudoeste da Bahia, Brasil, sendo responsável por danos agrícolas superiores aos de *Wasmannia sp. aff. rochai*. Marcadores RAPD (polimorfismo de DNA amplificado ao acaso) permitiram a distinção entre as populações de ambas as espécies de *Wasmannia*, e a análise da variabilidade genética de populações nativas de *W. auropunctata* e *W. sp. aff. rochai* provenientes do Brasil (estado da Bahia) e/ou da Guiana Francesa. As distâncias genéticas entre as populações de *W. auropunctata* e *W. sp. aff. rochai* (55,8 – 71,4%) evidenciam a diferenciação genética entre as mesmas. As populações de *W. auropunctata* presentes em canaviais e bananais de Jequié mostraram-se geneticamente mais distanciadas (30,1 – 46,3%), podendo representar populações restritas a fragmentos isolados. As elevadas distâncias genéticas encontradas entre as populações de *W. auropunctata* da Ceplac/Ilhéus (26,8 – 34,6%), assim como entre a maioria das demais populações de Ilhéus em relação às da Ceplac/Ilhéus (23,3 – 40,8%), devem contribuir para a estrutura multicolonial de *W. auropunctata* no sudeste da Bahia. A proximidade genética entre as populações de *W. auropunctata* dos cacauais (14,1%) e coqueirais de Ilhéus (18,5%) com as populações de floresta da Guiana Francesa sugere que os ambientes destas localidades talvez tenham tido uma ligação geográfica no passado. O elevado polimorfismo (99,5%) e os valores das heterozigosidades estimadas (Ilhéus: 0,407; Jequié: 0,415; Guiana Francesa: 0,386) sugerem que as populações de *W. auropunctata* oriundas da faixa que vai da Guiana Francesa ao sudeste da Bahia (Ilhéus) localizam-se no centro geográfico da área de dispersão desta espécie.

Abstract

Wasmannia auropunctata (Roger, 1863) (Blepharidattini) is an important ant in the Southeast and Southwest regions of Bahia, Brazil, responsible for higher agricultural damages than the ant *Wasmannia* sp. aff. *rochai*. Random amplified polymorphic DNA markers (RAPD) was a usefull tool for the distinction among the populations of both *Wasmannia* species, and the analyses of genetic variability of native *W. auropunctata* and *W.* sp. aff. *rochai* populations from Brazil (state of Bahia) and from French Guiana, in the former species. The genetic distances among populations of *W. auropunctata* and *W.* sp. aff. *rochai* (55.8 – 71.4%) reflect the genetic difference among them. The populations of *W. auropunctata* from sugar cane and banana plantations in Jequié have high genetic distance (30.1 – 46.3%), suggesting being populations restrict to environmental fragments. The high genetic distances among the *W. auropunctata* populations from Ceplac/Ilhéus (26.8 – 34.6%), as well as among other populations from Ilhéus in comparison to Ceplac/Ilhéus (23.3 – 40.8%), may play a role in the multicolonial structure of *W. auropunctata* in the Southeast of Bahia. The genetic proximity among *W. auropunctata* populations from cocoa (14.1%) and coconut plantations (18.5%) in Ilhéus with the forest populations from French Guiana suggests that these localities perhaps had a geographic connection in the past. The high polymorphism (99.5%) and the values of estimate heterozygosities (Ilhéus: 0.407; Jequié: 0.415; French Guiana: 0.386) suggest that *W. auropunctata* populations from French Guiana to the Southeast region of Bahia (Ilhéus) may be situated in the geographic center of dispersal area of this species.

Introdução

Wasmannia auropunctata (Roger, 1863) é uma formiga conhecida como “pixixica” no agrossistema cacauero da Bahia (Delabie, 1988) e como “little fire ant” em várias regiões do mundo onde foi introduzida (Fernald, 1947; Lubin, 1984). Esta espécie é nativa da região Neotropical, sendo encontrada na Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guianas, Paraguai e Perú (Kempf, 1972). Sua ocorrência também tem sido registrada na Costa Rica (Tennant, 1994), Galápagos (Brandão, 1991), Jamaica (Wheeler, 1908), Panamá (Tennant, 1994), Porto Rico (Smith, 1936; Torres, 1984), Uruguai (Brandão, 1991) e Venezuela (Goitia *et al.*, 1992).

As colônias de *W. auropunctata* são polidômicas (Wetterer & Porter, 2003) e poligínicas, com número de rainhas residentes elevado, embora seja difícil quantificá-las, devido à ausência de limites claros entre as colônias (Passera, 1993, 1994). Esta espécie nidifica em diferentes habitats com climas semi-áridos a úmidos (Spencer, 1941; Kusnezov, 1952), mas prefere condições de umidade elevada (Lubin, 1984). Seus ninhos são geralmente estabelecidos ao nível do solo, próximos à superfície e localizam-se sob pedras, por entre folhas caídas no chão, em galhos secos ou tocos podres (Clark *et al.*, 1982; Torres, 1984; Naumann, 1994), em torno de raízes e em cavidades de plantas (Spencer, 1941; Ulloa-Chacon & Cherix, 1988). Encontra-se igualmente sob os “tapetes” de briófitas e cascas grossas das árvores, assim como sob as bases das folhas de palmeiras (Wheeler, 1908; Kusnezov, 1952; Fabres & Brown, 1978).

Em floresta tropical primária, onde vive naturalmente, *W. auropunctata* não é dominante (Levings & Franks, 1982), coexistindo com diversas espécies de formigas na serrapilheira (Tennant, 1994). Entretanto, ela constitui um grave problema em situação de desequilíbrio ecológico, causando danos agrícolas (Delabie & Cazorla, 1991; Souza *et al.*, 1998) e sendo responsável pelo deslocamento da fauna nativa de formigas (Clark *et al.*, 1982; Lubin, 1984; Meier, 1985).

Wasmannia auropunctata pode ser confundida no campo com *Wasmannia* sp. aff. *rochai*, a qual não constitui ameaça em ecossistemas perturbados. Morfologicamente, *W. auropunctata* e *W. sp. aff. rochai* diferem basicamente em relação ao formato do pecíolo presente no pedicelo e à pilosidade do corpo. Em *W. auropunctata*, o pecíolo, observado lateralmente, é quase retangular (Wetterer & Porter, 2003) e, em *W. sp. aff. rochai*, ele é triangular; os pêlos corporais em *W.*

auropunctata são longos e esparsos, enquanto que em *W. sp. aff. rochai* eles são mais curtos (A. L. B. Souza, observação pessoal). Portanto, diferenciar as operárias de *W. auropunctata* e *W. sp. aff. rochai* no ambiente torna-se difícil, o que pode ser agravado pelo fato destas formigas apresentarem apenas 1,5 mm. Assim, torna-se necessário buscar novas metodologias para que se possa distinguir as populações destas duas espécies.

Marcadores RAPD (polimorfismo de DNA amplificado ao acaso) são úteis para o estudo da variabilidade genética de populações de himenópteros eussociais, que geralmente apresentam baixa variabilidade (Wilson, 1971; Shoemaker *et al.*, 1992), porque permitem a detecção de numerosos polimorfismos. Além disso, esta técnica requer pequena quantidade de DNA, sendo adequada para a investigação genética de insetos pequenos (Hoy, 1994). Utilizando esta técnica, Shoemaker *et al.* (1994) conseguiram discriminar populações de *Solenopsis invicta* e *S. richteri* introduzidas nos EUA e Julian *et al.* (2002) examinaram os padrões genotípicos entre operárias irmãs, rainhas e machos de *Pogonomyrmex rugosus* e *P. barbatus*, espécies que ocorrem em simpatria e alopatria, nos Estados Unidos e México.

Assim, neste trabalho, esses marcadores foram utilizados para analisar a variabilidade genética de populações nativas de *Wasmannia auropunctata* e *W. sp. aff. rochai*, tendo em vista a necessidade de se conhecer como as suas populações estão estruturadas geneticamente e, verificar a utilidade desses marcadores na distinção das mesmas.

Material e Métodos

Coletas

Vinte e quatro colônias de *W. auropunctata* e quatro de *W. sp. aff. rochai* foram amostradas entre janeiro de 2004 e janeiro de 2006 em agrossistemas diversos na Bahia, Brasil [Jequié (13°54'S, 40°01'W) e Ilhéus (14°37'S, 39°04'W)] e em áreas de floresta na Guiana Francesa [Pointe Combi (05°19'N, 52°57'W) e Petit Saut (05°04'N, 52°01'W)] (Tabela 1). Foram analisados cinco indivíduos por colônia. A distância geográfica entre a Guiana Francesa e Ilhéus é aproximadamente 4000 km. Entre Ilhéus e Jequié são 200 km de distância. Dentro de Ilhéus, a distância geográfica entre as áreas experimentais da Ceplac e o distrito de Ponta da Tulha é cerca de 50 km. As áreas I, II e III (Ilhéus) distaram 100 m e as áreas A, B e C (Jequié), 50 a 100 m. As distâncias entre os pontos de coleta variaram de 50 m a 1 km numa mesma localidade brasileira e entre as localidades da Guiana Francesa foram de aproximadamente 27 km.

Tabela 1: Locais de coleta de *Wasmannia auropunctata* (*Wa*) e *Wasmannia sp. aff. rochai* (*Wr*) no estado da Bahia (Brasil) e na Guiana Francesa.

| Locais | Localidades | Colônias | Espécie | Habitat | |
|--------|-----------------|-------------------------------------|---------|-----------|-----------|
| 1 | Guiana Francesa | Pointe Combi - Estação experimental | 1 | <i>Wa</i> | Floresta |
| | | Petit Saut - Barragem | 1 | <i>Wa</i> | Floresta |
| 2 | Brasil | Ilhéus - Quadra D' (Ceplac) | 2 | <i>Wa</i> | Cacau |
| 3 | Brasil | Ilhéus - Quadra F (Ceplac) | 2 | <i>Wa</i> | Cacau |
| 4 | Brasil | Ilhéus - Quadra H (Ceplac) | 2 | <i>Wa</i> | Cacau |
| 5 | Brasil | Jequié - Área A | 2 | <i>Wa</i> | Cacau |
| 6 | Brasil | Jequié - Área B | 2 | <i>Wa</i> | Cacau |
| 7 | Brasil | Jequié - Km 15 | 2 | <i>Wa</i> | Canavial |
| 8 | Brasil | Jequié - Km 14 | 2 | <i>Wa</i> | Canavial |
| 9 | Brasil | Jequié - Km 14 | 2 | <i>Wa</i> | Bananal |
| 10 | Brasil | Ilhéus - Área I (Ponta da Tulha) | 2 | <i>Wa</i> | Coqueiral |
| 11 | Brasil | Ilhéus - Área II (Ponta da Tulha) | 2 | <i>Wa</i> | Coqueiral |
| 12 | Brasil | Ilhéus - Área III (Ponta da Tulha) | 2 | <i>Wa</i> | Coqueiral |
| 13 | Brasil | Ilhéus - Fazenda Cordilheira | 2 | <i>Wr</i> | Cacau |
| 14 | Brasil | Jequié - Área C | 2 | <i>Wr</i> | Cacau |

Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído de acordo com o protocolo de Waldschmidt *et al.* (1997) e amplificado através de PCR-RAPD, segundo Williams *et al.* (1990), com algumas modificações. A mistura de reação (25 µL) consistiu de 3 µL de DNA, 2,5 µL de tampão da enzima, 1,0 µL de desoxirribonucleosídeos trifosfatos (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 2,5 µL de “primer” 4 µM, 15,8 µL de água miliQ e 0,2 µL de *Taq* polimerase. A mistura foi incubada em termociclador PTC-100 (MJ Research) programado para 40 ciclos, cada qual consistindo de um passo de desnaturação (15 segundos a 94° C), um de anelamento (30 segundos a 35° C) e um de extensão (1 minuto a 72° C). Um passo de extensão extra foi executado ao final dos 40 ciclos (7 minutos a 72° C).

