

DIVERSIDADE GENÉTICA DO GÊNERO NEOTROPICAL *Myrmelachista* ROGER 1863 (FORMICIDAE: FORMICINAE) ATRAVÉS DE MARCADORES MOLECULARES PCR-RAPD

Márcia Akemi Nakano¹; Maria Santina de Castro Morini²; Vitor Fernandes Oliveira de Miranda³

Estudante do Curso de Biologia; e-mail: mar_nakano@hotmail.com¹
Professora da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: morini@umc.br²
Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: vmiranda@umc.br³

Área do Conhecimento: Genética/Taxonomia

Palavras-chaves: *Random Amplified Polymorphic DNA*; *Myrmelachistini*

INTRODUÇÃO

Myrmelachista é o único gênero da tribo *Myrmelachistini*, um táxon pouco conhecido de formigas da região neotropical. Forrageiam sobre árvores, nidificam no interior de troncos vivos e alimentam-se de nectários extraflorais. As operárias demonstram atividade herbívora, expelindo ácido fórmico nas nervuras de folhas de plantas, exceto nas mirmecófitas hospedeiras, sugerindo uma complexa associação de mutualismo. Existem somente artigos de descrição para a maioria das espécies, com ausência quase que total de estudos adicionais. Atualmente existe apenas uma revisão que inclui 14 espécies de *Myrmelachista* da fauna costarriquenha baseada em caracteres morfológicos, mas ainda há discussão sobre a taxonomia dessas formigas. Uma ferramenta útil para esse tipo de estudo são os marcadores moleculares (RFLP, PCR-RAPD, microssatélites e AFLP) para análise fenética, divergência genética, identificação do genótipo, entre outros. A técnica PCR-RAPD mensura e caracteriza a diversidade genética intraespecífica, ademais é utilizada com sucesso para verificar as relações genéticas entre espécies do mesmo gênero.

OBJETIVOS

Utilizar a técnica molecular PCR-RAPD para análise fenética de 6 espécies de *Myrmelachista*: *M. pr. catharinae*, *M. pr. bettinae*, *M. sp.3*, *M. pr. ruszkii*, *M. sp.5* e *M. pr. skwarrae* para verificar os padrões de dissimilaridade genética intra-específica e interespecífica.

METODOLOGIA

Operárias de *Myrmelachista* coletadas na Serra do Itapeti, Município de Mogi das Cruzes, SP (S 23°31'22''; O 46°11'16'') e identificadas por comparação com a coleção do Laboratório de Mirmecologia da Universidade de Mogi das Cruzes, foram utilizadas isoladamente para extração. Testaram-se três protocolos de extração de DNA: Taggart *et al.* (1992) em duas versões de purificação (fenol/clorofórmio e NaCl a 5M); Sambrook *et al.* (1989); e Martins (não-publicado). A integridade das amostras foi observada em gel de agarose (0,8%) e a quantificação e pureza do DNA foram mensuradas em espectrofotômetro *Nanodrop V3.1.0*. O *kit* para amplificação foi o *Promega Go Taq® Flexi DNA Polymerase*. Utilizaram-se 7 iniciadores aleatórios do *Kit Operon Technologies* (OPA e OPB), os mesmos testados por Matta (2007) e experimentaram-se diversos parâmetros das reações de amplificação genômica. As

