

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO GENE *Gp-9* EM FORMIGAS DO GÊNERO *Solenopsis*

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

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

Doutorando da Universidade de Mogi das Cruzes e-mail: souza_bio@yahoo.com.br²

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

Área do Conhecimento: Biologia Molecular

Palavras-chave: DNA; haplótipos; monoginia; poliginia.

INTRODUÇÃO

Formigas do gênero *Solenopsis* apresentam fenótipos e comportamento social associados a diferentes genótipos no locus do gene *Gp-9* (*General protein-9*) (ROSS, 1997). Este gene, possivelmente, está relacionado ao acúmulo de corpo gorduroso em rainhas jovens; e possui dois alelos, *B* e *b*. Colônias monogínicas são homozigotas *Gp-9^{BB}* e as jovens rainhas copulam com machos *Gp-9^B*, resultando no genótipo *Gp-9^{BB}* em sua prole. Na condição poliginica, o genótipo será heterozigoto *Gp-9^{Bb}* e as rainhas copulam com machos com genótipo *Gp-9^B* e *Gp-9^b*, o que resulta em uma prole com três genótipos diferentes: *Gp-9^{BB}*, *Gp-9^{Bb}* e *Gp-9^{bb}*. As rainhas *Gp-9^{Bb}* e machos *Gp-9^b* são aceitos como reprodutores, mas as rainhas *Gp-9^{BB}*, assim como os machos *Gp-9^B*, são executados. A homozigose *Gp-9^{bb}* é letal em ninhos poliginicos, pois suas fêmeas não conseguem acumular energia suficiente (KRIEGER, 2005; SHOEMAKER; ROSS, 1996). A caracterização dos alelos do gene *Gp-9* é frequente em regiões onde *Solenopsis* foi introduzida, uma vez que apresentam uma ameaça a economia, ao equilíbrio ecológico e a saúde do ser humano. Entretanto na América do Sul, e no Brasil, a caracterização deste gene foi escassamente realizada, o que prejudica o entendimento do comportamento competitivo que é observado em ninhos poliginicos (ROSS, 2001; KRIEGER, 2005; SOUZA *et al.*, 2016).

OBJETIVOS

O trabalho teve como objetivo geral utilizar a ferramenta DNA *Barcode* para identificar as espécies de *Solenopsis*, realizar a caracterização molecular dos alelos do gene *Gp-9* e comparar com alelos encontrados em outras regiões do mundo. Especificamente inferir a frequência e verificar a predominância da condição social nas espécies; sequenciar os alelos do gene *Gp-9* (*Gp-9^B* ou *Gp-9^b*) e comparar com sequências depositadas no *GenBank*.

METODOLOGIA

As coletas dos ninhos foram realizadas em áreas urbanas dos municípios de Biritiba Mirim, Salesópolis e Mogi das Cruzes, nas cidades foram selecionados cinco pontos amostrais onde foram coletados dois ninhos dentro de cada ponto, de acordo com o método descrito por Banks *et al.* (1981). As formigas foram armazenadas em freezer -20°C e em etanol 90%; para a extração de DNA foi utilizado o protocolo adaptado de Martins (2010). Para a reação de polimerização em cadeia do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I foram utilizados os *primers*, *foward* CIJ (5' TTGATTTTTTGGTCATCCAGAAGT 3') e *reverse* DDS (5'