A partir de 30 “primers” testados (Operon Technologies, Alameda, AL, USA), 19 foram utilizados nas amplificações: OPA13, OPAA6, OPAA11, OPAA16, OPAB19, OPB12, OPG3, OPK01, OPM05, OPN08, OPO13, OPP04, OPW01, OPW04, OPX06, OPY07, OPY14, OPY16 e OPZ11. Estes “primers” foram selecionados por permitirem a produção de, pelo menos, 7 bandas e um padrão nítido de amplificação. Os produtos de reação foram separados através de eletroforese em gel de agarose a 1,2% contendo 10µg/mL de brometo de etídio. As bandas de DNA obtidas foram visualizadas sob luz ultravioleta e as imagens geradas capturadas com o auxílio do software AlphaDigiDoc 1201.

Análise estatística

Para a análise dos dados moleculares foi construída uma matriz binária com base na presença (1) e ausência (0) dos fragmentos de DNA amplificados. A matriz de dados foi utilizada para o cálculo da heterozigosidade e do coeficiente de Nei e Li (S_{ij}), em que a similaridade genética entre o *i*-ésimo e o *j*-ésimo indivíduo é dada por:

$$S_{ij} = 2a / (2a + b + c)$$

onde:

a = número de bandas presentes simultaneamente nas duas amostras

b = número de bandas presente na primeira e ausente na segunda amostra

c = número de bandas ausente na primeira e presente na segunda amostra

A similaridade genética obtida foi convertida em distância genética (D_{ij}), utilizando-se o complemento aritmético da similaridade, calculado pela fórmula:

$$D_{ij} = 1 - S_{ij}$$

As distâncias genéticas obtidas foram utilizadas para fazer a análise de agrupamento, por meio do algoritmo UPGMA, e a análise de dispersão gráfica. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa Genes (Cruz, 2001).

Resultados

Os 19 “primers” utilizados geraram 249 bandas RAPD para as populações de *Wasmannia*. Destas, 100 (40,16%) estiveram presentes exclusivamente em *W. auropunctata* e 47 (18,88%) ocorreram apenas em *W. sp. aff. rochai*. O número médio de bandas por “primer” para *W. auropunctata* foi 10,5 e em *W. sp. aff. rochai* 7,7. Em *W. auropunctata*, 99,5% das bandas geradas foram polimórficas, enquanto que em *W. sp. aff. rochai*, estas representaram 77,5%. O padrão de amplificação obtido com o “primer” OPW01 nas duas espécies de *Wasmannia*, assim como os padrões gerados com todos os outros “primers” empregados, demonstra a viabilidade da técnica de PCR-RAPD para evidenciar diferenças entre as populações de *W. auropunctata* e *W. sp. aff. rochai* (Figura 1).

Os valores da heterozigosidade média estimada para as populações de *W. auropunctata* foram: 0,407 (Ilhéus), 0,415 (Jequié) e 0,386 (Guiana Francesa). Para *W. sp. aff. rochai*, a heterozigosidade média das populações de Ilhéus foi de 0,434 e para as de Jequié foi de 0,398.

As estimativas de distância genética entre as populações de *W. auropunctata* variaram de 10,6% a 46,3% (Tabela 2). A menor distância foi encontrada entre as populações de Jequié estabelecidas em canaviais e bananais (10,6%). Baixas

distâncias genéticas também foram encontradas entre as populações instaladas em coqueirais e cacauais de Ilhéus (12,2%), assim como entre as populações da Guiana Francesa (floresta) e de cacauais de Ilhéus (14,1%). Por outro lado, a maior distância genética foi verificada entre as populações de Jequié (bananais) e as de Ilhéus (cacauais) (46,3%). A distância genética entre as populações de *W. sp. aff. rochai* de Jequié e de Ilhéus (cacauais) também foi alta (41,7%).

Distâncias genéticas variando de 55,8 a 71,4% foram encontradas quando se comparou populações das duas espécies de *Wasmannia* (Tabela 2), o que evidencia a diferenciação genética entre as mesmas.

A análise de agrupamento (Figura 2) e a projeção gráfica 3D (Figura 3) corroboram as distâncias genéticas verificadas entre as duas espécies de *Wasmannia*, além de evidenciarem a formação de três grupos: [G1] *W. auropunctata* presente em canaviais e bananais, [G2] *W. auropunctata* presente em cacauais e coqueirais brasileiros e em florestas (Guiana Francesa) e [G3] *W. sp. aff. rochai*.

A análise de variância molecular revelou que a variação genética foi maior entre as populações do que dentro de cada população, tanto para *W. auropunctata* (entre: 55,5%; dentro: 44,5%) quanto para *W. sp. aff. rochai* (entre: 59,1%; dentro: 40,9%).

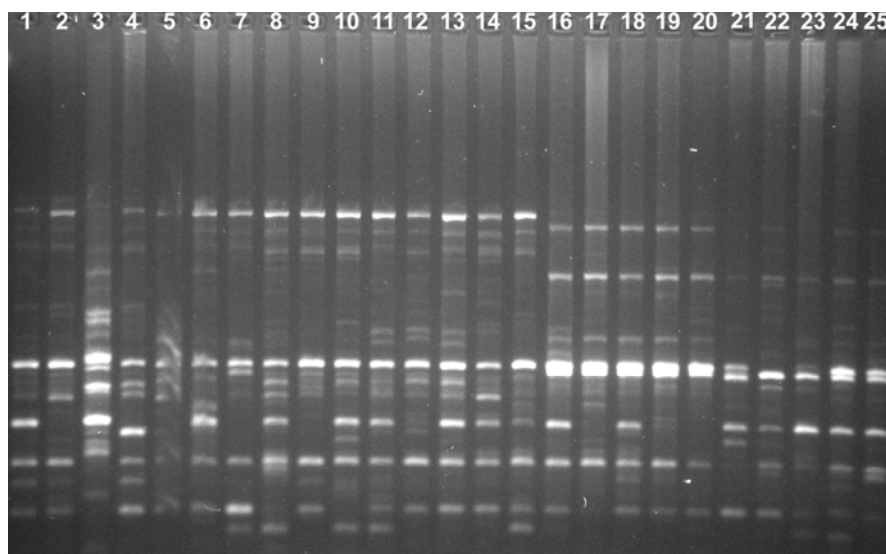


Figura 1: Padrão de bandas de DNA de operárias de *Wasmannia auropunctata* (1 a 15) e *Wasmannia* sp. aff. *rochai* (16 a 25) obtido com o “primer” OPW01.

Tabela 2: Distâncias genéticas (%) entre as populações de *Wasmannia auropunctata* (1 a 12) e *Wasmannia* sp. aff. *rochai* (13 e 14).

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
|----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|----|
| 1 | 0 | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 32,4 | 0 | | | | | | | | | | | | |
| 3 | 26,6 | 34,6 | 0 | | | | | | | | | | | |
| 4 | 14,1 | 32,2 | 26,8 | 0 | | | | | | | | | | |
| 5 | 32,0 | 41,1 | 35,3 | 30,6 | 0 | | | | | | | | | |
| 6 | 29,4 | 40,2 | 34,2 | 31,1 | 19,5 | 0 | | | | | | | | |
| 7 | 32,6 | 40,6 | 35,1 | 32,3 | 30,1 | 30,6 | 0 | | | | | | | |
| 8 | 38,1 | 45,7 | 42,6 | 37,1 | 40,7 | 40,2 | 24,9 | 0 | | | | | | |
| 9 | 39,1 | 46,3 | 43,1 | 37,7 | 41,2 | 41,5 | 25,0 | 10,6 | 0 | | | | | |
| 10 | 18,5 | 35,5 | 31,6 | 12,4 | 32,6 | 30,9 | 34,1 | 38,6 | 39,3 | 0 | | | | |
| 11 | 26,8 | 38,2 | 32,5 | 23,3 | 22,8 | 27,0 | 32,2 | 39,7 | 39,8 | 23,0 | 0 | | | |
| 12 | 30,9 | 40,8 | 36,6 | 27,4 | 26,1 | 30,4 | 33,9 | 38,6 | 38,5 | 26,4 | 12,2 | 0 | | |
| 13 | 62,7 | 63,6 | 64,4 | 64,7 | 59,0 | 55,8 | 61,3 | 62,5 | 61,7 | 65,2 | 58,3 | 58,7 | 0 | |
| 14 | 68,0 | 70,3 | 70,1 | 71,4 | 68,4 | 63,2 | 63,5 | 63,8 | 62,3 | 70,7 | 66,9 | 65,4 | 41,7 | 0 |

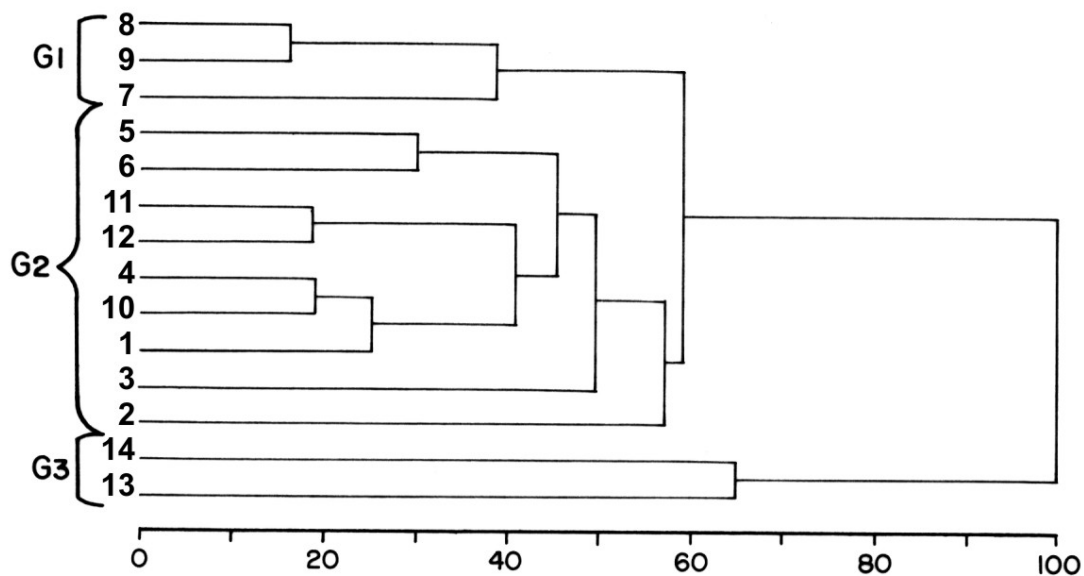


Figura 2: Dendrograma gerado por UPGMA a partir das distâncias genéticas entre as populações de *Wasmannia auropunctata* (1 a 12) e *Wasmannia* sp. aff. *rochai* (13 e 14).