reações foram realizadas em termociclador (*PTC 200-MJ*) e as bandas foram visualizadas em gel de agarose a 1,8% em cuba de eletroforese horizontal Gibco® Sunrise 96 por 3 horas e meia a 120V. O DNA amplificado foi visualizado com brometo de etídio presente no tampão TBE 1X (Tris-HCl; EDTA; ácido bórico pH 8,3) e fotografado sob luz UV com a câmera digital Kodak DC40. Dos iniciadores testados, foram escolhidos aqueles que resultaram bandas conspícuas para identificação de polimorfismos inter e intra-populacionais. A partir das bandas polimórficas evidenciadas em gel de agarose, foi construída uma matriz binária baseada na presença (estado 1) ou ausência (estado 0) de banda usando o aplicativo NDE. A diversidade genética inter e intra-populacional foi obtida através da matriz de distância utilizando o *software* PAUP* versão 4b10. Agruparam-se os terminais pelo método UPGMA. A consistência dos agrupamentos foi realizada por análises de *bootstrap* utilizando também o aplicativo PAUP com aplicação de 2.000 réplicas com adição aleatória. O fenograma foi desenhado graficamente através do programa *Tree View* Win 32 versão 1.6.6.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O protocolo Taggart *et al.* (1992) foi inadequado, pois se obteve baixas concentrações de DNA de *Myrmelachista*. Entretanto, as amostras mostraram também baixa concentração de polissacarídeos ou proteínas. O uso de fenol/clorofórmio foi útil para amostras com NaCl, possível inibidor nas reações de PCR. Os protocolos de Martins (não-publicado) e Sambrook *et al.* (1989) foram adequados, e utilizam metodologia semelhante quanto à incubação e uso do isopropanol, porém recomenda-se o último protocolo em vista da quantidade de DNA obtida e rapidez. Neste, o tampão difere por empregar sacarose a 0,1M e pH 9. Na quantificação do melhor protocolo foi obtida a média de 37,62 ng/μL de DNA, valor suficiente para aproximadamente 20 reações (25μL) com o emprego de protocolos usuais. As reações de PCR-RAPD foram otimizadas num volume final de 20 μL [4 μL de tampão, 2 μL de iniciador (2 pmol/μL), 2 μL de DNTP (2,5 mM), 1,5 μL de MgCl₂ (25mM) e 0,13 μL de Taq DNA polimerase (5 U)], completando-se mais 9,37 μL de H₂O Milli-Q autoclavada. O programa de temperatura para a reação foi descrito por Matta (2007). Dos iniciadores empregados, 42% resultaram fragmentos aleatórios. Geraram-se 34 bandas polimórficas conspícuas que foram utilizadas na análise. O número de fragmentos de DNA por iniciador variou de 1 a 11 com uma média de 5,39 bandas (DP= 2,37; Mediana= 5), e o tamanho de 500 a 2.072 pb. O menor valor da diversidade genética (dissimilaridade) intra-específica foi encontrado em *M. sp.3* (6,86%) pelo fato desta população em especial ter sido coletada e mantida em laboratório, com tendência a se tornar mais homogênea comparada ao ambiente natural de maior fluxo gênico. O valor mais elevado de diferenciação genética intrapopulacional foi de 14%, podendo indicar subpopulações mais estruturadas. A diversidade genética entre as espécies variou com o menor valor de 12% para *M. pr. skwarrae* e *M. sp.5*, seguido de 21% para *M. sp.2* e *M. pr. catharinae*. Já os maiores valores foram observados entre as espécies *M. sp.3* e *M. sp.5* com 76% de dissimilaridade. O valor é seguido de 64% para *M. pr. skwarrae* e *M. pr. catharinae*, com a mesma percentagem para *M. pr. skwarrae* e *M. pr. bettinae*. O dendrograma pelo método UPGMA (figura 1) separou as populações em três grupos: (1) *M. pr. catharinae*, *M. pr. bettinae* e *M. pr. ruszkii*, (2) *M. sp.3* e (3) *M. pr. skwarrae* e *M. sp.5*.