TAAGATGGTTAATGAAGAGTAG 3') e o ciclo térmico descritos por Ahrens, Ross e Shoemaker (2005). Na análise da monoginia e poliginia por meio de enzima de restrição foram utilizados os *primers foward Gp9-pre3* (5'-CAAATTATTGACGTTTTTGTCTTTC-3') e *reverse Gp9-pre4* (5'-AAGGAGCAAGCTTTTGTAC-3'), o ciclo de temperatura foi realizado acordo com OAKEY *et al.* (2011). Foi utilizado 1µL da enzima de restrição BsaA1, juntamente com 2µL de 1× *buffer*, 10µL de produto de PCR e 18µL de água ultrapura. A mistura foi incubada a 30°C *overnight* de acordo com o protocolo fornecido pelo provedor e o produto da digestão foi observado em gel de agarose a 4% e em gel de poliacrilamida 10%; em outro método utilizado para a detecção da monoginia e poliginia, foram feitas extrações com 5 indivíduos de cada ninho e o DNA ressuspendido em 50 µL de água ultrapura. Foram utilizados 2 conjuntos de *primers*: para o alelo *Gp-9^B*: *foward* 26BS (5' CTCGCCGATTCTAACGAAGGA 3') e *reverse* 16BAS (5' ATGTATACTTTAAAGCATTCTAATATTTTGTGTC 3'), os iniciadores específicos para *Gp-9^b* foram: *foward* 24bS (5' TGGAGCTGATTATGATGAAGAGAAAATA 3') e *reverse* 25bAS: (5' GCTGTTTTTAATTGCATTTCTTATGCAG 3'). O ciclo de temperatura foi adaptado do artigo de Valles e Porter (2003), o padrão de bandas foi verificado em gel de agarose a 2%.; Foi utilizado o *primer foward Gp9-pre3* (OAKEY *et al.*, 2011) e o *primer reverse* 16BAS (VALLES; PORTER, 2003) para a o sequenciamento de uma porção de 935pb do gene *Gp-9*, o ciclo térmico consiste em 94°C por 2min e 35 ciclos de 94°C por 30 seg., 55°C por 30seg., 68°C por 1 min. e extensão final de 72°C por 5 min.; Para todos os conjuntos de *primers* as reações foram conduzidas em um volume final de 50ul contendo DNA molde, Tampão PCR, MgCl₂, dNTP's, primers e Taq DNA polimerase; Para as amostras destinadas ao sequenciamento, a purificação foi feita com EXOSAP e sequenciados no Centro de Estudos do Genoma Humano – USP; Os dados foram analisados no *software BioEdit Sequence Alignment Editor*. Foi utilizado o *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) para a comparação das sequências.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas extrações foram obtidas concentrações satisfatórias de DNA. A PCR do gene COI gerou um *amplicon* entorno de 920pb. Comparando as sequências com as do banco de dados *GenBank*, obteve-se similaridade superior a 98%; este valor confirma a espécie identificada (RUBINOFF, 2006). Assim, foram identificadas 3 espécies que forrageiam no ambiente urbano, sendo *S. macdonaghi*, com 3 ninhos; *S. saevissima*, com 13 ninhos; e *S. invicta*, com 14 ninhos. Os três ninhos de *S. macdonaghi* possuem operárias com o haplótipo MAC1. Em *S. saevissima* 12 ninhos possuem operárias com o haplótipo W51 e apenas um ninho apresenta o haplótipo W51/73. Este resultado indica que, provavelmente, está ocorrendo mutações pontuais que impedem sua definição (MULLANEY *et al.*, 2010). Em *S. invicta*, 11 ninhos possuem formigas com haplótipo mitocondrial H41 e 3 apresentam os mesmos índices de *score* e porcentagem de 99% de similaridade para dois diferentes haplótipos H47/H40. Novamente os resultados indicam que, provavelmente, deve estar ocorrendo mutações pontuais que promove a semelhança com ambos os alelos. A análise de distância p das sequências de *mtDNA* mostrou uma variação de resultados entre 0,03 a 0,06, sendo a média 0,03. Esse resultado indica que as linhagens mitocondriais encontradas nos centros urbanos de Mogi das Cruzes, Biritiba-Mirim e Salesópolis variam em média 3%. Ao utilizar o método de OAKEY *et al.* (2011) não foi possível distinguir com precisão as colônias poliginicas e monoginicas, devido aos padrões de bandas diferentes das descritas pelo autor. Possivelmente os alelos presentes nas amostras possuem mutações que alteram a posição dos sítios em que a

enzima de restrição atua (REGITANO; COUTINHO, 2001). Utilizando os *primers* de Valles e Porter (2003) foi constatado que todas as colônias são monogínicas. Na América do Sul, onde estas espécies são nativas, é mais frequente a ocorrência de ninhos monogínicos. Nos países (*e.g.* Estados Unidos) onde o gênero foi introduzido, as colônias poligínicas predominam, segundo MESCHER *et al.* (2003). Com o sequenciamento do gene, em um ninho de *S. macdonaghi* foi possível identificar dois alelos: “*Solenopsis macdonaghi* isolate Pi-80 putative odorant binding protein gene, partial cds” (sequência: EU220054.1) e “*Solenopsis macdonaghi* isolate Pu-37 putative odorant binding protein gene, complete cds” (sequência: EU220055.1), ambos com 100% de similaridade. Nos demais ninhos de *S. macdonaghi*, *S. invicta* e *S. saevissima* não foi possível identificar os alelos, pois a sobreposição das bases dos diferentes alelos não permitiu a identificação. Possivelmente isto é decorrente devido aos polimorfismos do gene e a presença de *indels* em alguns alelos (MULLANEY *et al.*, 2010). Os alelos do gene *Gp-9* encontrados no Brasil para as espécies *S. saevissima*, *S. macdonaghi* e *S. invicta* foram editados e alinhados para a análise de distância nucleotídica. A variabilidade encontrada entre as três espécies é baixa, sendo os valores entre 0,01 e 0,02, com média de 0,01. Esse resultado mostra que em média as sequências variam 1% e que por conta de sua importância fisiológica o gene não suporta grandes variações entre as espécies (KRIEGER, 2005). Algumas apresentam mutações pontuais nos alelos analisados que são facilmente identificados, o que não inviabilizaria a determinação destes alelos em um cromatograma de sequenciamento. Pode-se dizer que a falta de resolução dos alelos de *S. invicta* e *S. saevissima* demonstra a ocorrência de alelos não identificados em estudos anteriores, e sua identificação aumentaria ainda mais a variabilidade conhecida deste gene. As sobreposições de bases obtidas mostram que, outras técnicas moleculares devem ser utilizadas para separar e identificar os alelos das espécies *S. invicta* e *S. saevissima* e, assim, identificar corretamente os alelos do gene *Gp-9* desta região.

