

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DE FORMICIDAE DE SERAPILHEIRA: elaboração de um banco de dados

Débora Yumi Kayano¹; Alexandre Wagner Silva Hilsdorf²; Maria Santana de Castro Morini³

¹Estudante do Curso de Ciências Biológicas; e-mail: yumi.debora@hotmail.com¹

²Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: wagner@umc.br²

³Professora da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: morini@umc.br³

Área do Conhecimento: Biologia Molecular

Palavras-chave: DNA *Barcode*; morfoespécies; clonagem em bactérias; formigas

INTRODUÇÃO

As formigas possuem alta diversidade e ocorrem em quase todos os habitats. A maioria das espécies constitui a macro e mesofauna edáfica e da serapilheira; porém algumas espécies vivem exclusivamente na vegetação (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990). Devido à diversidade do grupo, a identificação usando somente a morfologia muitas vezes não é suficiente para caracterizar a espécie. O uso da técnica de DNA *Barcode* é uma ferramenta eficaz neste processo e pode auxiliar os estudos taxonômicos (SCHEFFER *et al.*, 2006).

OBJETIVOS

O trabalho teve como objetivo geral a identificação molecular de morfoespécies de formigas de serapilheira visando à elaboração de um banco de dados. Especificamente a técnica de DNA *Barcode* foi aplicada aos gêneros *Nylanderia*, *Crematogaster*, *Procryptocerus*, *Pheidole* e *Myrmelachista* registrados em galhos dispersos na serapilheira.

MÉTODO

As coletas dos ninhos foram realizadas em Mata Atlântica preservada e em parques urbanos com fragmentos de Mata Atlântica nos municípios de Bertioga, Igaratá, Itaquaquecetuba, Mogi das Cruzes, São Paulo e Suzano. Os ninhos foram armazenados em *freezer* -20 °C e as operárias conservadas em etanol 90%. Cada formiga foi analisada individualmente em microtubos de 1,5µL; os exemplares foram homogeneizados em solução tamponada (250 mM de Tris, pH 7.5; 2 M de NaCl; 100 mM EDTA; 2.5 EDTA; 100 mL de água ultrapura) e proteinase K a 55°C por 30 minutos, seguido da adição de RNase e incubação a 37°C por 10 minutos; as proteínas e restos celulares foram precipitados com solução NaCl 5M.

A precipitação do DNA foi realizada com álcool isopropílico 100% em seguida por álcool etílico gelado a 70%. Sendo o DNA ressuscitado em 20µL de água ultrapura; para a reação de polimerização em cadeia do gene mitocondrial citocromo oxidase I foram utilizados os *primers forward* LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') e *reverse* – HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3'), a reação foi conduzida em um volume final de 50ul contendo DNA molde, Tampão PCR, MgCl₂, dNTP's, *primers* e Taq

DNA polimerase. Os ciclos térmicos utilizados foram os descritos por Hebert *et al.* (2003) e NG'ENDO *et al.* (2013). A confirmação da amplificação do fragmento foi realizada em gel de agarose 1%. A purificação foi feita com EXOSAP ou com *Illustra* GFX PCR DNA, da GE *Healthcare* e sequenciados no Centro de Estudos do Genoma Humano – USP. Os dados foram analisados no *software BioEdit Sequence Alignment Editor* e Mega 4.0. Foi utilizado o *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) para a comparação das sequências. Foram enviadas à empresa Genomic – Engenharia Molecular uma amostra de *Crematogaster* pr. sp.1 e uma de *Nylanderia* sp.2 para a clonagem em bactérias. O *software* DnaSP 5.0 foi utilizado para analisar a semelhança intraespecífica do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I no gênero *Myrmelachista*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstram que o DNA estava degradado para a maioria das amostras pertencentes às morfoespécies. Uma das alternativas foi usar mais de uma operária para a extração do DNA. Amostras mantidas ao ar livre tem seu DNA degradado facilmente em pouco tempo, ao contrário das mantidas em álcool etílico absoluto a -20°C (OLIVEIRA *et al.*, 2002). Talvez seja esse o motivo da baixa concentração de DNA das amostras. Provavelmente a degradação do DNA ocorreu durante o manuseio, pois apesar dos galhos oriundos das coletas terem sido armazenados em *freezer* -20°C, o processo de retirada das colônias foi feito à temperatura ambiente.

As sequências obtidas foram comparadas com as depositadas *GenBank*, mas observou-se que elas estavam contaminadas e o grau de similaridade foi inferior a 97%; o que é baixo para caracterizar uma espécie (RUBINOFF, 2006). Somente *Pheidole* gr. *flavens* apresentou 98% de similaridade com sequência de *Pheidole* sp. JHB02 depositada no *GeneBank*. Diante deste resultado foi realizada a clonagem em bactérias de amostras de *Crematogaster* pr. sp.1 e *Nylanderia* sp.2, pois esta técnica permite a replicação apenas do fragmento de DNA desejado (KLUG *et al.*, 2010).

A técnica de clonagem se mostrou eficaz uma vez que a sequência obtida não apresentou contaminação e os picos estavam mais definidos, possibilitando maior precisão na identificação molecular. As amostras clonadas de *Crematogaster* pr. sp.1 e *Nylanderia* sp.2 apresentaram sequência de alta qualidade. Entretanto, a similaridade no *GenBank* para *Crematogaster* pr sp.1 foi baixa, pois não há depósito de sequência da mesma espécie. Para *Nylanderia* sp.2 os resultados foram mais promissores, pois a sequência obtida é 98% semelhante à *Nylanderia* cf. *pubens* (Tabela 1).