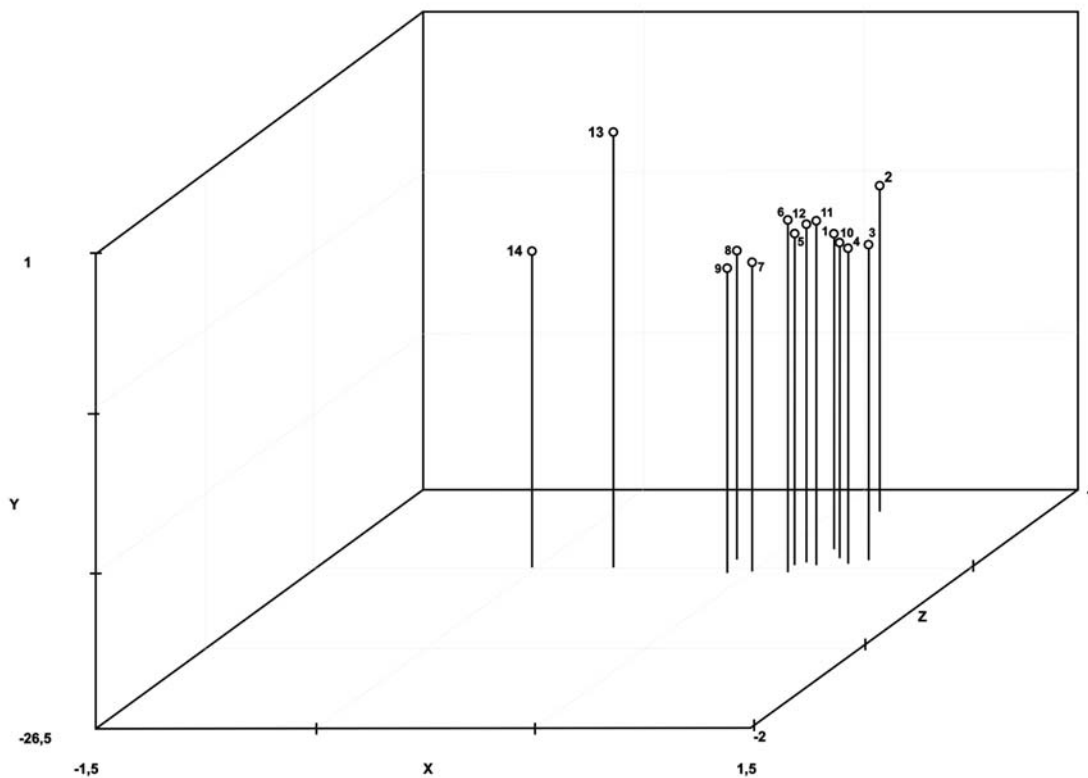


Figura 3: Projeção 3D entre as populações de *Wasmannia auropunctata* (1 a 12) e *Wasmannia* sp. aff. *rochai* (13 e 14) baseada no coeficiente de Nei e Li. $\tau = 0,918545$.

Discussão

Os marcadores RAPD permitiram a clara discriminação entre as populações de *W. auropunctata* e *W. sp. aff. rochai*, na análise de agrupamento e na análise de dispersão gráfica. Este fato é muito importante, tendo em vista que a primeira causa danos agrícolas superiores aos de *W. sp. aff. rochai* (Souza *et al.*, 1998) e também devido à dificuldade de distinção das mesmas.

O fato de colônias de insetos eussociais abrigarem indivíduos com elevado grau de parentesco (Wilson, 1971; Shoemaker *et al.*, 1992) contribui para a maior variabilidade genética inter do que intrapopulacional observada neste estudo. As causas da baixa variabilidade genética intrapopulacional observada em *W. auropunctata* devem ser em função da ocorrência de acasalamento intranidal, do mecanismo de reprodução colonial por brotamento (“budding”) e à polidomia. Entretanto, embora a análise de variância molecular tenha revelado variação genética maior entre as populações do que dentro de cada população, tanto para *W. auropunctata* quanto para *W. sp. aff. rochai*, os valores obtidos para ambas as situações foram próximos, indicando que dentro de cada colônia existe uma variabilidade genética expressiva entre seus indivíduos, que pode ser por causa da existência da poliginia nestas espécies.

A ocorrência de vôo nupcial mais distante do ninho de origem também deve contribuir para a variabilidade genética intracolonial encontrada em *W. auropunctata* e *W. sp. aff. rochai*, além da poliginia, uma vez que foram coletados sexuais de ambas as espécies, após vôo nupcial, no litoral de Ilhéus entre os anos de 1992 e 1995, cujos exemplares estão depositados na coleção de formigas do Laboratório de Mirmecologia da Ceplac. Assim, tanto o vôo nupcial quanto o brotamento (Hölldobler & Wilson, 1990; Bourke & Franks, 1995; Souza *et al.*, 1996) são estratégias reprodutivas que devem ser adotadas por *W. auropunctata* e *W. sp. aff. rochai* em áreas nativas, muito embora Passera (1993, 1994) tenha argumentado que a fundação colonial por brotamento seja a tendência geral nas espécies polidômicas pertencentes ao grupo das formigas “vagabundas”, sendo facilitada pela existência de acasalamento intranidal. Entretanto, ele também menciona que o brotamento pode coexistir com o vôo nupcial em algumas espécies deste grupo, como relatado para *Tapinoma sessile*, *Formica yessensis* e *F. lugubris*.

As populações de *W. auropunctata* presentes em canaviais e bananais de Jequié foram as que se mostraram geneticamente mais distanciadas das demais, podendo representar populações restritas a fragmentos isolados. Talvez a ocorrência de eventos genéticos casuais nestas populações tenha levado às distâncias genéticas obtidas.

As elevadas distâncias genéticas encontradas entre as populações de *W. auropunctata* da Ceplac (Ilhéus), assim como entre a maioria das outras populações de Ilhéus em relação às da Ceplac, podem justificar a existência de comportamentos agressivos entre operárias de *W. auropunctata* não companheiras de ninho da região sudeste da Bahia (Le Breton *et al.*, 2004; Souza *et al.*, submetido). Estes autores verificaram alta agressividade entre e dentro de populações de Ilhéus, refletindo a estrutura multicolonial nesta espécie em áreas nativas (Le Breton *et al.*, 2004). Corroborando esta idéia, Tsutsui *et al.* (2000) encontraram que populações nativas da formiga argentina *Linepithema humile* exibem agressividade intraespecífica pronunciada. No caso de populações introduzidas de formigas, não ocorre comportamento agressivo entre conspecíficos (Holway, 1999), demonstrando unicolonialidade nesta situação (Passera, 1993, 1994; Holway *et al.*, 2002; Le Breton *et al.*, 2004).

Sugere-se que a proximidade genética entre as populações de *W. auropunctata* dos cacauais e coqueirais de Ilhéus com as populações de floresta da Guiana Francesa seja devido ao fato das populações destas localidades estarem distribuídas em habitats com características ambientais semelhantes, como temperatura, pluviosidade e incidência solar, que talvez tenham sido conectadas no passado. Sabe-se que as florestas da América do Sul que antes apresentavam distribuição contínua sofreram contração em um passado recente (Wüster *et al.*, 2005). Possivelmente estas florestas abrigavam populações comuns ou próximas de várias espécies animais, incluindo insetos, o que pode justificar a proximidade genética observada entre as populações analisadas no presente estudo. Neste sentido, Ahrens *et al.* (2005) propuseram conectividade de habitat entre populações nativas da formiga-de-fogo, *S. invicta*, distribuídas no Brasil e na Argentina para justificar a fraca diferenciação genética encontrada entre as populações destes dois países. Estes autores sugerem que as características ambientais similares das áreas de ocorrência das populações de *S. invicta* têm um papel significativo nos padrões de fluxo gênico dentro da sua área de distribuição e que eventos de dispersão à longa distância, em

decorrência de vôos nupciais durante regimes de ventos fortes, transporte de colônias inteiras sobre a superfície da água, durante inundações, ou o transporte de fragmentos de colônias que contenham rainhas, mediado por humanos, devem ter proporcionado intenso fluxo gênico entre as populações de formigas da Argentina e Brasil.

A proximidade genética entre as populações analisadas do Brasil e da Guiana Francesa, aliada ao elevado polimorfismo e aos valores das heterozigosidades estimadas, sugerem que foram analisadas populações nativas de *W. auropunctata* e *W. sp. aff. rochai*, pois populações nativas de formigas exibem maior variabilidade genética do que populações introduzidas (Tsutsui *et al.*, 2000; Fournier *et al.*, 2005).

As populações de *W. auropunctata* oriundas da faixa que vai da Guiana Francesa até o sudeste da Bahia (Ilhéus) podem estar localizadas no centro geográfico da área de dispersão desta espécie, uma vez que localidades geográficas onde se detecta diversidade genética elevada e as populações são densas, representam, frequentemente, o centro de origem de uma espécie (Pielou, 1979; Micalis *et al.*, 1998). Por exemplo, Fournier *et al.* (2005) encontraram número de alelos e heterozigosidade esperada superior em populações nativas de *W. auropunctata* provenientes da Guiana Francesa do que em populações introduzidas da Nova Caledônia e Tsutsui *et al.* (2000) verificaram que populações nativas de *L. humile* são geneticamente variáveis entre si.

Sugere-se que a colonização de novos ambientes por *W. auropunctata* seja em direção a habitats cada vez mais distintos do ambiente de floresta onde esta espécie é originalmente encontrada, ou seja, em direção a habitats fragmentados, como os detectados nos municípios de Jequié (canaviais e bananais) e Ilhéus (coqueirais). Mas, também pode ser que a diferenciação genética detectada nas populações destas localidades tenha ocorrido após a fragmentação do ambiente. Neste caso, a colonização ocorreu antes do processo de fragmentação.

Referências Bibliográficas

- Ahrens, M. E., Ross, K. G., Shoemaker, D. D. 2005. Phylogeographic structure of the fire ant *Solenopsis invicta* in its native South America range: roles of natural barriers and habitat connectivity. **Evolution** 59(8): 1733-1743.
- Bourke, A. F. G., Franks, N. R. 1995. Evolution and ecology of multiple-queen societies. *In*: Bourke, A. F. G., Franks, N. R. (Eds.). **Social evolution in ants**. Princeton: Princeton University Press. p. 258-298.
- Brandão, C. R. F. 1991. Adendos ao catálogo abreviado das formigas da região neotropical (Hymenoptera: Formicidae). **Revista Brasileira de Entomologia** 35: 319-412.
- Clark, D. B. *et al.* 1982. The tramp ant *Wasmannia auropunctata*: autecology and effects on ant diversity and distribution on Santa Cruz Island, Galapagos. **Biotropica** 14(3): 196-207.
- Cruz, C. D. 2001. **Programa Genes**. Versão Windows 2003.0.0. Viçosa: Editora UFV.
- Delabie, J. H. C. 1988. Ocorrência de *Wasmannia auropunctata* (Roger, 1863) (Hymenoptera, Formicidae, Myrmicinae) em cacauais na Bahia, Brasil. **Revista Theobroma** 18(1): 29-37.
- Delabie, J. H. C., Cazorla, I. M. 1991. Danos causados por *Planococcus citri* Risso (Homoptera, Pseudococcidae) na produção do cacauero. **Agrotrópica** 3: 53-57.
- Fabres, G., Brown, W. L., Jr. 1978. The recent introduction of the pest ant *Wasmannia auropunctata* into New Caledonia. **Journal of the Australian Entomological Society** 17: 139-142.
- Fernald, H. T. 1947. The little fire ant as a house pest. **Journal of Economic Entomology** 40(3): 428.

- Fournier, D. *et al.* 2005. Characterization and PCR multiplexing of polymorphic microsatellite loci for the invasive ant *Wasmannia auropunctata*. **Molecular Ecology Notes** 5: 239-242.
- Goitia, W., Bosque, C., Jaffe, K. 1992. Interacción hormiga-polinizador en cacao. **Turrialba** 42(2): 178-186.
- Hölldobler, B., Wilson, E. O. 1990. **The ants**. Cambridge: Belknap Press of Harvard University Press. 732 p.
- Holway, D. A. 1999. Competitive mechanisms underlying the displacement of native ants by the invasive argentine ant. **Ecology** 80: 238-251.
- Holway, D. A. *et al.* 2002. The causes and consequences of ant invasions. **Annual Review of Ecology and Systematics** 33: 181-233.
- Hoy, M. A. 1994. **Insect molecular genetics**. California: Academic Press. 546 p.
- Julian, G. E. *et al.* 2002. Genetic determination of the queen caste in ant hybrid zone. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 99(12): 8157-8160.
- Kempf, W. W. 1972. Catálogo abreviado das formigas da região neotropical (Hymenoptera: Formicidae). **Studia Entomologica** 15(1/4): 3-344.
- Kusnezov, N. 1952. El género *Wasmannia* en la Argentina (Hymenoptera, Formicidae). **Acta Zoologica Lilloana** 10: 173-182.
- Le Breton, J. *et al.* 2004. Experimental evidence of large-scale unicoloniality in the tramp ant *Wasmannia auropunctata* (Roger). **Journal of Insect Behavior** 17(2): 263-271.
- Levings, S. C., Franks, N. R. 1982. Patterns of nest dispersion in a tropical ground ant community. **Ecology** 63(2): 338-344.

