

## OCORRÊNCIA E CONDIÇÃO SOCIAL DE ESPÉCIES DE *Solenopsis* spp. EM FRAGMENTOS DE MATA ATLÂNTICA

Juliana Maria Conceição Alves<sup>1</sup>; Rodrigo Fernando de Souza<sup>2</sup>; Maria Santina de Castro Morini<sup>3</sup>

1. Estudante do Curso de Ciências Biológicas; e-mail: juliana.maconves@gmail.com
2. Doutorando do Programa em Biotecnologia; e-mail: souza\_bio@yahoo.com.br
3. Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: morini@umc.br

Área de Conhecimento: **Zoologia Aplicada e Biologia Molecular.**

**Palavras-chave:** Barcode; dispersão; diversidade; riqueza; agressividade.

### INTRODUÇÃO

As formigas fazem parte da família *Formicidae*, sendo todas as espécies eussociais. São insetos ricos, abundantes e dominantes na maioria dos ambientes terrestres, fundamentais no fluxo de energia e biomassa dos ecossistemas terrestres e na estrutura das comunidades de invertebrados (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990). O gênero *Solenopsis* (também conhecidas como “formigas lava-pés”) é constituído por 195 espécies e 22 subespécies e pertence à família *Myrmicinae*. As espécies de *Solenopsis* são encontradas na América do Sul e, atualmente, nos Estados Unidos, Oeste das Índias, Nova Zelândia, Porto Rico, Austrália, Hong Kong e China. A nidificação ocorre em áreas abertas e ensolaradas, o que favorece a termorregulação da colônia (MARTINS, 2010). Em *Solenopsis* são encontradas colônias monogínicas e poligínicas. Operárias de colônias poligínicas são mais agressivas e competitivas (LOFGREN *et al.*, 1975). A condição social é expressa por um gene específico, o *Gp-9*, que em homozigose dominante, *Gp-9<sup>BB</sup>*, determina a monoginia. Quando o genótipo é encontrado em heterozigose, *Gp-9<sup>Bb</sup>*, a poliginia. A forma homozigota recessiva, *Gp-9<sup>bb</sup>*, é letal (SHOEMAKER e ASCUNCE, 2010). A identificação morfológica das espécies de *Solenopsis* é complexa, e ferramentas moleculares como COI, *Gp-9* e *mtDNA* podem auxiliar a taxonomia do gênero.

### OBJETIVOS

Verificar a ocorrência de espécies e a condição social de colônias do gênero *Solenopsis*, usando ferramentas moleculares. Especificamente foram caracterizadas as espécies por meio da técnica “DNA Barcode”, analisadas a frequência dos haplótipos de *mtDNA*, a condição social por meio da PCR *Multiplex* e a amplificação parcial do gene *GP-9* para distinção de alelos.

### MÉTODO

Foi analisada uma operária de cada colônia (28 colônias no total) de *Solenopsis*, coletada na borda de três fragmentos de mata, localizados nos municípios de Mogi das Cruzes, Biritiba-Mirim e Salesópolis. As formigas foram mantidas em etanol a 70%, em “freezer” a -20°C para evitar a degradação do DNA. A identificação das espécies foi feita por meio da amplificação do Citocromo Oxidase I (COI) e DNA mitocondrial (*mtDNA*) (HEBERT *et al.*, 2003a; HEBERT *et al.*, 2003b;). A extração de DNA foi de acordo com o protocolo adaptado de Martins (2010) e o produto amplificado foi purificado, sequenciado e comparado

