

IDENTIFICAÇÃO DE FORMIGAS CORTADEIRAS DO GÊNERO *Acromyrmex* (Hymenoptera:Formicidae) ATRAVÉS DE ISOENZIMAS

AUGUSTIN, Eliane¹; LOECK, Alci E.²; STORCH, Gustavo²; GRÜTZMACHER, Douglas D.²; AFONSO, Ana Paula S.²; GUSMÃO, Luciana G.²

¹ Embrapa Clima Temperado – Cx. Postal, 403 – CEP 96001-970 Pelotas, RS

² UFPEL/FAEM – Depto. de Fitossanidade – Campus Universitário – Cx. Postal 96010-900 - Pelotas, RS
(Recebido para publicação em 29/09/1999)

RESUMO

Eletroforese em gel de poliacrilamida foi utilizada para análises de esterase, isocitrato desidrogenase e malato desidrogenase em formigas de colônias de *Acromyrmex heyeri*, *A. crassispinus*, *A. lundii*, *A. octospinosus*, *A. laticeps*, *A. striatus* e *A. ambiguus*, com o objetivo de desenvolver um meio seguro de identificação de espécies do gênero *Acromyrmex*. Não foram verificadas variações isoenzimáticas relacionadas ao tamanho das formigas. Variações qualitativas e quantitativas foram encontradas nas análises de diferentes segmentos do corpo, dependendo da espécie. Os padrões eletroforéticos de isocitrato desidrogenase permitiram diferenciar todas as espécies, enquanto que as análises de esterase e malato desidrogenase não possibilitaram a diferenciação de *A. crassispinus* e *A. lundii*. Os coeficientes de similaridade variaram entre 0,00 e 0,62, indicando grande variabilidade isoenzimática nos genótipos estudados. A análise de agrupamento, efetuada através do UPGMA (método da média aritmética não ponderada), evidenciou a dissimilaridade de *A. ambiguus* em relação às demais e permitiu concluir que a técnica utilizada pode ser empregada para a identificação de espécies deste gênero de formigas cortadeiras.

Palavras-chave: isocitrato desidrogenase, esterase, malato desidrogenase, quenquém

ABSTRACT

Polyacrilamide gel electrophoresis was used to analyse esterase, isocitrate dehydrogenase and malate dehydrogenase in *Acromyrmex heyeri*, *A. crassispinus*, *A. lundii*, *A. octospinosus*, *A. laticeps*, *A. striatus* e *A. ambiguus* ants, aiming to develop a safe method to identify different *Acromyrmex* species. Isoenzymatic variations related to ants size were not observed. Qualitative and quantitative variations were found in different parts of the insect bodies, depending on the species. Electrophoretic patterns of isocitrate dehydrogenase allowed the differentiation of all species studied. However, *A. crassispinus* and *A. lundii* were not differentiated through esterase and malate dehydrogenase isoenzymatic patterns. Similarity coefficients varying between 0.00 and 0.62 indicated great genetic variability in the genotypes studied. Cluster analysis, using the UPGMA method (unweighted pair-group method for arithmetic averages), showed the dissimilarity of *A. ambiguus* in relation to the other ants and revealed that isoenzyme analysis can be used to identify species of this genus of leaf-cutting ants.

Key-word: isocitrate dehydrogenase, esterase, malate dehydrogenase, quenquém

INTRODUÇÃO

As formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* são responsáveis por grandes prejuízos à agricultura. Esses insetos se distinguem dos demais por atacarem ampla diversidade de vegetais, incluindo plantas ornamentais e cultivadas, reflorestamentos e pastagens. Podem, ainda, produzir danos indiretos, como abalos em estruturas de pontes e prédios. Apresentam ampla distribuição desde o sul dos Estados Unidos até o centro da Argentina, sendo a maior