- Lubin, Y. D. 1984. Changes in the native fauna of the Galapagos Islands following invasion by the little fire ant, *Wasmannia auropunctata*. **Biological Journal of the Linnean Society** 21(1/2): 229-242.
- Meier, R. E. 1985. Interference behavior of two tramp ants (Hymenoptera: Formicidae) at protein baits on the Galapagos Islands, Ecuador. **Experientia** 41: 1228-1229.
- Micales, J. A., Alfenas, A. C., Bonde, M. R. 1998. Isoenzimas na taxonomia e na genética de fungos. *In*: Alfenas, A. C. (Ed.). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: Editora UFV. p 477-512.
- Naumann, K. 1994. An occurrence of two exotic ant (Formicidae) species in British Columbia. **Journal of the Entomological Society of the British Columbia** 91: 69-70.
- Passera, L. 1994. Characteristics of tramp species. *In*: Williams, D. F. (Ed.). **Exotic ants: biology, impact and control of introduced species**. Colorado: Westview Press. p. 23-43.
- Passera, L. 1993. Quels sont les caracteres etho-physiologiques des “fourmis vagabondes”? **Actes des Colloques Insectes Sociaux** 8: 39-45.
- Pielou, E. C. 1979. **Biogeography**. New York: Wiley-Interscience Publication. 351 p.
- Roger, J. 1863. Die neu aufgeführten gattungen und arten meines Formiciden verzeichnisses. **Berliner Entzeiger Zeitung** 7: 131-214.
- Shoemaker, D. D., Costa, J. T., Ross, K. G. 1992. Estimates of heterozygosity in two social insects using a large number of electrophoretic markers. **Heredity** 69: 573-582.

- Shoemaker, D. D., Ross, K. G., Arnold, M. L. 1994. Development of RAPD markers in two introduced fire ants, *Solenopsis invicta* e *S. richteri*, and their application to the study of a hybrid zone. **Molecular Ecology** 3: 531-539.
- Smith, M. R. 1936. The ants of Puerto Rico. **The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico** 20(4): 819-875.
- Souza, A. L. B., Delabie, J. H. C., Fowler, H. G. 1996. Estratégias reprodutivas de *Wasmannia auropunctata* e de *W. sp. prox. rochai* (Hymenoptera: Formicidae) na região cacauceira da Bahia. *In: Resumos do IV Seminário de Pesquisa da UESC*. Ilhéus: Ed. UESC. p. 32.
- Souza, A. L. B., Delabie, J. H. C., Fowler, H. G. 1998. *Wasmannia* spp. (Hym., Formicidae) and insect damages to cocoa in Brazilian farms. **Journal of Applied Entomology** 122: 339-341.
- Souza, A. L. B., Delabie, J. H. C., Serrão, J. E. Intercolonial and interspecific aggressiveness of *Wasmannia auropunctata* (Roger, 1863) (Hymenoptera: Formicidae). **Bulletin of Entomological Research**. (submetido)
- Spencer, H. 1941. The small fire ant *Wasmannia* in citrus groves: a preliminary report. **Florida Entomologist** 24(1): 6-14.
- Tennant, L. E. 1994. The ecology of *Wasmannia auropunctata* in primary tropical rainforest in Costa Rica and Panama. *In: Williams, D. F. (Ed.). Exotic ants: biology, impact and control of introduced species*. Colorado: Westview Press. p. 80-90.
- Torres, J. A. 1984. Diversity and distribution of ant communities in Puerto Rico. **Biotropica** 16(4): 296-303.
- Tsutsui, N. D. *et al.* 2000. Reduced genetic variation and the success of an invasive species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 97(11): 5948-5953.

- Ulloa-Chacon, P., Cherix, D. 1988. Quelques aspects de la biologie de *Wasmannia auropunctata* (Roger) (Hymenoptera, Formicidae). **Actes des Colloques Insectes Sociaux** 4: 177-184.
- Waldschmidt, A. M. *et al.* 1997. Extraction of genomic DNA for *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). **Revista Brasileira de Genética** 20: 421-423.
- Wetterer, J. K., Porter, S. D. 2003. The little fire ant, *Wasmannia auropunctata*: distribution, impact and control. **Sociobiology** 42: 1-41.
- Wheeler, W. M. 1908. The ants of Jamaica. **Bulletin of the American Museum of Natural History** 24: 159-163.
- Williams, J. G. K. *et al.* 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research** 18: 6531-6535.
- Wilson, E. O. 1971. **The insect societies**. Cambridge: Belknap Press of Harvard University Press. 548 p.
- Wüster, W. *et al.* 2005. Tracing an invasion: landbridges, refugia, and the phylogeography of the neotropical rattlesnake (Serpentes: Viperidae: *Crotalus durissus*). **Molecular Ecology** 14: 1095-1108.

CAPÍTULO 2

Estudo citogenético da formiga neotropical *Wasmannia auropunctata* (Roger, 1863) (Hymenoptera: Formicidae, Blepharidattini)

Resumo

O estudo citogenético da formiga Neotropical *Wasmannia auropunctata* (Myrmicinae) foi conduzido com populações do centro de origem da espécie no sudeste da Bahia, Brasil, a fim de determinar o número, morfologia e marcação cromossômica nesta espécie. As populações estudadas apresentaram o cariótipo $2n = 32$, sendo dez pares metacêntricos (M) e seis pares acrocêntricos (A). Um dos braços das cromátides irmãs do décimo par foi positivo para CMA₃ e laranja de acridina, sugerindo a ocorrência de regiões organizadoras de nucléolo. A região pericentromérica da maioria dos cromossomos e algumas partes dos núcleos interfásicos foram marcadas com DAPI, evidenciando a presença da heterocromatina rica em AT. Este é o primeiro registro citogenético para uma espécie da tribo Blepharidattini.

Astract

A cytogenetic study of Neotropical ant *Wasmannia auropunctata* (Myrmicinae) was conducted with native populations from Southeast region of Bahia, Brazil, in order to determine the number, morphology and chromosomic staining in this species. The populations studied have the karyotype $2n = 32$, with ten pairs of metacentric (M) and six pairs of acrocentric (A) chromosomes. One chromosome arm of sister chromatids of pair ten was positive for CMA₃ and acridine orange, suggesting the occurrence of nucleolus organizing regions. The pericentromeric region from many chromosomes and some portions of interfasic nucleus were stained with DAPI, evidencing the presence of AT rich heterochromatin. This is the first cytogenetic report for a species of the tribe Blepharidattini.

Introdução

Estudos citogenéticos com formigas iniciaram na década de 1960 e levaram à descrição dos cariótipos de um grande número de espécies, o que permitiu a discussão de aspectos da filogenia e evolução do cariótipo neste grupo (Imai *et al.*, 1988; Mariano *et al.*, 1999). Segundo Brito *et al.* (2005), dados citogenéticos são ferramentas filogenéticas poderosas, sendo indispensáveis em estudos evolucionários, os quais incluem número e comprimento cromossômico, posição da heterocromatina, número de NORs (regiões organizadoras de nucléolo), posição de pares de bases GC e AT, dentre outros. No entanto, de acordo com Delabie & Mariano (2005), a quantidade de informações sobre a estrutura dos cromossomos na família Formicidae é pouca diante do número de espécies descritas. Para as formigas da zona Neotropical os estudos são incipientes (Mariano *et al.*, 2001, 2004b). Neste sentido, não há estudos citogenéticos para espécies de Blepharidattini (Bolton, 1994), tribo da qual faz parte o gênero *Wasmannia*. As investigações citogenéticas mais próximas dizem respeito a 21 espécies de Attini dos gêneros *Acromyrmex*, *Apterostigma*, *Atta*, *Cyphomyrmex*, *Mycetarotes*, *Mycocepurus*, *Sericomyrmex* e *Trachymyrmex* (Goñi *et al.*, 1983; Fadini *et al.*, 1996; Murakami *et al.*, 1998; Pompolo & Mariano, 2003), uma vez que Blepharidattini é o grupo irmão de Attini na subfamília Myrmicinae (Schultz & Meier, 1995; Diniz *et al.*, 1998).

Investigações envolvendo a coloração de cromossomos metafásicos com fluorocromos têm sido utilizadas para obter informações sobre a constituição da cromatina, o que é importante quando se caracteriza citogeneticamente uma espécie, os quais coram seqüências de DNA ricas em pares de bases GC (CMA₃/cromomicina A₃) e AT (DAPI/4'-6-diamidino-2-fenilindol) (Guerra & Souza, 2002). Marcações cromossômicas com CMA₃ e DAPI foram evidenciadas em vários insetos: nos gafanhotos *Eyprepocnemis plorans* e *Locusta migratoria* (Camacho *et al.*, 1991), na vespa *Trypoxylon albitarse* (Araújo *et al.*, 2000, 2002), no besouro *Olla v-nigrum* (Maffei *et al.*, 2001), em abelhas dos gêneros *Melipona* (Rocha & Pompolo, 1998; Rocha *et al.*, 2002), *Partamona* (Brito *et al.*, 1999; Brito *et al.*, 2003; Brito *et al.*, 2005) e *Trigona* (Costa *et al.*, 2004) e na formiga *Tapinoma nigerrimum* (Lorite *et al.*, 1996, 1997).

Laranja de acridina é outro fluorocromo empregado para fornecer padrão de bandeamento cromossômico. Este se intercala entre os pares de bases do DNA,

emitindo fluorescências vermelho-alaranjada e verde-amarelada quando se liga, respectivamente, à fita simples do ácido nucléico e à fita dupla (Sharma & Sharma, 1999; Exbrayat, 2000). Juan *et al.* (1996) observaram que a fluorescência verde é emitida em núcleo interfásico e a vermelha é mais pronunciada em cromossomos mitóticos. Não há dados do uso deste fluorocromo para insetos da ordem Hymenoptera.

Wasmannia auropunctata é uma espécie de formiga com considerada importância econômica e ambiental (Clark *et al.*, 1982; Lubin, 1984; Meier, 1985), sendo por isso necessário conhecê-la sob vários pontos de vista, incluindo o citogenético. Ela nidifica em diferentes habitats, em climas semi-áridos a úmidos (Spencer, 1941; Kusnezov, 1952), sendo seus ninhos estabelecidos ao nível do solo, próximos à superfície e localizam-se sob pedras, por entre folhas caídas no chão, em galhos ocos, tocos podres (Clark *et al.*, 1982; Torres, 1984; Naumann, 1994), em torno de raízes, em cavidades de plantas (Spencer, 1941; Ulloa-Chacon & Cherix, 1988), sob os “tapetes” de briófitas e cascas grossas das árvores, e sob as bases das folhas de palmeiras (Wheeler, 1908; Kusnezov, 1952; Fabres & Brown, 1978). A colônia é composta por ovos, larvas, pupas, operárias e rainhas (Clark *et al.*, 1982; Ulloa-Chacon & Cherix, 1988), sendo o número de rainhas residentes elevado, embora seja difícil quantificá-las devido à ausência de claros limites entre as colônias (Passera, 1993, 1994).

