

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DE SOLENOPSIS SP. DO DOMÍNIO ATLÂNTICO

Débora Yumi Kayano¹; Rodrigo Fernando de Souza²; Maria Santana de Castro Morini³

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

Estudante do curso de doutorado em Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes
e-mail: souza_bio@yahoo.com.br²

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

Área do Conhecimento: Biologia Molecular

Palavras-chave: Espécies crípticas; DNA “Barcode”; PCR; Citocromo Oxidase I

INTRODUÇÃO

O gênero de formiga *Solenopsis*, conhecido no Brasil como formiga-lava-pés ou simplesmente lava-pés; e em outros países como “fire ant” possui cerca de 300 espécies das quais 108 ocorrem no Novo Mundo. Muitas espécies possuem morfologia semelhante e apresentam variações intraespecíficas, e até mesmo dentro da própria colônia, o que dificulta a identificação. Outro problema é a falta de descrição de espécies crípticas (PITTS *et al.*, 2005; VINSON, 1994). Neste caso, a ferramenta molecular DNA “Barcode”, que é uma região do citocromo c oxidase 1 (COI) (HEBERT *et al.*, 2003), permite que a identificação de muitas destas espécies possa ser realizada.

OBJETIVOS

O trabalho teve como objetivo geral a identificação molecular de formigas do gênero *Solenopsis*, visando dar embasamento taxonômico a projetos que têm sido realizados na região. Especificamente a identificação foi realizada usando operárias registradas em ninhos encontrados em galhos dispersos na serapilheira, por meio de DNA “Barcode”. Além disso, foram analisados os haplótipos de *mtDNA* nas espécies.

MÉTODO

As coletas de ninhos foram realizadas em Mata Atlântica preservada e em parques urbanos com fragmentos de Mata Atlântica, nos municípios de Bertiooga, Igaratá, Itaquaquecetuba, Mogi das Cruzes, São Paulo e Suzano. Os ninhos foram armazenados em *freezer* -20 °C e as operárias posteriormente conservadas em etanol 90%. Utilizou-se para a extração total do DNA: 200µL de tampão (250 mM de Tris, pH 7,5; 2 M de NaCl; 100 mM EDTA; 2,5 EDTA; 100 ml de água ultrapura), maceração das amostras, adicionado 1,5µL de proteinase K a 20mg/ml e incubado em termobloco a 55°C por 30 minutos, acrescido 1µL de RNase 10mg/ml, incubado no termobloco a 37°C por dez minutos. Adicionou-se 50µL de cloreto de sódio 5M e os tubos foram centrifugados por cinco minutos a 12000 r.p.m. O sobrenadante foi transferido para o segundo microtubo contendo 200µL isopropanol 100%. Os tubos foram invertidos cautelosamente e centrifugados por 5 minutos a 12000 r.p.m. e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados, 200µL de etanol 70% e centrifugados por cinco minutos a 12000 r.p.m. e o sobrenadante foi descartado, a diluição do DNA foi feita em 20 a 30µL de água ultrapura. Para a PCR foram utilizados os *primers* universais para insetos: LepF1 (5’ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG 3’) e LepR1 (5’TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA 3’) ou LepF1 e LepR2

(CTTATATTATTTATTCGTGGGAAAGC) (HEBERT *et al.*, 2004), os reagentes utilizados para 50µL de volume final, contendo DNA molde, Tampão PCR, MgCl₂, dNTP's, primers e Taq DNA polimerase. O ciclo térmico para estas combinações consistiu de um ciclo de 1 minuto a 94 °C, de seis ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto e 30 segundos a 45 °C, e 1 minuto e 15 segundos a 72 °C, seguido de 36 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto e 30 segundos a 51 °C, e 1 minuto e 15 segundos a 72 °C, com um passo final de 5 minutos a 72 °C. A purificação foi feita com EXOSAP ou com o *Illustra GFX PCR DNA e Gel Band Purification Kit*, da GE Healthcare. Sequenciados no Centro de Estudos do Genoma Humano – USP. Os dados foram analisados no *software BioEdit Sequence Alignment Editor*. Foram usados o *The Barcode of Life Data System (BOLD)* e o *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)* para a comparação das sequências.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sequências foram analisadas, mas para a maioria isso não foi possível devido à qualidade do DNA ou a presença de resíduos; o que gerou sobreposição de bases e picos não definidos. As sequências que permitiram dar prosseguimento ao trabalho resultaram os dados que constam na Tabela 1. Estes resultados permitem inferir as seguintes hipóteses em relação às morfoespécies analisadas: (1) elas existem em outros países, porém no Brasil não foram catalogadas; (2) elas existem apenas em outros países, porém foram transportadas até o Brasil acidentalmente (ou vice-versa), assim como ocorreu com as *Solenopsis* presentes nos EUA; e (3) as sequências são geneticamente próximas, mas, um melhor sequenciamento é necessário para essa afirmação. Em relação à amostra que é próxima ao gênero *Pheidole* (Tabela 1), pode ser erro durante a triagem do material; estas espécies podem ser confundidas durante a separação do material.

CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos foram comparadas somente as morfoespécies de *Solenopsis* deste trabalho com as morfoespécies que estão depositadas nos bancos de dados moleculares (BOLD e GenBank). Assim, devido à falta de informações e à baixa qualidade das sequências obtidas não foi possível chegar a conclusão sobre o epíteto específico das morfoespécies analisadas. Uma das sugestões é modificar o processo de manuseio das amostras durante o trabalho de triagem das formigas para manter a integridade do material genético.

Tabela 1. Localidade da coleta e coordenadas, morfoespécie identificada de acordo com o Museu de Zoologia da USP, tamanho da sequência obtida, espécie ou morfoespécie obtida juntamente com a porcentagem de similaridade de acordo com o BOLD Systems e BLAST e dados fornecidos dos mesmos em relação às áreas de coleta da espécie depositada. Em negrito os possíveis haplótipos *mtDNA*.

Parque	Coordenadas	Morfoespécie	Tamanho da sequência em pares de base (pb)	Espécie/Morfoespécie/ similaridade (BOLD)	Dados de Coleta (BOLD)	Espécie/ Morfoespécie/ similaridade (BLAST)	Dados de Coleta (BLAST)
--------	-------------	--------------	--	---	------------------------	---	-------------------------

Parque Centenário	S 23°30'33", O 46°10'23"	sp.2	406	Morfoespécie sp. 6YB (JT-sp 1) 92,45%	Informações não disponíveis	Morfoespécie <i>Solenopsis</i> sp. TD01 93%	Equador, Podocarpus National Park em Zamora-Chinchipe
Parque Max Feffer	S 23°32'01", O 46°19'39"	sp.2	400	Morfoespécie sp. 6YB (JT-sp 1) 92,75%	Informações não disponíveis	Morfoespécie <i>Solenopsis</i> sp. TD01 93%	Equador, Podocarpus National Park em Zamora-Chinchipe
Parque das Neblinas	S 23°44'51", O 46°08'39"	sp.2	616	Morfoespécie <i>Solenopsis</i> sp. 1YB (LASH-4) 88,19%	Informações não disponíveis	Morfoespécie <i>Solenopsis</i> sp. 1YB (LASH-4) 88%	Panamá, Colón, Barro Colorado National Monument
Parque das Neblinas	S 23°44'51", O 46°08'39"	sp.2	582	Morfoespécie <i>Solenopsis</i> sp. 1YB (LASH-4) 88,4%	Informações não disponíveis	Morfoespécie <i>Solenopsis</i> sp. 1YB (LASH-4) 87%	Panamá, Colón, Barro Colorado National Monument
Parque Natural Municipal Francisco Afonso de Melo	S 23°31'22", O 46°11'16"	sp.2	565	<i>Pheidole cf. synarmata</i> 97,86%	Brasil, Reserva Natural Rio Cahoeira	<i>Pheidole cf. synarmata</i> 98%	Brasil, Reserva Natural Rio Cahoeira
Parque Natural Municipal Francisco Afonso de Melo	S 23°31'22", O 46°11'16"	sp.8	216	<i>Scrobipalpa atriplicella</i> 57,58% (Lepidoptera)	Informações não disponíveis	Morfoespécie <i>Solenopsis</i> sp. TD01 90% e Morfoespécie <i>Solenopsis</i> sp. MAS001 90%	Ecuador: Zamora Chinchipe, Podocarpus National Park/ Costa Rica em Cacao - Cerro Pedrega

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

HERBERT, P. D.N.; RATNASINGHAM, S.; WAARD, J. R. de. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *The Royal Society*, v. 270, p. 96-99, 2003.

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 *Astrartes fulgerator*. *National Academy of Sciences of the United States of America*, v.101, p.1812-817, 2004.

PITTS, J.P.; HUGH, M.C.J.; ROSS, K.G. Cladistic analysis of the fire ants of the *Solenopsis saevissima* species-group (Hymenoptera: Formicidae). *Zoologica Scripta*, v.34, p.493-505, 2005.

VINSON, S.B. Impact of the invasion of *Solenopsis invicta* (Buren) on native food webs. In: Williams, D.F. *Exotic Ants: Biology, Impact, and Control of Introduced Species*. Boulder: Western Press, p.241-258, 1994.