diversidade de espécies encontrada no Brasil. Atualmente, estão descritas na literatura, 18 espécies e oito subespécies. No Rio Grande do Sul, JURUENA e CACHAPUZ (1980) registraram onze espécies e GUSMÃO (1996), em levantamento sobre espécies que ocorrem na região sul do Rio Grande do Sul, encontrou sete espécies. Existem muitos estudos sobre sua biologia, fisiologia, morfologia, ecologia, métodos de controle, etc. Entretanto, em relação à taxonomia, os estudos ainda são escassos. Cada espécie apresenta características próprias de nidificação, comportamento, hábitos de corte de folhas, especificidade de coleta de material, etc. O desconhecimento desses fatores tem levado vários métodos de controle ao insucesso. Torna-se importante, portanto, a perfeita identificação destes insetos. Os métodos morfométricos tradicionalmente usados na identificação deste grupo de formigas cortadeiras apresentam limitações pelo fato de serem aplicados sobre as operárias maiores, o que nem sempre as caracteriza, devido à grande variabilidade fenotípica que apresentam, pois trata-se de uma sociedade polimórfica, cuja divisão de trabalho ocorre de acordo com o tamanho dos insetos. Diante das circunstâncias, foram procuradas novas alternativas para detectar, com maior precisão, diferenças genotípicas.

Desde a década de 1960, a análise de isoenzimas foi o método dominante na avaliação da variação genética em populações naturais. Outras técnicas, atualmente, estão disponíveis para o estudo da diversidade genética e todas apresentam vantagens e desvantagens (FERREIRA e GRATAPAGLIA, 1995), sendo RAPD (random amplified polymorphism DNA) a mais comumente usada. Em revisão efetuada por HARRY *et al* (1998), baseada em 70 trabalhos publicados, envolvendo sete ordens e 34 famílias de insetos, sobre o uso destes marcadores em entomologia aplicada e evolutiva, foi verificado que, embora tenham aplicabilidade limitada acima do nível intraespecífico (famílias, gêneros, grupos e subgrupos de espécies), indicando sua ineficácia para determinação de filogenia, permitem esclarecer relações entre espécies crípticas e entre e dentro de populações, assim como a identificação de biotipos ou clones.

Os marcadores isoenzimáticos geralmente fornecem ampla informação genética para várias aplicações. A técnica de isoenzimas é relativamente barata e tecnicamente acessível e, embora em número limitado, vários locos podem ser analisados rápida e simultaneamente. Por isso, optou-se pelo uso desta técnica para a identificação de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex*, objetivo deste trabalho.

MATERIAL E MÉTODOS

Sete espécies de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex*, de diferentes procedências, listadas na Tabela 1, foram estudadas. Foi utilizada eletroforese horizontal em géis de poliacrilamida, em concentrações de 5%, para análises de

isocitrato desidrogenase e malato desidrogenase e 7%, para esterase, empregando-se os sistemas de tampões descritos por SHIELDS *et al.* (1983), para as desidrogenases, e por SCANDALIOS (1969), para esterase.

TABELA 1. Espécies de formigas utilizadas para análise de padrões isoenzimáticos e procedência

ESPÉCIE	PROCEDÊNCIA
<i>Acromyrmex octospinosus</i> (Reich, 1793)	Jari, PA
<i>Acromyrmex laticeps</i> Emery, 1905	Jari, PA
<i>Acromyrmex crassispinus</i> Forel, 1909	Encruzilhada do Sul, RS
<i>Acromyrmex heyeri</i> Forel, 1899	Encruzilhada do Sul, RS
<i>Acromyrmex lundii</i> (Guérin, 1838)	Encruzilhada do Sul, RS
<i>Acromyrmex striatus</i> (Roger, 1863)	Rio Grande, RS
<i>Acromyrmex ambiguus</i> Emery, 1887	Pelotas, RS

A extração foi efetuada em formigas congeladas de diferentes tamanhos, com peso variando entre 1 a 19 mg, ou em segmentos do corpo dos insetos, usando-se o tampão empregado no preparo do gel, acrescido de 0,15% de 2-mercaptoetanol, em diluição de 1:5. A amostragem consistiu de cinco a dez indivíduos de cada espécie.

As migrações foram feitas com uma diferença de potencial de 10 v/cm até que o fronte, formado pelo azul de bromofenol, atingisse 9 cm do ponto de aplicação.

Para a revelação dos géis foram usados os sistemas de coloração descritos por SCANDALIOS (1969), para análises de esterase, por AYALA *et al.* (1972), para malato desidrogenase e por VALLEJOS (1983), para isocitrato desidrogenase. Os géis foram fixados em solução de metanol, ácido acético e água, na proporção de 5:5:1.