O objetivo deste estudo foi caracterizar o cariótipo de *W. auropunctata* em relação ao número, morfologia e marcação cromossômica heterocromática, informações cruciais para a caracterização citogenética de uma espécie.

Material e Métodos

Oito colônias de *W. auropunctata* amostradas na região sudeste da Bahia foram utilizadas para os estudos citogenéticos, sendo seis das áreas experimentais do CEPEC/CEPLAC (três da Reserva Zoobotânica e três da quadra G) em Ilhéus (14°45'S, 39°13'W) e duas de áreas florestais em Una (15°18'S, 39°07'W). A distância entre os municípios de Ilhéus e Una é de 80 km.

As metáfases foram obtidas a partir de gânglios cerebrais de 160 pré-pupas fêmeas (Imai *et al.*, 1988). Parte das metáfases foi corada com Giemsa (Imai *et al.*, 1988), algumas foram tratadas com os fluorocromos cromomicina A (CMA₃) e DAPI (Schweizer, 1980) e outras com laranja de acridina (Verma *et al.*, 1977).

As imagens das metáfases foram capturadas através de vídeo-câmara Q Color 3 conectada ao microscópio Olympus BX 60 com objetiva de imersão (100 x). Foi utilizado o sistema de epifluorescência (filtros WB e WU) para a observação das metáfases submetidas à fluorescência. Algumas imagens foram fotografadas com os filmes AGFA (coloração convencional) e TMAX (fluorocromos).

A classificação morfológica dos cromossomos seguiu a terminologia de Imai (1991).

Resultados

O número de cromossomos encontrado para os indivíduos analisados foi $2n = 32$, sendo dez pares metacêntricos (M) e seis pares acrocêntricos (A) (Figura 1).

Um dos braços das cromátides irmãs do décimo par foi positivo para CMA₃ (Figura 2a) e laranja de acridina (Figura 2c). A coloração convencional da metáfase CMA₃⁺ mostra a disposição destes cromossomos (Figura 2b). Com DAPI foi evidenciada a região pericentromérica da maioria dos cromossomos e também determinadas porções dos núcleos interfásicos (Figura 2d).

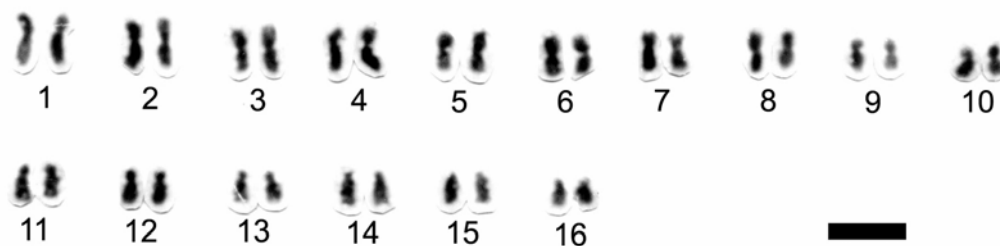


Figura 1: Cariótipo diplóide de *Wasmannia auropunctata*, $2n = 32$. Pares de cromossomos: 1 a 10 (metacêntricos) e 11 a 16 (acrocêntricos). Barra = 5 μm .

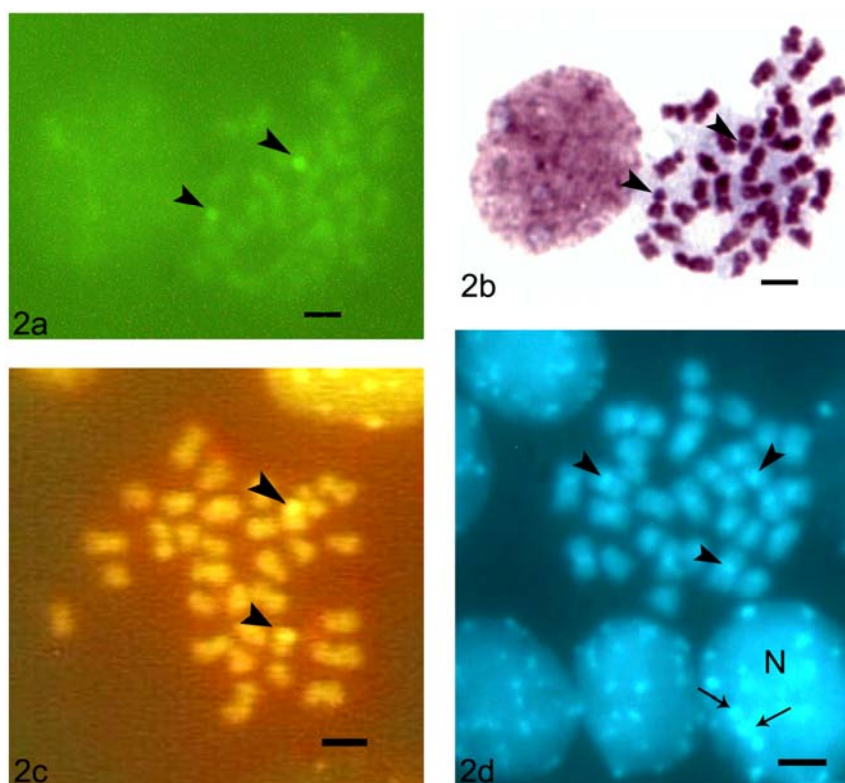


Figura 2: Metáfases de célula cerebral de *Wasmannia auropunctata*: (a) marcação CMA_3^+ num dos braços das cromátides irmãs do décimo par (cabeças de setas); (b) mesma metáfase anterior corada com Giemsa destacando os cromossomos do décimo par (cabeças de setas). Barra = 2,2 μm (2a/2b); (c) marcação positiva para laranja de acridina num dos braços das cromátides irmãs do décimo par (cabeças de setas); (d) regiões pericentroméricas da maioria dos cromossomos positivas para DAPI (cabeças de setas) e núcleo interfásico (N) marcado com DAPI (setas). Barra = 3,0 μm (2c/2d).

Discussão

A quantidade de cromossomos encontrada nas colônias de *W. auropunctata*, $2n = 32$, com $20M + 12A$, está no intervalo entre os números cromossômicos registrados para espécies de Attini dos gêneros *Acromyrmex* ($2n = 38$) e *Atta* ($2n = 22$) (Pompolo & Mariano, 2003). Esta comparação é pertinente devido ao fato de Blepharidattini ser o grupo irmão de Attini na subfamília Myrmicinae (Schultz & Meier, 1995; Diniz *et al.*, 1998). Entretanto, estudos citogenéticos com outras espécies de *Wasmannia* e com um número superior de colônias de *W. auropunctata* necessitam ser realizados, a fim de fornecer informações adicionais em relação ao número e morfologia cromossômica em *Wasmannia* spp., uma vez que, neste caso, apenas uma espécie foi investigada citogeneticamente, diferente das Attini, onde foram estudadas várias espécies dos gêneros *Acromyrmex* e *Atta*.

O estudo da evolução do cariótipo dentro de Formicidae pode ser abordado de acordo com as hipóteses propostas por Imai *et al.* (1977). A hipótese da fusão elege um cariótipo ancestral com alto número cromossômico, o qual teria sofrido fusões ao longo da evolução, levando à redução desse número. Inversamente, na hipótese da fissão, de um cariótipo ancestral com número cromossômico baixo teriam derivado formas cariotípicas mais numerosas. A hipótese modal aponta a moda como valor correspondente ao cariótipo ancestral, tendo a variação numérica ocorrido nos dois sentidos, em consequência de fusões ou fissões. No entanto, no estado atual do conhecimento sobre *W. auropunctata*, é impossível que se possa especular evolutivamente sobre o cariótipo encontrado, isto devido à baixa representatividade amostral investigada considerando-se a área de distribuição natural presumida para esta espécie, a qual representou apenas menos de 1% da distância máxima considerada entre pontos mais distantes.

Em formigas, cada grupo de espécies pode seguir um padrão evolutivo diferente em se tratando do cariótipo. Para ilustrar uma situação do estudo cariotípico em Formicidae é oportuno mencionar a situação da Ponerinae *Dinoponera lucida*, considerada uma das espécies de formigas mais “primitiva” da zona Neotropical, a qual possui $2n = 106$, sendo 18 cromossomos metacêntricos e 88 acrocêntricos, todos muito pequenos (Mariano *et al.*, 2004a). De acordo com a Teoria da Interação Mínima (TIM) para explicar a evolução do cariótipo em eucariotos, Imai *et al.* (1986, 1994) sugeriram que durante a evolução do cariótipo teria acontecido uma forte

seleção, atuando para o aumento do número cromossômico, de modo a diminuir o risco de translocações recíprocas geradas em cariótipos com número baixo de cromossomos grandes. O processo mais eficiente para atingir este aumento teria sido a ocorrência de fissões cêntricas, o que justificaria, assim, o número cromossômico superior registrado para *D. lucida*, predominando os cromossomos acrocêntricos. Portanto, segundo a TIM, em determinado momento evolutivo, a tendência é que os cromossomos diminuam de tamanho, aumentando o número de acrocêntricos, por meio de fissões, de forma a impedir interações físicas entre eles, que poderiam causar mutações, como as translocações recíprocas, deletérias para os eucariotos. Por outro lado, o resultado final de repetidas fissões seria um cariótipo totalmente telocêntrico com risco de translocação baixo, mas com alta instabilidade telomérica. Para resolver esta questão, a ocorrência de inversões pericêntricas gerariam um novo cariótipo metacêntrico relativamente estável, em razão do número elevado de cromossomos. Assim sendo, tanto fissões cêntricas quanto inversões pericêntricas são evolutivamente vantajosas para minimizar o risco genético causado pelas translocações. No entanto, fusões cêntricas ocasionais podem ocorrer em alguns casos (Imai *et al.* 1988; Imai, 1991; Imai *et al.*, 2002).

A marcação com CMA₃ evidenciou a região rica em GC presente em um dos braços das cromátides irmãs de cada cromossomo do décimo par de *W. auropunctata*. Lorite *et al.* (1997) detectaram marcação CMA₃⁺ indicativa de região organizadora de nucléolo (NOR) na região proximal do braço curto do cromossomo 6 da formiga *T. nigerrimum*. Brito *et al.* (2003) evidenciaram uma ampla banda DA/CMA₃ num cromossomo grande da abelha *Partamona peckolti* e a consideraram como NOR. Brito *et al.* (2005) observaram marcação DA/CMA₃⁺ nas regiões terminais de alguns pares cromossômicos das espécies *Partamona helleri* e *Partamona seridoensis*, sugerindo a presença de NORs em blocos terminais de alguns cromossomos. A correlação entre bandas CMA₃⁺ e NORs é comum entre os insetos (Brito *et al.*, 2003).

O fluorocromo laranja de acridina marcou as mesmas regiões que a CMA₃ nos cromossomos de *W. auropunctata*. Almeida & Carvalho (2004) detectaram segmentos de heterocromatina flanqueadora de NOR no cromossomo 11 do pimentão *Capsicum annuum* com a utilização da técnica de Hsc-FA (bandeamento fluorescente da heterocromatina associada à constrição secundária com laranja de acridina). Em função dos resultados obtidos, propõe-se que as regiões

cromossômicas marcadas com CMA₃ e laranja de acridina em *W. auropunctata* correspondem à NORs. É a primeira vez que se emprega o fluorocromo laranja de acridina em estudos citogenéticos com formigas.

A importância em se detectar a presença de NORs em cromossomos de *W. auropunctata* é que estas regiões servem como marcadores espécie-específicos, uma vez que são regiões muito conservadas (Alberts *et al.*, 2006), constituindo, portanto, um interessante caráter taxonômico. De fato, Hirai *et al.* (1994, 1996) registraram variação numérica interespecífica de NORs em formigas do gênero *Myrmecia*.