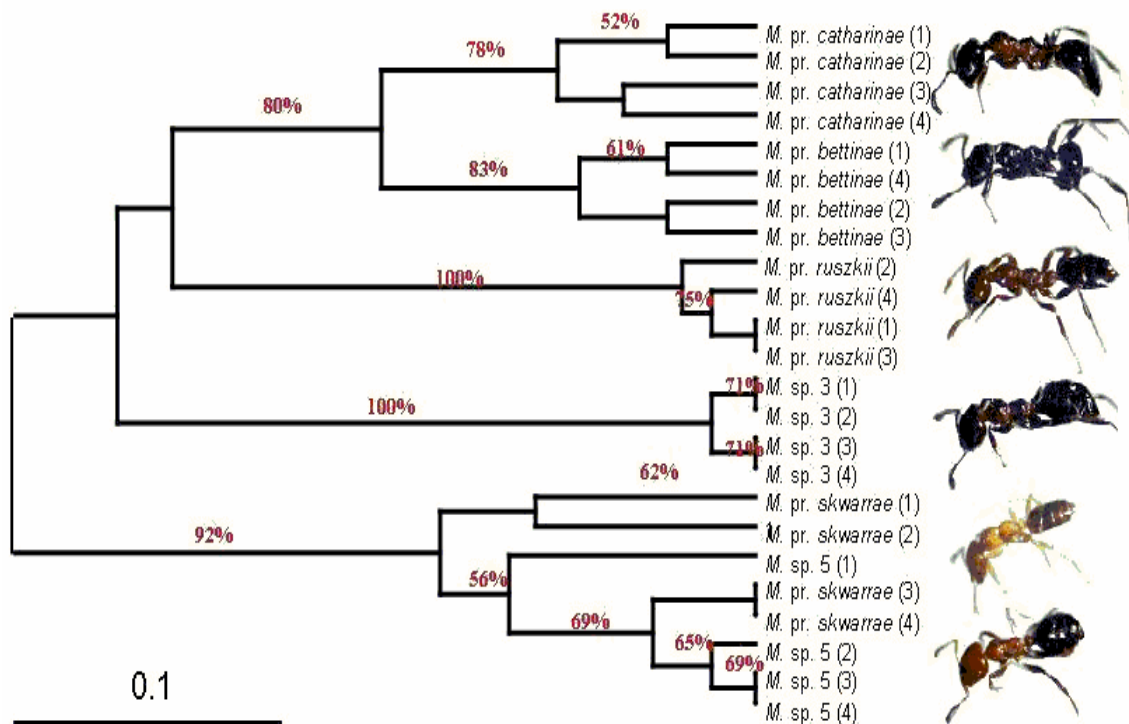


Figura 1: Dendrograma pelo método UPGMA baseado em dados da PCR-RAPD de amostras de DNA de 6 espécies de *Myrmelachista*. Nos ramos estão dispostos os suportes por *bootstrap* (>50%). Foto da autora.

O agrupamento corrobora Godoi (2007) que realizou um trabalho de filogenia das mesmas espécies de *Myrmelachista* deste estudo, porém usando dados morfológicos. Os valores de *bootstrap* elevados suportam os ramos das populações em distintas espécies. O grupo 1 uniu as espécies que segundo Godoi (*op. cit.*) possui características morfológicas semelhantes e agrupou as espécies *M. pr. skwarrae* e *M. sp.5* numa politomia. Entretanto, S. S. Suguituru (com. pess.) distinguiu morfológicamente as espécies *M. sp.5* e *M. pr. skwarrae* pelo tamanho da cabeça e o corpo alargado da primeira. A tribo Myrmelachistini, a qual pertence o gênero *Myrmelachista*, contém operárias principalmente monomórficas; entretanto, com os dados obtidos por PCR-RAPD há forte suporte (*bootstrap* de 92%) de que *M. pr. skwarrae* e *M. sp.5* sejam a mesma espécie de uma colônia polimórfica, isto é, com diferenças de tamanho nas operárias, com pouca diferenciação genética, mas com características fenotípicas significativas. Isso é consistente pelo fato de as duas espécies terem sido agrupadas num único ramo.

CONCLUSÕES

Na extração de DNA, o melhor protocolo quanto à menor concentração de contaminantes e esforço de bancada foi o de Sambrook *et al.* (1989), na qual a extração de um indivíduo é suficiente para 20 reações de PCR-RAPD (25 μ L). A técnica se mostrou útil ao estabelecer a diversidade e relação genética dentre e entre as espécies de *Myrmelachista*. Os resultados obtidos no presente estudo não distinguem *M. pr. skwarrae* de *M. sp.5* sugerindo que ambas tratam-se da mesma espécie de uma colônia polimórfica. No futuro, a utilização de mais caracteres moleculares e morfológicos somados a dados moleculares de outras técnicas (*e.g.*, baseados em seqüenciamento de

DNA e microssatélites), assim como a inclusão de mais espécies de *Myrmelachista* poderão trazer luz às relações genéticas deste gênero Neotropical tão pouco estudado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GODOI, M. V. S.; MORINI, M. S. C.; MIRANDA, V. F. O. Biologia de forrageamento e análise filogenética baseada em morfologia de algumas espécies de *Myrmelachista* (Formicidae: Formicinae). In: **X CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UMC**, 2007, Mogi das Cruzes, p. 41.

MARTINS, V. G. (não publicado). **Protocolo de extração de DNA com TNES (Tris, NaCl, EDTA e SDS)**. Centro de Estudos de Insetos Sociais, UNESP, Rio Claro, SP.

MATTA, S. L. S. F. Caracterização genética de populações de *Camponotus rufipes* (Hymenoptera: Formicidae) do Parque Ecológico do Tietê – SP por marcadores moleculares RAPD In: **X CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UMC**, 2007, Mogi das Cruzes, p. 43.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning. A Laboratory Manual**. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

TAGGART, J. B.; HYNES, R. A.; PRODOHL, P. A & FERGUSSON, A. A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. **Journal of Fish Biology**, n. 40, p. 963-965, 1992.