As análises de similaridade e de agrupamento das espécies de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex*, com base nos padrões isoenzimáticos observados, foram efetuadas usando o coeficiente de Jaccard e o UPGMA (método da média aritmética não ponderada), através do NTSYS, v.1.5. (ROHLF, 1989).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises isoenzimáticas em formigas cortadeiras das espécies *Acromyrmex striatus* (Figura 1), *A. heyeri* e *A. ambiguus*, com peso variando entre um e 19mg, não mostraram variações relacionadas ao tamanho dos insetos.

Quando comparados segmentos do corpo com formigas inteiras de *A. heyeri*, *A. ambiguus* e *A. striatus*, foram observadas variações qualitativas e quantitativas em isoenzimas de isocitrato desidrogenase, malato desidrogenase e esterase, dependendo da espécie.

Variações intraespecíficas não foram verificadas nas sete espécies de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* analisadas. Foram detectados seis padrões isoenzimáticos de esterase (Figura 2) e de malato desidrogenase (Figura 3), e sete de isocitrato desidrogenase (Figura 4), com, respectivamente, duas a oito, uma a três, e duas a três bandas, anódicas ou catódicas.

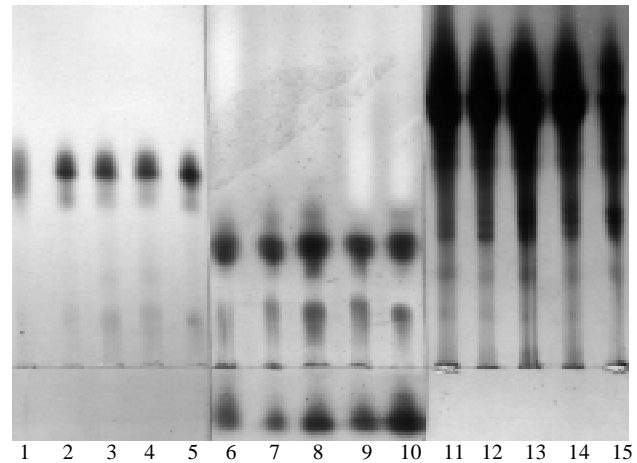


Figura 1. Zimograma de isocitrato desidrogenase (1 a 5), malato desidrogenase (6 a 10) e esterase (11 a 15) em formigas de *Acromyrmex striatus* de 1mg (1, 2, 6, 7, 11, 12), 3mg (3, 4, 8, 9, 13 e 14) e 19mg (5, 10 e 15).

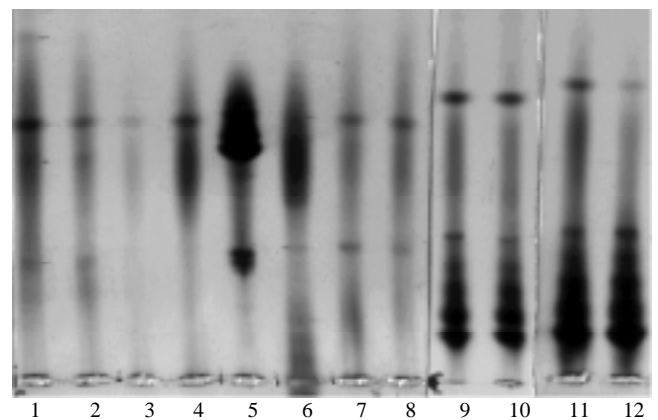


Figura 2. Zimograma de esterase em *A. octospinosus* (1 e 2), *A. laticeps* (3 e 4), *A. striatus* (5), *A. ambiguus* (6), *A. heyeri* (7 e 8), *A. crassispinus* (9 e 10) e *A. lundii carli* (11 e 12).