A marcação com DAPI nas regiões pericentroméricas da maioria dos cromossomos de *W. auropunctata* revela a presença da heterocromatina centromérica rica em AT nestas localidades. Rocha *et al.* (2003) detectaram que a região centromérica dos cromossomos metacêntricos e acrocêntricos da abelha *Frieseomelitta varia* é rica em pares de bases AT (DAPI⁺). Entretanto, os estudos citogenéticos com himenópteros demonstram que o DAPI marca principalmente outras regiões cromossômicas. Rocha *et al.* (2003) também encontraram marcação positiva para DAPI no braço curto dos cromossomos acrocêntricos e no braço heterocromático dos pseudoacrocêntricos de *F. varia*. Brito *et al.* (2003) detectaram uma ampla banda DA/DAPI⁺ num cromossomo grande de *P. peckolti*. Rocha *et al.* (2002) observaram que o DAPI coloriu integralmente os cromossomos em estágio de prometáfase das células de *Melipona seminigra fuscopilosa*. A fluorescência obtida com DAPI para os cromossomos de *W. auropunctata* revela que a heterocromatina presente nos mesmos possui grande riqueza de seqüências de pares de bases AT.

Considerando os núcleos interfásicos das células cerebrais de *W. auropunctata*, partes deles foram marcadas com DAPI, evidenciando a presença da heterocromatina ou da cromatina que não se descondensa ao final da telófase, mantendo-se condensada durante a intérfase (Alberts *et al.*, 2006).

O presente estudo é o primeiro registro citogenético para uma espécie da tribo Blepharidattini, sendo o cariótipo de *W. auropunctata* caracterizado em nível de número, morfologia e marcação cromossômica heterocromática e servirá de base para futuros estudos sobre a evolução do cariótipo em Myrmicinae.

Referências Bibliográficas

- Alberts, B. *et al.* 2006. **Biologia molecular da célula**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed. 1463 p.
- Almeida, P. M., Carvalho, C. R. 2004. NOR-associated heterochromatin of pepper chromosomes stained with acridine orange. **Caryologia** 57(2): 172-176.
- Araújo, S. M. R. *et al.* 2000. The B chromosome system of *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* (Hymenoptera, Sphecidae). 1. Banding analysis. **Cytobios** 101(1): 7-13.
- Araújo, S. M. R. *et al.* 2002. Genetic load caused by variation in the amount of rDNA in a wasp. **Chromosome Research** 10: 607-613.
- Bolton, B. 1994. **Identification guide to the ant genera of the world**. London: Harvard University Press. 222 p.
- Brito, R. M., Miyazawa, C. S., Pompolo, S. G. 1999. First karyotype characterization of four species of *Partamona* (Friese, 1980) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) in Mato Grosso State, Brazil. **Cytobios** 100: 19-26.
- Brito, R. M. *et al.* 2003. Cytogenetic data of *Partamona peckolti* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) by C banding and fluorochrome staining with DA/CMA₃ and DA/DAPI. **Genetics and Molecular Biology** 26(1): 53-57.
- Brito, R. M. *et al.* 2005. Cytogenetic characterization of two *Partamona* species (Hymenoptera, Apinae, Meliponini) by fluorochrome staining and localization of 18S rDNA clusters by Fish. **Cytologia** 70(4): 373-380.

- Camacho, J. P. M. *et al.* 1991. G banding in two species of grasshoppers and its relationships to C, N and fluorescence banding techniques. **Genome** 34: 638-643.
- Clark, D. B. *et al.* 1982. The tramp ant *Wasmannia auropunctata*: autoecology and effects on ant diversity and distribution on Santa Cruz Island, Galapagos. **Biotropica** 14(3): 196-207.
- Costa, K. F., Brito, R. M, Miyazawa, C. S. 2004. Karyotypic description of four species of *Trigona* (Jurine, 1807) (Hymenoptera, Apidae, Melipopinae) from the State of Mato Grosso, Brazil. **Genetics and Molecular Biology** 27(2): 187-190.
- Delabie, J. H. C., Mariano, C. S. F. 2005. Diversidade, citogenética e inflação taxonômica em Formicidae. *In*: Ulloa-Chacon, P., Chaves, M. C. (Eds.). **Memorias do V Coloquio de Insectos Sociales**. Colombia: Ed. Universidad del Valle. p. 29-34.
- Diniz, J. L. M., Brandão, C. R., Yamamoto, C. I. 1998. Biology of *Blepharidatta* ants, the sister group of the Attini: a possible origin of fungus-ant symbiosis. **Naturwissenschaften** 85: 270-274.
- Exbrayat, J. M. 2000. **Genome visualization by classic methods in light microscopy**. Boca Raton: CRC Press. 195 p.
- Fabres, G., Brown, W. L., Jr. 1978. The recent introduction of the pest ant *Wasmannia auropunctata* into New Caledonia. **Journal of the Australian Entomological Society** 17: 139-142.

- Fadini, M. A. M., Pompolo, S. G. 1996. Cytogenetics of some species of the tribe Attini (Hymenoptera, Formicidae) from the region of Viçosa, MG. **Brazilian Journal of Genetics** 19(1): 53-55.
- Goñi, B., Zolessi, L. C., Imai, H. T. 1983. Karyotypes of thirteen ant species from Uruguay (Hymenoptera, Formicidae). **Caryologia** 36(4): 363-371.
- Guerra, M., Souza, M. J. 2002. **Como observar cromossomos: guia de técnicas em citogenética, vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto: FUNPEC. 132 p.
- Hirai, H., Yamamoto, M., Ogura, K. 1994. Multiplication of 28S and NOR activity in chromosome evolution among ants of the *Myrmecia pilosula* species complex. **Chromosoma** 103: 171-178.
- Hirai, H., Yamamoto, M., Taylor, R. W. 1996. Genomic dispersion of the 28S rDNA during karyotypic evolution in the genus *Myrmecia* (Formicidae). **Chromosoma** 105: 190-196.
- Imai, H. T. 1991. Mutability of constitutive heterochromatin (C-bands) during eukaryotic chromosomal evolution and their cytological meaning. **Japanese Journal of Genetics** 66: 635-661.
- Imai, H. T., Crozier, R. H., Taylor, R. W. 1977. Karyotype evolution in Australian ants. **Chromosoma** 59: 341-393.
- Imai, H. T., Taylor, R. W., Crozier, R. H. 1994. Experimental bases for the minimum interaction theory. I. Chromosome evolution in ants of the *Myrmecia pilosula* species complex (Hymenoptera: Formicidae: Myrmeciinae). **Japanese Journal of Genetics** 69: 137-182.

- Imai, H. T. *et al.* 1986. Theoretical bases for karyotype evolution. I. The minimum-interaction hypothesis. **American Naturalist** 128(6): 900-920.
- Imai, H. T. *et al.* 1988. Modes of spontaneous evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. **Japanese Journal of Genetics** 63: 159-185.
- Imai, H. T. *et al.* 2002. Estimation of the highest chromosome number of eukaryotes based on the minimum interaction theory. **Journal of Theoretical Biology** 217: 61-74.
- Juan, G., Pan, W., Darzynkiewicz, Z. 1996. DNA segments sensitive to single-strand-specific nucleases are present in chromatin of mitotic cells. **Experimental Cell Research** 227: 197-202.
- Kusnezov, N. 1952. El género *Wasmannia* en la Argentina (Hymenoptera, Formicidae). **Acta Zoologica Lilloana** 10: 173-182.
- Lorite, P. *et al.* 1997. Analysis of the nucleolar organizing regions in the ant *Tapinoma nigerrimum* (Hymenoptera, Formicidae). **Heredity** 78: 578-582.
- Lorite, P., Chica, E., Palomeque, T. 1996. G-banding and chromosome condensation in the ant *Tapinoma nigerrimum*. **Chromosome Research** 4(1): 77-79.
- Lubin, Y. D. 1984. Changes in the native fauna of the Galapagos Islands following invasion by the little fire ant, *Wasmannia auropunctata*. **Biological Journal of the Linnean Society** 21(1/2): 229-242.

- Maffei, E. M. D. *et al.* 2001. Silver staining of nucleolar organizer regions (NORs) in some species of Hymenoptera (bees and parasitic wasp) and Coleoptera (lady-beetle). **Cytobios** 104: 119-125.
- Mariano, C. S. F. *et al.* 2004a. *Dinoponera lucida* Emery (Formicidae: Ponerinae): largest number of chromosomes known in Hymenoptera. **Naturwissenschaften** 91: 182-185.
- Mariano, C. S. F. *et al.* 2001. Estudos cariotípicos de algumas espécies neotropicais de *Camponotus* Mayr (Hymenoptera, Formicidae). **Revista Brasileira de Entomologia** 45(4): 267-274.
- Mariano, C. S. F., Delabie, J. H. C., Pompolo, S. G. 2004b. Nota sobre uma colônia e o cariótipo da formiga neotropical *Cylindromyrmex brasiliensis* Emery (Hymenoptera: Formicidae: Cerapachyinae). **Neotropical Entomology** 33(2): 267-269.
- Mariano, C. S. F., Pompolo, S. G., Delabie, J. H. C. 1999. Citogenética das espécies gêmeas e simpátricas *Pachycondyla villosa* e *Pachycondyla* sp. 'inversa' (Ponerinae). **Naturalia** 24: 215-217.
- Meier, R. E. 1985. Interference behavior of two tramp ants (Hymenoptera: Formicidae) at protein baits on the Galapagos Islands, Ecuador. **Experientia** 41: 1228-1229.
- Murakami, T., Fujiwara, A., Yoshida, M. C. 1998. Cytogenetics of ten ant species of the tribe Attini (Hymenoptera, Formicidae) in Barro Colorado Island, Panama. **Chromosome Science** 2: 135-139.

- Naumann, K. 1994. An occurrence of two exotic ant (Formicidae) species in British Columbia. **Journal of the Entomological Society of British Columbia** 91: 69-70.
- Passera, L. 1993. Quels sont les caracteres etho-physiologiques des “fourmis vagabondes”? **Actes Colloques Insectes Sociaux** 8: 39-45.
- Passera, L. 1994. Characteristics of tramp species. *In*: Williams, D. F. (Ed.). **Exotic ants: biology, impact and control of introduced species**. Colorado: Westview Press. p. 23-43.
- Pompolo, S. G., Mariano, C. S. F. 2003. Considerações citogenéticas sobre a condição derivada da tribo Attini (Formicidae: Myrmicinae). *In*: **Anais do XVI Simpósio de Mirmecologia**. Florianópolis: Ed. UFSC. p. 267-270.
- Rocha, M. P. *et al.* 2002. DNA characterization and karyotypic evolution in the bee genus *Melipona* (Hymenoptera, Meliponini). **Hereditas** 136: 19-27.
- Rocha, M. P., Pompolo, S. G. 1998. Karyotypes and heterochromatin variation (C bands) in *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Genetics and Molecular Biology** 21(1): 41-45.
- Rocha, M. P., Pompolo, S. G., Campos, L. A. O. 2003. Citogenética da tribo Meliponini (Hymenoptera, Apidae). *In*: Melo, G. A. R., Santos, I. A. (Eds.). **Apoidea Neotropica: homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure**. Criciúma: Ed. UNESC. p. 311-320.