com amostras depositadas no “GenBank”. A PCR contou com a utilização de *primers* específicos (CIJ e DDS), gerando fragmentos com cerca de 920 pares de base. Em caso de não amplificação, utilizou-se um *primer* substituto para o DDS, denominado Jerry Garcia, gerando fragmentos de 780 pares de base, incluindo apenas a porção do gene Citocromo Oxidase I (COI). Nesta parte da pesquisa foram utilizados kits de amplificação. O produto da reação foi submetido a um programa de amplificação no termociclador e confirmação da amplificação em gel de agarose 1%. A purificação das amostras foi feita com a enzima EXOSAP. As PCRs que não possuíam quantidade mínima foram purificadas com o Kit Illustra GFX PCR DNA e Gel Band Purification Kit, da GE Healthcare® e enviadas ao Instituto Biológico para sequenciamento. A identificação da condição social foi por amplificação parcial do gene *Gp-9*. Para a PCR da condição social, foram utilizados os *primers* específicos para o alelo *Gp-9<sup>B</sup>*: 26BS e 16BAS e iniciadores para *Gp-9<sup>b</sup>* 24bS e reverse 25bAS. O ciclo de temperatura foi adaptado de Valles e Porter (2003). O produto de PCR foi observado em gel de agarose a 2%. Para a PCR de sequenciamento, foram utilizados *primers* específicos (*Gp-9-pre3* e 16BAS), com utilização do kit de amplificação Master Mix (Invitrogen® Platinum SuperFi PCR Master Mix) e submetido a amplificação no termociclador e posterior visualização em gel de agarose 1,5%. A clonagem foi feita após a amplificação do fragmento, utilizando o Kit CloneJet PCR Cloning®, seguindo protocolo do fabricante. A reação foi submetida antes da transformação bacteriana a um processo de diálise e eletroporação. Para a transformação bacteriana, utilizou-se as células competentes de *Escherichia coli* (linhagem 10β) e a reação foi submetida ao processo de miniprep, seguindo protocolo adaptado fornecido pela equipe do Instituto Biológico. Posteriormente será realizado o sequenciamento parcial do gene *Gp-9*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

*Solenopsis saevissima*, com haplótipos mitocondriais W51 e W51/W73, foi predominante nos três fragmentos de mata. Em cada fragmento foi possível identificar haplótipos diferentes, dessa forma, as colônias coletadas em Biritiba-Mirim e Salesópolis possuem operárias com a maior e menor diversidade haplotípica, respectivamente. O haplótipo 1 foi o mais frequente nas colônias em todos os fragmentos de mata. Além disso, esteve presente em um maior número de colônias (Tabela 1).

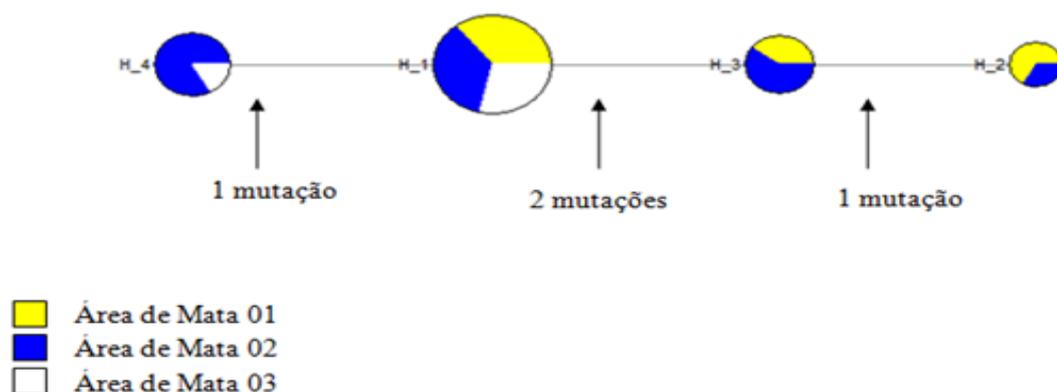
**Tabela 1:** Distinção dos haplótipos e números de colônias em cada fragmento de mata.

Áreas	Haplótipos	Quantidade de Colônias
Mogi das Cruzes	H1	5
	H2	2
	H3	2
Biritiba-Mirim	H1	5
	H2	1
	H3	3
	H4	1
Salesópolis	H1	4
	H4	5

Os haplótipos exibem um baixo número de mutações (Figura 1) e isto pode indicar que as variantes de mtDNA pertencem a um grupo regional geneticamente próximos (ROSS *et al.*, 2010). A alta frequência de determinados haplótipos em diferentes locais pode ser decorrente