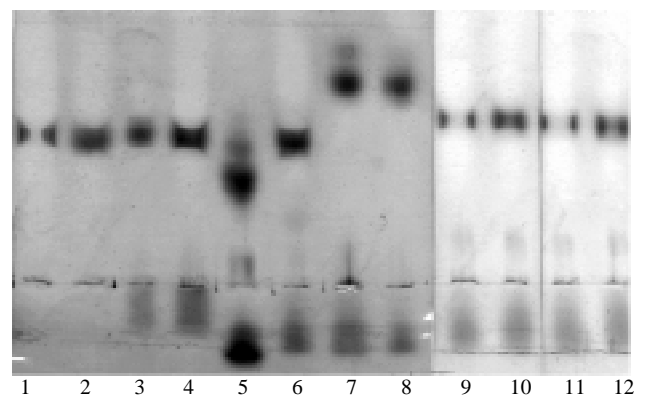


Figura 3. Zimograma de malato desidrogenase em *A. octospinosus* (1 e 2), *A. laticeps* (3 e 4), *A. striatus* (5), *A. ambiguus* (6), *A. heyeri* (7 e 8), *A. crassispinus* (9 e 10) e *A. lundii carli* (11 e 12).

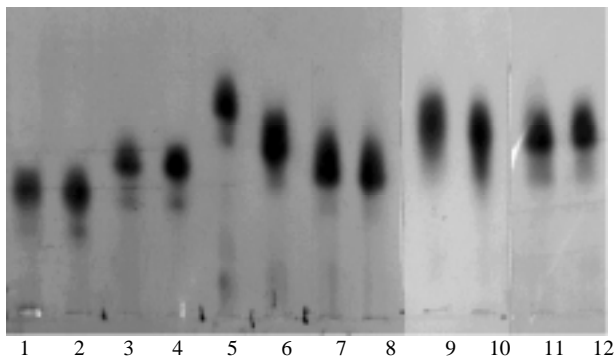


Figura 4. Zimograma de isocitrato desidrogenase em *A. octospinosus* (1 e 2), *A. laticeps* (3 e 4), *A. striatus* (5), *A. ambiguus* (6), *A. heyeri* (7 e 8), *A. crassispinus* (9 e 10) e *A. lundii carli* (11 e 12).

Estas, foram observadas apenas em padrões de esterase de *A. ambiguus*, e de malato desidrogenase, em todas as espécies, à exceção de *A. octospinosus*. DIEHL-FLEIG *et al.* (1992), analisando a descendência (operárias e alados) de onze colônias de *A. heyeri* e de quatorze colônias de *A. striatus* (sete a dez indivíduos), além de 60 sexuados de *A. striatus*, também verificaram que as esterases apresentaram-se monomórficas em cada uma das espécies.

Entretanto, observaram apenas um loco de malato desidrogenase, com três alelos, sendo Mdh^{FF} específico de *A. heyeri* e Mdh^S e Mdh^F , com predominância do primeiro, presentes em *A. striatus*. Polimorfismo em malato desidrogenase e monomorfismo em esterase foram, também, observados por PAMILO *et al.* (1975), estudando seis sistemas enzimáticos em oito espécies de formigas do gênero *Formica*. Entretanto, quando pré-pupas e pupas de *A. heyeri* e *A. ambiguus* foram utilizadas para análise de isoenzimas de esterase e malato desidrogenase, foi observado polimorfismo dentro das duas espécies (entre indivíduos do mesmo e de diferentes tamanhos e entre estágios de desenvolvimento) e entre estas espécie (COLARES, 1994).

Os padrões eletroforéticos de isocitrato desidrogenase permitiram diferenciar todas as espécies. Os resultados obtidos nas análises de esterase e malato desidrogenase, no entanto, não permitiram a diferenciação de *A. crassispinus* e *A. lundii*. Os coeficientes obtidos (Tabela 2), com base na presença ou ausência de bandas, indicaram maior similaridade entre estas espécies (0,62). Nenhuma similaridade foi encontrada na comparação entre os padrões isoenzimáticos de *A. ambiguus* e os das demais, à exceção de *A. laticeps* (0,08), e entre *A. laticeps* e *A. striatus*. Nas comparações entre as demais espécies, os coeficientes obtidos foram baixos, variando entre 0,04 e 0,30, o que indica grande variabilidade isoenzimática existente nos genótipos analisados.