- Schultz, T. R., Meier, R. 1995. A phylogenetic analysis of the fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini) based on morphological characters of the larvae. **Systematic Entomology** 20: 337-370.
- Schweizer, D. 1980. Simultaneous fluorescent staining of R bands in a specific heterochromatin regions (DA/DAPI – bands) in human chromosomes. **Cytogenetics and Cell Genetics** 27: 190-193.
- Sharma, A. K., Sharma, A. 1999. **Plant chromosomes: analysis, manipulation and engineering**. The Netherlands: Harwood Academic Publishers. 371 p.
- Spencer, H. 1941. The small fire ant *Wasmannia* in citrus groves: a preliminary report. **Florida Entomologist** 24(1): 6-14.
- Torres, J. A. 1984. Diversity and distribution of ant communities in Puerto Rico. **Biotropica** 16(4): 296-303.
- Ulloa-Chacon, P., Cherix, D. 1988. Quelques aspects de la biologie de *Wasmannia auropunctata* (Roger) (Hymenoptera, Formicidae). **Actes Colloques Insectes Sociaux** 4: 177-184.
- Verma, R. S., Dosik, H., Lubs, H. A. 1977. Demonstration of color and size polymorphisms in human acrocentric chromosomes by acridine orange reverse banding. **The Journal of Heredity** 68: 262-263.
- Wheeler, W. M. 1908. The ants of Jamaica. **Bulletin of the American Museum of Natural History** 24: 159-163.

CAPÍTULO 3

Bulletin of Entomological Research (submetido)

Intercolonial and interspecific aggressiveness of *Wasmannia auropunctata* (Roger, 1863) (Hymenoptera: Formicidae)

A.L.B. Souza^{1*,2}, J.H.C. Delabie^{3,4} and J.E. Serrão⁵

¹ Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG 36570-000, Brasil;

² Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Sudoeste da Bahia, Jequié, BA 45206-510, Brasil;

³ Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA 45660-000;

⁴ Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC-CEPLAC), Itabuna, BA 45600-000, Brasil; ⁵ Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG 36570-000, Brasil

Resumo

Testes de agressividade foram conduzidos em laboratório para determinar se operárias de *Wasmannia auropunctata* (Myrmicinae) na sua região de origem, no Brasil, têm comportamento agressivo intercolonial e interespecífico contra operárias de *Pheidole* sp. Os resultados demonstraram que operárias de *W. auropunctata* foram mais ou igualmente agressivas nos confrontos intercoloniais do que nos interespecíficos, confirmando que na sua região nativa *W. auropunctata* apresenta estrutura multicolonial e que outras espécies de formigas podem coexistir com ela na mesma área, desde que os limites territoriais sejam mantidos. Esta é a primeira evidência experimental de comportamento multicolonial em *W. auropunctata* focalizando populações brasileiras numa ampla escala geográfica, acima de 1000 km.

Abstract

Aggressiveness tests were conducted in laboratory to determine if workers of *Wasmannia auropunctata* (Myrmicinae) in its region of origin, in Brazil, have intercolonial and interspecific aggressive behavior against workers of *Pheidole* sp. The results demonstrate that workers of *W. auropunctata* were more or equally aggressive in the intercolonial confrontations than in the interspecific ones, confirming that in its native region *W. auropunctata* has a multicolonial structure and that other species of ants may coexist with it in the same area, since territorial limits remain. This is the first experimental evidence of multicolonial behavior in *W. auropunctata* focusing Brazilian populations on a large geographical scale, above 1000 km.

Keywords: Little fire ant, aggressiveness, multicolonial structure, territorial limit, competition, *Pheidole* sp.

* Fax: (31) 3899-4012

E-mail: anabiggi@insecta.ufv.br

Introduction

In ants, cuticular hydrocarbons play an important role in the recognition of nestmates (Lahav et al., 1999). These hydrocarbons form the colony odor, varying dynamically with the time, together with the signals obtained from environment (Vander Meer & Morel, 1998; Howard & Blomquist, 2005). So ants homogenize their cuticular hydrocarbons frequently, in order to create a uniform colony-specific profile or gestalt odor (Crozier & Dix, 1979). In the gestalt model, the colony odor results from mixture of individual odors of queens and workers plus odors from environment, which are transferred through grooming and trophallaxis among individuals resulting in a common colonial odor (Crozier & Dix, 1979; Dahbi et al., 1999). The recognition of a no characteristic odor among ants results in aggressiveness among them. In the case of familiar odors, the members of the colony commonly are recognized and the degree of aggression between the individuals is low or absent (Errard & Hefetz, 1997; Dahbi et al., 1999).

The distinction between nestmates and conspecific non-nestmates is possible because members of the same nest recognize the "colony odor", that acts as a chemical signature of the colony. Signals of recognition are genetically determined, but also derivatives from environmental sources, such as food and nests materials (Hölldobler & Michener, 1980; Beye et al., 1998).

In areas where ants have been introduced, such as *Linepithema humile*, they have not intercolonial aggressiveness, being the society characterized as unicolonial (Holway, 1999). In the unicolonial structure, the species forms more competitive colonies, mainly for a numerical advantage. Unicolonial populations invest the energy that would be placed in defense and territoriality in the production of more individuals, whereas in the multicolonial structure, the colonies have low population density and occupy relatively small territories that aggressively are defended against other conspecific colonies (Holway et al., 1998; Tsutsui et al., 2000; Giraud et al., 2002; Tsutsui & Suarez, 2003).

The ant *Wasmannia auropunctata* (Myrmicinae) is an important pest in tropical agroecosystems due to its painful stinging and because it is found associated to sap sucking insects (Coccidae, Aphididae, Psyllidae and Aleurodidae) of its host plants (Delabie, 1988). In association with this ant, the population of the pseudococcid *Planococcus citrii* in cocoa fruits was three times higher than without ants (Souza et al., 1998). Besides, it is a pest also because it can kill many other

animal species (birds, snakes, etc.) (Jourdan et al., 2001) and other ant species (Le Breton et al., 2003). In the regions where this ant was introduced, such as in New Caledonia, they have low agonistic behavior among the populations. However, in Brazil, inside of the region of origin of *W. auropunctata*, there is high aggressiveness between workers of distinct colonies in the southeastern region of the Bahia (Errard et al., 2002; Le Breton et al., 2004).

The objective of this study was to verify if workers of *W. auropunctata* in its region of origin have intercolonial and interspecific aggressiveness, considering a large geographical scale.

Materials and methods

Ants

Nine colonies of *W. auropunctata* were obtained from the following environments and localities: two colonies in the campus of the Federal University of Viçosa (UFV), state of Minas Gerais (20°45'S, 42°52'W), established in shrubs trunks, four colonies in the cocoa plantations of the Center of Research of the Cocoa (CEPLAC), Ilhéus, state of Bahia (14°45'S, 39°13'W) and three colonies in the coconut plantations of the Barramares, Ponta da Tulha district, Ilhéus, state of Bahia (14°37'S, 39°04'W). The distance between Minas Gerais and Bahia locals is about 1200 Km, whereas colonies of CEPLAC and Barramares are 50 Km distant. The colonies were collected manually and kept in laboratory at $25 \pm 1^\circ \text{C}$, $65 \pm 1\% \text{ rh}$ and photoperiod 12:12 L:D, fed on honey and water *ad libitum*. Only a colony of *Pheidole* sp. (Myrmicinae) was collected in the UFV, in view of not the occurrence of others in neighborhoods of the colonies of *W. auropunctata*. *Pheidole* sp. was used in this study for being present in one of the areas where *W. auropunctata* was found, with the purpose of comparison in relation to intraspecific confrontations between workers of *W. auropunctata*.

Aggressiveness

The aggressiveness tests among workers of *W. auropunctata* from different localities and among these ants and *Pheidole* sp. were carried out in Petri dishes (8.5 cm) whose central region was isolated with one another Petri dishes (3 cm) in inverted position in relation to the large dish resulting in an arena with diameter of 3 cm. The ants were transferred to arena with the aid of a brush. Workers of different

colonies were brought one against the other, during five minutes in each assay (Errard & Hefetz, 1997).

Five behavior categories of aggressiveness were established: 1 = antennal contacts, 2 = withdrawal in opposing direction, 3 = push-up of abdome, 4 = biting, 5 = fight. The categories 1 and 2 were considered non-aggressive behaviors and the others, aggressive behaviors. The referring numbers to the categories are weights attributed to each behavior.

During encounters was registered the behavior category and the time(s) that each interaction occurred, following the calculation of an aggression index (Errard & Hefetz, 1997; Lahav et al., 1999; Souza et al., 2005) with the equation:

$$AI = \frac{\sum_{i=1}^n AI_i * t_i}{T}$$

where AI = aggression index, t_i = duration of each act and T = time of total interaction, defined as the sum of all times in which the ants interacted.

The aggression indexes for each colony were tested with ANOVA/test F using R statistical software (R Development Core Team, 2004). In the conduction of the assays, six treatments (table 1), with twelve repetitions each, were made.

Testing aggressiveness among workers of the same colony performed control.

Results

In all interspecific and intercolonial encounters, the workers presented aggressive behavior. The aggressiveness index varied from 1.03 (initial partial aggressiveness = 21%) to 4.89 (total aggressiveness = 100%), with the mean index from 1.64 to 3.05 (table 1). Two different groups could be established with ants of the BC group being more aggressive, in general, than those of the FAED group (Fig. 1, table 2). The exceptions refer to some confrontations of *W. auropunctata* from UFV with workers of *Pheidole* sp. (group D), whose aggression indexes were high, one of theirs reaching the value of 4.29. We found fight and reciprocal mutilation in 50% of the encounters among colonies of *W. auropunctata* from CEPLAC with those from Barramares (group C). Workers of *W. auropunctata* avoided the physical confrontation, get out the way one of the other in the arena. After antennal contacts, the withdrawal in opposite direction or aggression occurred.

Table 1. Relative treatments the encounters among workers of *Wasmannia auropunctata* (*Wa*) and *Pheidole* sp. (*Ph*), mean aggressiveness index and standard deviation for the 12 confrontations established in each situation.

| Treatments | Encounters | Mean aggressiveness index | Standard deviation |
|------------|---|---------------------------|--------------------|
| A | <i>Wa</i> of UFV x <i>Wa</i> of Barramares | 1.73 | 0.74 |
| B | <i>Wa</i> of CEPLAC x <i>Wa</i> of UFV | 2.42 | 1.15 |
| C | <i>Wa</i> of CEPLAC x <i>Wa</i> of Barramares | 3.05 | 1.18 |
| D | <i>Wa</i> of UFV x <i>Ph</i> | 2.01 | 0.98 |
| E | <i>Wa</i> of Barramares x <i>Ph</i> | 1.73 | 0.76 |
| F | <i>Wa</i> of CEPLAC x <i>Ph</i> | 1.64 | 0.52 |

Table 2. Analysis of variance of aggressiveness index between ants. A (*Wa* from UFV x *Wa* from Barramares), B (*Wa* from CEPLAC x *Wa* from UFV), C (*Wa* from CEPLAC x *Wa* from Barramares), D (*Wa* from UFV x *Ph*), E (*Wa* from Barramares x *Ph*) e F (*Wa* from CEPLAC x *Ph*). Two groupings were gotten: FAED and BC.

| Treatments | df | F test | p |
|------------|----|--------|---------|
| FA | 67 | 0.0558 | 0.8140 |
| FAE | 68 | 0.1960 | 0.8891 |
| FAED | 69 | 0.9939 | 0.3223 |
| FAEDB* | 70 | 4.7558 | < 0.05 |
| BC | 70 | 2.8539 | 0.09567 |

There is not significant difference between the treatments F and A, nor between FA with E and FAE with D, then the four treatments can be gathered. *But there is significant difference between the group FAED with the treatment B, therefore B can't be gathered the FAED. However, there is not significant difference between the treatments B and C, which can be gathered.