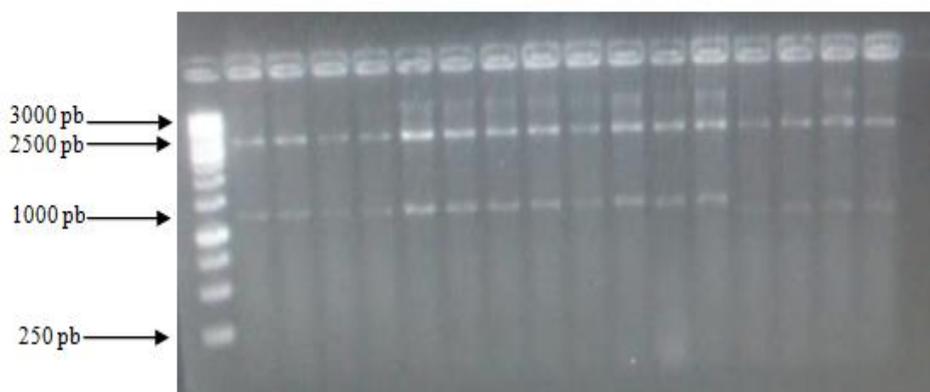
de transporte mediado por seres humanos (ASCUNCE *et al.*, 2011), uma vez que são conectados por estradas e rodovias.

**Figura 1:** Rede de haplótipos e mutações em *Solenopsis saevissima* de acordo com as áreas de coleta.



A diversidade haplotípica ( $h=0,66$ ) e nucleotídica ( $\pi= 0,00170$ ) para a espécie *S. saevissima* foram inferiores as relatadas por Ross *et al.* (2010), cujo valor é ( $h=0,99$ ). Esses valores podem evidenciar um efeito gargalo com expansão de poucos haplótipos separados por baixo número de mutações, ocasionado, por exemplo, pela fragmentação do habitat natural (GRANT e BOWEN, 1998). Na condição social das colônias predomina a forma monogínica. O processo de clonagem foi bem sucedido, gerando dois fragmentos, sendo o primeiro (inserto) medindo aproximadamente 1000pb e o segundo (vetor), 2500pb (Figura 2).

**Figura 2:** Resultado dos fragmentos de DNA gerados pela digestão do pJET1.2/blunt Cloning Vector com a enzima *Bgl1 II*. As setas representam o tamanho do fragmento de DNA gerado.



## CONCLUSÕES

Os resultados mostram a predominância da espécie *Solenopsis saevissima* nos três fragmentos de mata, sendo todas as colônias monogínicas. Na análise da variabilidade de haplótipos, ficou demonstrada a diversidade das colônias registradas em cada fragmento de mata. As colônias coletadas em Biritiba-Mirim apresentaram a maior diversidade haplotípica,

enquanto que as de Salesópolis possuem apenas dois haplótipos. O haplótipo 1 foi o mais frequente, estando presente em colônias de todos os fragmentos de mata. O processo de clonagem atingiu plenamente o objetivo, pois, gerou o tamanho de fragmento de DNA esperado, tanto para o inserto (1000pb), quanto para o vetor (2500pb). A próxima etapa será o sequenciamento parcial do gene *Gp-9*.

## REFERÊNCIAS

ASCUNCE, S. Marina; YANG, Chih C.; OAKLEY, Jane; SHOEMAKER, DeWayne. Global invasion history of the fire ant *Solenopsis invicta*. **Science**, v.331, p.1066-1068, 2011.

GRANT, Stuart W.; BOWEN, Brian W. Shallow Population Histories in Deep Evolutionary Lineages of Marine Fishes: Insights for Sardines and Anchovies and Lessons for Conservation. **Journal of Heredity**, v.89, p.415-426, 1998.

HEBERT, Paul D. N. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences**, v.270, p.313-321, 2003a.

HEBERT, Paul D. N. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences**, v.270, p.S596-S599, 2003b.

HÖLLDOBLER, Bert; WILSON, Edward O. **The ants**. Cambridge, Belknap/Harvard University Press. 732p. 1990.

LOFGREN, Clifford S.; BANKS, William A.; GLANCEY, Michael. Biology and control of imported fire ants. **Annual Reviews**, v. 20, p.1-30, 1975.

MARTINS, Cíntia. **Análises moleculares das formigas lava-pés (*Solenopsis* spp.) (Hymenoptera: Formicidae) e da presença da endobactéria *Wolbachia***. 2010. 86 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2010.

ROSS, Kenneth G.; GOTZEK, Dietrich.; ASCUNCE, Marina S.; SHOEMAKER, DeWayne. Species delimitation: a case study in a problematic ant taxon. **Systematic Biology**, v. 59(2), p. 162-184, 2010.

SHOEMAKER, DeWayne.; ASCUNCE, Marina S. A new method for distinguishing colony social forms of the fire ant, *Solenopsis invicta*. **Journal of Insect Science**, v.10, p.1-11, 2010.

VALLES, Steven M.; PORTER, Sanford 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.