TABELA 2. Coeficientes de similaridade entre espécies de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex*

	<i>A. striatus</i>	<i>A. ambiguus</i>	<i>A. crassispinus</i>	<i>A. laticeps</i>	<i>A. octospinosus</i>	<i>A. l. carli</i>	<i>A. heyeri</i>
<i>A. striatus</i>	1,00						
<i>A. ambiguus</i>	0,00	1,00					
<i>A. crassispinus</i>	0,04	0,00	1,00				
<i>A. laticeps</i>	0,00	0,08	0,13	1,00			
<i>A. octospinosus</i>	0,06	0,00	0,14	0,09	1,00		
<i>A. lundii carli</i>	0,05	0,00	0,62	0,13	0,15	1,00	
<i>A. heyeri</i>	0,00	0,00	0,21	0,30	0,10	0,23	1,00

No dendograma obtido através da análise de agrupamento, evidencia-se, claramente, a diferenciação das

sete espécies analisadas e a dissimilaridade de *A. ambiguus* em relação às demais (Figura 5).

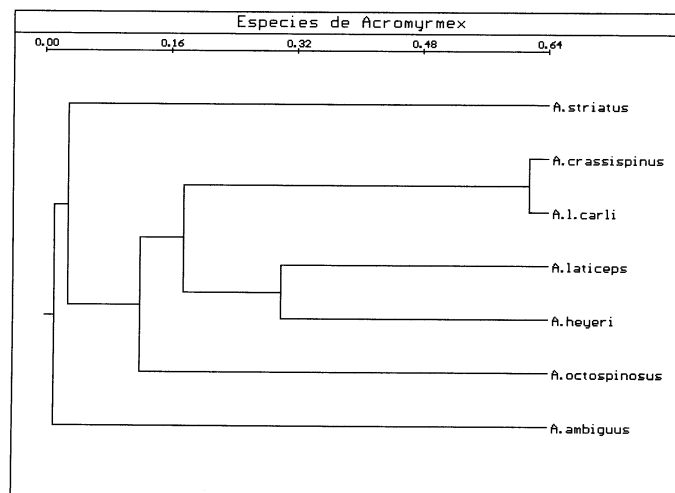


Figura 5. Dendograma de sete espécies de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex*, obtido através do coeficiente de Jaccard e UPGMA.

As espécies foram classificadas em dois grupos, sendo um constituído apenas por *A. ambiguus* e o outro pelas demais, dividido em dois subgrupos, sendo o primeiro composto apenas por *A. striatus* e o outro por *A. crassispinus*, *A. lundii carli*, *A. laticeps*, *A. heyeri* e *A. octospinosus*.

A possibilidade de caracterizar espécies de formigas, através da predominância de locos monomórficos, com base na análise de isoenzimas, foi relatada por ROSS *et al.* (1987), estudando formas monogínicas e poligínicas de *Solenopsis invicta*, e as espécies *S. richteri* e *S. geminata*. Nos últimos anos, outras técnicas têm sido utilizadas com o objetivo de distinguir espécies de diferentes insetos, como RAPD, que permitiu a diferenciação de seis espécies de *Quadraspidiotus* (FREY e FREY, 1995), de *Naupactus leucoloma* (*Graphognatus leucoloma*), *N. peregrinus* (*G. peregrinus*) e *N. tucumanensis* (HARDWICK *et al.*, 1997) e de espécies do gênero *Orius* (GOZLAN, 1997).

As duas técnicas empregadas apresentam vantagens e limitações. Os marcadores RAPD, apesar de permitirem a detecção de uma grande quantidade de polimorfismo de segmentos de DNA, fornecem baixo conteúdo de informação por loco, não permitindo a discriminação de genótipos heterozigotos. A técnica de isoenzimas permite a análise rápida e simultânea de vários locos, embora em número limitado, mas exige certos cuidados, como a disponibilidade de formigas vivas ou congeladas para análise. Entretanto, pela eficiência comprovada neste trabalho, e pelo baixo custo, rapidez e facilidade de execução, é indicada a sua utilização para a identificação de espécies de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex*.