CONCLUSÕES

Por meio da técnica DNA *Barcode* foi constatada a presença de três espécies de *Solenopsis*: *S. invicta*, *S. macdonaghi* e *S. saevissima*, sendo todos os ninhos coletados monogínicos. Em um ninho de *S. macdonaghi* foi possível identificar 2 alelos, nos demais não foi possível distinguir devido as sobreposições de bases geradas por polimorfismos dos alelos. Este problema deverá ser sanado com a clonagem em bactérias competentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHRENS, M. E.; ROSS, K. G.; SHOEMAKER, D. D. Phylogeographic structure of the fire ant *Solenopsis invicta* in its native south American range: roles of the natural barriers and habitat connectivity. **Evolution**, v. 59, p. 1733-1743, 2005.

BANKS, W. A., LOFGREN C. S.; JOUVENAZ, D. P.; STRINGER, C. E.; BISHOP, P. M.; WILLIAMS, D. F.; WOJCIK, D. P.; GLANCEY, B. M. Techniques for collecting, rearing and handling imported fire ants. USDA. Scientific and Educational Administrative Advances in Agricultural Technology, AAT-S-21, 1981.

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.

MULLANEY, J. M.; MILLS, R. E.; PITTARD, W. S.; DEVINE, S. E. Small insertions and deletions (INDELs) in human genomes. **Human molecular genetics**, v. 19, n. R2, p. R131-R136, 2010.

OAKEY, J.; HARRIS, E.; PEASE, B.; JENNINGS, C.; MCCUBBIN, K. Differentiation of *Solenopsis invicta* social forms using high resolution melt PCR. **Bulletin of entomological research**, v. 101, n. 05, p. 581-589, 2011.

REGITANO, L.C. de A.; COUTINHO, L.L. **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001.

ROSS, K. G. Molecular ecology of social behaviour: analyses of breeding systems and genetic structure. **Molecular Ecology**, v. 10, n. 2, p. 265-284, 2001.

SHOEMAKER, D. D.; ROSS, K. G. Effects of social organization on gene flow in the fire ant *Solenopsis invicta*. **Nature**, v. 383, n. 6601, p. 613-616, 1996.

SOUZA, R. F.; COCCHI, F. K.; MARTINS, C.; MORINI, M. S. C.; BUENO, O. C. Characterization of allele diversity in a microsatellite locus: a registry for *Solenopsis invicta*. **Advances in Entomology**, v. 4, n. 01, p. 32, 2016.

VALLES, S. M.; PORTER, S. D. Identification of polygyne and monogyne fire ant colonies (*Solenopsis invicta*) by multiplex PCR of Gp-9 alleles. **Insectes Sociaux**, v. 50, n. 2, p. 199-200, 2003.

AGRADECIMENTOS

À UMC PELA BOLSA CONCEDIDA, À MINHA ORIENTADORA PROF.^a MARIA SANTINA DE CASTRO MORINI E MEU CO-ORIENTADOR RODRIGO FERNANDO DE SOUZA PELA OPORTUNIDADE E AUXÍLIO, AO PROF.^o ALEXANDRE WAGNER SILVA HILSDORF PELO ESPAÇO E EQUIPAMENTOS CEDIDOS PARA A REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS, AOS INTEGRANTES DO LAMAT (LABORATÓRIO DE MIRMECOLOGIA DO ALTO TIETÊ) E DO LAGOAA (LABORATÓRIO DE GENÉTICA DE ORGANISMOS AQUÁTICOS E AQUICULTURA) PELO COMPANHEIRISMO E APOIO TÉCNICO.