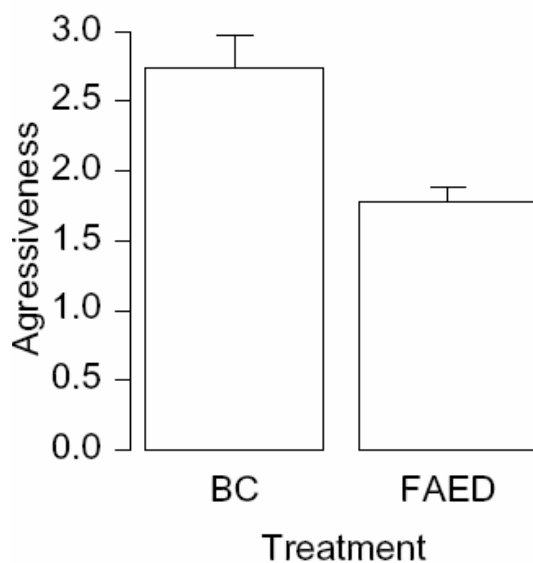


Fig. 1. Aggressiveness index between workers of *Wasmannia auropunctata* (*Wa*) from the conspecific non-nestmate workers and workers of *Pheidole* sp. (*Ph*), in accordance with the following confrontations: A = *Wa* from UFV x *Wa* from Barramares, B = *Wa* from CEPLAC x *Wa* from UFV, C = *Wa* from CEPLAC x *Wa* from Barramares, D = *Wa* from UFV x *Ph*, E = *Wa* from Barramares x *Ph*, F = *Wa* from CEPLAC x *Ph*.

Discussion

The high aggressiveness between the *W. auropunctata* workers from CEPLAC in relation to the conspecific non-nestmates from UFV and Barramares Land suggest that each group of colonies from each area must represent a distinct population. The evidences make us to assume that the most aggressive confrontations must have occurred between genetically distant workers. This supposition needs to be investigated through genetic studies. However, one explanation for the fact of the colonies from UFV and Barramares fight less between itself would be in consequence to be small colonies, and, therefore, results in lower aggressiveness. Balas & Adams (1996) found that incipient colonies of ants are less aggressive than mature colonies in *Solenopsis* species.

The high aggressiveness of workers from CEPLAC may be due to the fact that these colonies are permanently established in this locality and they are mature colonies, because species that occupy permanent territories are more aggressive (Wilson, 1971). In fact, we knew that colonies from CEPLAC are established in its areas at least fifteen years (A. L. B. Souza, personal observation).

We find that the aggressiveness in the confrontations among *W. auropunctata* workers was not associated with geographic distance, since found in our study high aggressiveness between the workers of *W. auropunctata* from CEPLAC and Barramares (at 50 km), as well as between the workers from CEPLAC and UFV (at 1200 km), but lower aggressiveness between the workers from UFV and Barramares, also at 1200 km. Le Breton et al. (2004) found high aggressiveness between colonies of *W. auropunctata* established in cocoa plantations 3 km distant, but without aggressiveness between colonies at 20 km.

The aggressiveness among colonies of *W. auropunctata* from distant places indicates that this ant is multicolonial in its native area, since in the multicolonial structure the members of distinct colonies are hostile among them (Bourke & Franks, 1995; Le Breton et al., 2004; Errard et al., 2005). The recognition of a no characteristic odor between conspecific non-nestmates of *W. auropunctata* was responsible to the aggressive behaviors. This is the first experimental evidence of multicolonial structure in *W. auropunctata* focusing Brazilian populations on a large geographical scale, covering above 1000 km.

We expected that the aggressiveness in the confrontations between *W. auropunctata* and *Pheidole* sp. was higher than in intraspecifics ones involving

workers of *W. auropunctata*, what it did not occur in two treatments, but only in one of them. However, dramatic territorial fighting in ants has been registered with more frequency between colonies of same species than between colonies of different species (Hölldobler & Wilson, 1990). The low aggressiveness between *Pheidole* sp. and *W. auropunctata* from CEPLAC and Barramares may be due to the fact that workers of *W. auropunctata* did not recognize *Pheidole* sp. as potential competitor in the established confrontations, and vice versa, once that both the species had not contact until then. However, when the confrontations occurred between workers of *Pheidole* sp. with *W. auropunctata* from UFV, which are sympatric, it had high aggressive index. In this case, we suggest the existence of competition between both the species in the UFV area. Hölldobler & Wilson (1990) found competition between specimens of *Pheidole* and *Oecophylla longinoda*, with fight and mutual exclusion, suggesting that species of *Pheidole* defend spatiotemporal territories. Therefore, the coexistence of both, *W. auropunctata* and *Pheidole* sp., in same locality (UFV) is consequence of territorial limits well established between them.

In conclusion, workers of *W. auropunctata* were more or equally aggressive in intercolonial confrontations than in most of interspecifics ones, confirming that in its native region *W. auropunctata* has a multicolonial structure and that other species of ants may coexist with it in the same area, since its territorial limits remain.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. Terezinha M. C. Della Lucia and Ms. Cidália Gabriela Santos Marinho at Federal University of Viçosa for their suggestions and comments on the preparation of the manuscript; to José Raimundo Maia dos Santos and José Crispim Soares do Carmo at CEPLAC and Jailson Biggi de Souza for assistance in the field. The authors were supported by a grant from CNPq (National Council for Scientific and Technical Development), FAPEMIG (Foundation for Research Support of the Minas Gerais State) and FAPESB/PRONEX/CNPq 048/2003.

References

- Balas, M. T. & Adams, E. S.** (1996) Nestmate discrimination and competition in incipient colonies of fire ants. *Animal Behaviour* **51**, 49-59.
- Beye, M., Neumann, P., Chapuisat, M., Pamilo, P. & Moritz, R. F. A.** (1998) Nestmate recognition and the genetic relatedness of nests in the ant *Formica pratensis*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **43**, 67-72.
- Bourke, A. F. G. & Franks, N. R.** (1995) Evolution and ecology of multiple-queen societies. pp. 258-298 in Bourke, A. F. G. & Franks, N. R. (Eds) *Social evolution in ants*. Princeton University Press, Princeton.
- Crozier, R. H. & Dix, M. W.** (1979) Analysis of two genetic models for the innate components of colony odor in social Hymenoptera. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **4**, 217-224.
- Dahbi, A., Hefetz, A., Cerdá, X. & Lenoir, A.** (1999) Trophallaxis mediates uniformity of colony odor in *Cataglyphis iberica* ants (Hymenoptera, Formicidae). *Journal of Insect Behavior* **12**, 559-567.
- Delabie, J. H. C.** (1998) Ocorrência de *Wasmannia auropunctata* (Roger, 1863) (Hymenoptera, Formicidae, Myrmicinae) em cacauais na Bahia, Brasil. *Revista Theobroma* **18**, 29-37.
- Errard, C., Delabie, J. H. C., Jourdan, H. & Hefetz, A.** (2005) Intercontinental chemical variation in the invasive ant *Wasmannia auropunctata* (Roger) (Hymenoptera: Formicidae): a key to the invasive success of a tramp species. *Naturwissenschaften* **92**, 319-323.
- Errard, C. & Hefetz, A.** (1997) Label familiarity and discriminatory ability of ants reared in mixed groups. *Insectes Sociaux* **44**, 189-198.
- Errard, C., Jourdan, H., Glaude, C., Delabie, J. H. C. & Hefetz, A.** (2002) Discrimination intra et interspécifique chez la fourmi vagabonde *Wasmannia auropunctata*. *Actes des Colloques Insectes Sociaux* **15**, 82-89.
- Giraud, T., Pedersen, J. S., Keller, L.** (2002) Evolution of supercolonies: the argentine ants of southern Europe. v. 99. p. 6075-6079 in *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Hölldobler, B. & Michener, C. D.** (1980) Mechanisms of identification and discrimination in social Hymenoptera. pp. 35-57 in: Markl, H. (Ed.) *Evolution of social behavior: hypotheses and empirical tests*. Chemie GmbH, Weinheim.

- Hölldobler, B. & Wilson, E. O.** (1990) *The ants*. 732 pp. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Holway, D. A.** (1999) Competitive mechanisms underlying the displacement of native ants by the invasive argentine ant. *Ecology* **80**, 238-251.
- Holway, D. A., Suarez, A. V. & Case, T. J.** (1998) Loss of intra-specific aggression in the success of a widespread invasive social insect. *Science* **283**, 949-952.
- Howard, R. W. & Blomquist, G. J.** (2005) Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annual Review of Entomology* **50**, 371-393.
- Jourdan, H., Sadlier, R. A. & Bauer, A. M.** (2001) The impact of the little fire ant invasion (*Wasmannia auropunctata* (Roger)) on the new Caledonian herpetofauna: results of a study in sclerophyll forest habitat. *Sociobiology* **38**, 283-301.
- Lahav, S., Soroker, V. & Hefetz, A.** (1999) Direct behavioral evidence for hydrocarbons as ant recognition discriminators. *Naturwissenschaften* **86**, 246-249.
- Le Breton, J., Chazeau, J. & Jourdan, H.** (2003) Immediate impact of invasion by *Wasmannia auropunctata* (Hymenoptera: Formicidae) on native litter ant fauna in a New Caledonian rain forest. *Australian Ecology* **28**, 204-209.
- Le Breton, J., Delabie, J. H. C., Chazeau, J., Dejean, A. & Jourdan, H.** (2004) Experimental evidence of large-scale unicoloniality in the tramp ant *Wasmannia auropunctata* (Roger). *Journal of Insect Behavior* **17**, 263-271.
- R Development Core Team.** (2004) *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-00-3, URL <http://www.R-project.org>.
- Souza, A. L. B., Delabie, J. H. C. & Fowler, H. G.** (1998) *Wasmannia* spp. (Hym., Formicidae) and insect damages to cocoa in Brazilian farms. *Journal Applied Entomology* **122**, 339-341.
- Souza, D. J., Della Lucia, T. M. C. & Lima, E. R.** (2005) Queen adoption in colonies of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus molestans* (Hymenoptera: Formicidae). *Behavioural Processes* **70**, 62-68.
- Tsutsui, N. D. & Suarez, A. V.** (2003) The colony structure and population biology of invasive ants. *Conservation Biology* **17**, 48-58.
- Tsutsui, N. D., Suarez, A. V., Holway, D. A., Case, T. J.** (2000) Reduced genetic variation and the success of ant invasive species. v. 97. p. 5948-5953 in *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.

Vander Meer, R. K. & Morel, L. (1998) Nestmate recognition in ants. pp. 79-103 in Vander Meer, R. K., Breed, M. D., Espelie, K. E. & Winston, M. L. (Eds) *Pheromone communication in social insects*. Westview Press, Colorado.

Wilson, E. O. (1971) *The insect societies*. 548 pp. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachussets.

3. CONCLUSÕES GERAIS

Marcadores RAPD discriminaram populações nativas de *W. auropunctata* e *W. sp. aff. rochai* provenientes do Brasil (estado da Bahia) e/ou da Guiana Francesa.

Os valores dos polimorfismos e das heterozigosidades estimadas encontradas para as populações de ambas as espécies de *Wasmannia* foram elevados.

As populações de *W. auropunctata* presentes em canaviais e bananais de Jequié mostraram-se geneticamente distanciadas das populações estabelecidas em cacauais de Jequié, de Ilhéus e da Guiana Francesa.

As distâncias genéticas entre as populações de *W. auropunctata* de Ilhéus foram elevadas, ao passo que estas populações foram geneticamente próximas às da Guiana Francesa.

As populações de *W. auropunctata* de Ilhéus e Una estudadas citogeneticamente possuem cariótipo $2n = 32$, sendo dez pares metacêntricos (M) e seis pares acrocêntricos (A).

Um dos braços das cromátides irmãs do décimo par foi positivo para CMA₃ e laranja de acridina, sendo indicativo da presença de regiões organizadoras de nucléolo.

A região pericentromérica da maioria dos cromossomos e algumas partes dos núcleos interfásicos foram marcadas com DAPI, o que evidencia a heterocromatina rica em AT.

Operárias de *W. auropunctata* foram mais ou igualmente agressivas nos confrontos intercoloniais do que nos interespecíficos estabelecidos com *Pheidole sp.*

Wasmannia auropunctata apresenta estrutura multicolonial na sua região nativa.