CONCLUSÃO

A análise isoenzimática de insetos adultos pode ser empregada para a identificação de espécies de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Ema Gladis Schultz Correa, do Laboratório de Eletroforese da Embrapa Clima Temperado, pela contribuição para a realização deste trabalho, ao Eng^o Agr^o Oscar Ramón Bendek pelo auxílio na coleta do material e ao CNPq pelo aporte financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AYALA, F.J.; POWELL, J.R.; TRACEY, M.L.; MOURÃO, C.A.; PÉREZ-SALAS, S. Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. IV.

Genic variation in natural populations of *Drosophila willistoni*. **Genetics**, Madison, v.70, p.113-139, 1972.

COLARES, M.C.S. **Contribuição ao estudo do cariótipo de formigas cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* e análise preliminar de três sistemas enzimáticos**. Pelotas: UFPEL, 80p., 1994. (tese Mestrado)

DIEHL-FLEIG, E.; CAVALLI-MOLINA, S.; ARAÚJO, A.M. de. Polimorfismo isoenzimático em *Acromyrmex heyeri* e *A. striatus* (Hym.-Form.). In: ENCONTRO DE GENETICISTAS DO RIO GRANDE DO SUL, 8., 1992, São Leopoldo, RS. **Anais**. São Leopoldo, RS: UNISINOS, 1992. p.86.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995. 220p.

FREY, J.E.; FREY, B. Molecular identification of six species of scale insects (*Quadraspidiotus* sp.) by RAPD-PCR: assessing the field-specificity of pheromone traps. **Molecular Ecology**, Oxford, v.4, n.6, p.777-780, 1995.

GOZLAN, S.; MILLOT, P.; ROUSSET, A.; FOURNIER, D. Test of the RAPD-PCR method to evaluate the efficacy of augmentative control with *Orius* (Het., Anthocoridae). **Entomophaga**, Paris, v.42, n.4, p.593-604, 1997.

GUSMÃO, L.G. **Distribuição geográfica de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae) na zona sul do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil**. Pelotas: UFPEL, 46 p., 1996. Dissertação (Mestrado) - Fitossanidade.

HARDWICK, ARMSTRONG, K.F.; WRATTEN, S.D.; PRESTIDGE, R.A.; D'CALLAGHAN, M. Genetic comparison of whitefringed weevil species and populations by RAPD-PCR. NEW ZEALAND PLANT PROTECTION CONFERENCE, 5., 1997, Canterbury, NZ. **Proceedings**. Canterbury, NZ: Lincoln University, 1997. P. 327-332.

HARRY, M.; ROBIN, S.; LACHAISE, D. Use of polymorphic genetic markers (RAPDs) in evolutionary and applied entomology. **Annales de la Société Entomologique de France, Paris**, v.34, n.1, p.9-32, 1998.

JURUENA, L.F. & CACHAPUZ, L.M.M. Espécies de formigas cortadeiras ocorrentes no Estado do Rio Grande do Sul. **IPAGRO Informa, Porto Alegre**, v.23, p. 18-24, 1980.

PAMILO, P.; VEPSALAINENE, K.; ROSENGREN, R. Low allozymic variability in *Formica* ants. **Heredity**, Edimburgh, v.80, p.293-295, 1975.

ROHLF, F.J. NTSYS - pc. **Numerical Taxonomy and Multivariati analyz System**. Version 1.50. New York: Exeter Publishing, Ltda, 1989. 191 p.

ROSS, K.; VARGO, E.L.; FLETCHER, D.J.C. Comparative biochemical genetics of three fire ant species in North America with special reference to the two social forms of *Solenopsis invicta* (Him.-Form.) **Evolution**, Lancaster, v.41, p.979-990, 1987.

SCANDALIOS, J. G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants. A Review. **Biochemical Genetics**, New York, v. 3, p. 37-79. 1969.

SHIELDS, C.R.; ORTON, T.J.; STUBER, C.W. An outline of general resource needs and procedures for the electrophoretic separation of active enzymes from plant tissue. In: TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J. (eds.). **Isozymes in plant genetics and breeding**. Part. A. Amsterdam: Elsevier, 1983. p. 443-468.

VALLEJOS, C.E. Enzyme activity staining. In: TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J. **Isozymes in plant genetics and breeding. Part A**. Amsterdam: Elsevier, 1983. p.469-515.