A análise no DnaSP (Tabela 2) mostra que todos os ninhos de *Myrmelachista arthuri* possuem o mesmo haplótipo do gene COI, devido à similaridade das sequências. Assim, é possível vislumbrar três cenários em conjunto ou em situações separadas, levando em conta que o *mtDNA* é de herança materna: I) ninhos únicos oriundos de mesma linhagem mitocondrial; II) ninho polidômico, ou seja são utilizados vários locais para a construção do ninho (WILD, 2007); III) colônia poliginica com fêmeas de mesma origem mitocondrial, ninhos poliginicos são constituídos de mais de uma rainha (KRIEGER, 2005). A presença de ninhos polidômicos para o gênero é relatada na literatura, o que reforça os resultados obtidos.

CONCLUSÕES

Este trabalho possibilitou a montagem de um banco de dados molecular usando a técnica do DNA *Barcode*, porém, com algumas ressalvas relacionadas à baixa qualidade do DNA e ao não depósito de sequências no *GeneBank*. Além disso, é possível concluir que, provavelmente, *M. arthuri* é polidômica.

Tabela 1 – Resultados da clonagem em bactérias e a comparação com o sequenciamento de amostras de formigas coletadas em galhos.

| | Coordenadas | Morfoespécie | Tamanho da sequência em pares de base (pb) | Espécie/Morfoespécie/similaridade (GenBank) | Dados de Coleta (GenBank) |
|-------------|--------------------------|--------------------------------|--|--|---|
| Sequenciado | S 23°29'36", O 46°31'11" | <i>Crematogaster</i> pr. sp. 1 | 519(consenso) | <i>Crematogaster</i> sp.MAS001 86% | Costa Rica: Guanacaste, Area de Conservacion Guanacaste, Sector Santa Rosa, Area Administrativa |
| Clonado | S 23°29'36", O 46°31'11" | <i>Crematogaster</i> pr. sp. 1 | 681(consenso) | <i>Crematogaster</i> sp.MAS001 87% | |
| Sequenciado | S 23°30'42", O 46°11'50" | <i>Nylanderia</i> sp.2 | 529(consenso) | <i>Nylanderia</i> sp. DMR01/ <i>Nylanderia</i> cf. <i>pubens</i> 93% | Não relatado |
| Clonado | S 23°30'42", O 46°11'50" | <i>Nylanderia</i> sp.2 | 702 (consenso) | <i>Nylanderia</i> cf. <i>pubens</i> 98% | Não relatado |

Tabela 2- Análise de doze amostras de *Myrmelachista* no programa DnaSP.

| Análise | Total |
|---|-------|
| Número de sequências utilizadas | 12 |
| Região selecionada | 1-568 |
| Número total de sítios (excluindo gaps, e dados em falta) | 478 |
| Sítios invariáveis (monomórficos) | 478 |
| Sítios variáveis (polimórficos) | 0 |
| Número de haplótipos | 1 |
| Diversidade haplotípica | 0 |
| Diversidade nucleotídica | 0 |

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

HEBERT, P. D.N.; BURNS, J.M.; JANZEN, D.H.; HALLWACHS, W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. **National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, no. 41, p. 1812-817. 2004. Disponível em: <http://bioinfo.esalq.usp.br/tecnicas_moleculares/papers_importantes/hebert%20etal2004_10species.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2015.

KLUG, S. W.; CUMMINGS, R. M.; SPENCER, A. C.; PALLADINO, A. M. **Conceitos de Genética**. 9 ed Porto Alegre: Artmed, 2010.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The ants**. Harvard University Press, 1990.

KRIEGER, M.J. To b or not to b: A pheromone-binding protein regulates colony social organization in fire ants. **Bioessays**, v. 27, n. 1, p. 91-99, 2005.

OLIVEIRA, C.M.; FUNGARO, M.H.P; CAMARGO, L.E.A.; LOPES, J.R.S. Análise comparativa da estabilidade do DNA de *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) sob diferentes métodos de preservação para uso em RAPDPCR. **Neotropical Entomology**. v. 31, n. 2, p. 225-231, 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/ne/v31n2/a08v31n2>> Acesso em: 01 mai. 2015.

NG'ENDO, R.N.; OSIEMO, Z.B.; BRANDL, R. DNA barcodes for species identification in the hyperdiverse ant genus *Pheidole* (Formicidae: Myrmicinae). **Journal of Insect Science**, v. 13, n. 1, p. 27, 2013.

RUBINOFF, D. Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation. **Conservation Biology**, v. 20, n. 4, p. 1026-1033, 2006. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1523-1739.2006.00372.x/epdf>> Acesso em: 28 jan. 2016

SCHEFFER, S.J.; LEWIS, M.L.; JOSHI, R.C. DNA Barcoding applied to invasive Leafminers (Diptera: Agromyzidae) in the Philippines. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 99, n. 2, p. 204-210, 2006.

WILD, A.L. **Taxonomic revision of the ant genus *Linepithema* (Hymenoptera: Formicidae)**. Los Angeles: University of California, 2007.

AGRADECIMENTOS

AO DOUTORANDO RODRIGO FERNANDO DE SOUZA (LAMAT) PELO AUXÍLIO LABORATORIAL.