

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

ANÁLISE DO POLIMORFISMO DE COMPRIMENTO DE FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO DE REGIÕES DO mtDNA DE *Dinoponera quadriceps* Santschi COM VISTAS A ESTUDOS DE VARIABILIDADE POPULACIONAL

Geane Almeida de Oliveira¹; Cândida Maria Lima Aguiar² e Eddy José Francisco de Oliveira³

1. Bolsista PROBIC/UEFS, Graduanda em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: geanealmeida.bio@gmail.com
2. Orientadora, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: candida.aguiar@gmail.com
3. Co-orientador, Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: eddyfo@rge.fmrp.usp.br

PALAVRAS-CHAVE: Variabilidade genética, *Dinoponera quadriceps*, DNAm.

INTRODUÇÃO

Os ecossistemas naturais vem sofrendo atualmente um grande impacto causado pela degradação e fragmentação das suas áreas. A Caatinga é um dos mais impactados pelo aumento da população humana e utilização de suas áreas para a agricultura e pecuária. Como conseqüências temos a redução da biodiversidade e perda do seu componente genético.

As formigas constituem um grupo de organismos onde a maioria das espécies é sensível às variações ambientais (Majer 1983) e, em ecossistemas onde ocorrem processos acelerados de degradação, muitas espécies estão ameaçadas de extinção, como a espécie *Dinoponera lucida*. *Dinoponera* pertence à Formicidae, subfamília Ponerinae. Este gênero é constituído por seis espécies com distribuição geográfica restrita ao continente Sul-Americano (Kempf, 1971; Paiva & Brandão, 1995). *Dinoponera quadriceps* está distribuída exclusivamente no Nordeste brasileiro e, como as outras espécies do gênero, não apresenta diferenciação morfológica de castas e tem baixa capacidade de dispersão e de colonização em novas áreas.

Estudos de variabilidade genética populacional trariam importantes informações sobre a estrutura genética das populações dessa espécie que contribuiriam para o seu manejo e conservação. Os marcadores moleculares vem sendo amplamente utilizados nestes e em outros estudos relacionados à ecologia, evolução e taxonomia de espécies. Dentre os marcadores, o Polimorfismo de Comprimento dos Fragmentos de Restrição (RFLP) é um dos mais utilizados para estudos populacionais (Matioli, 2001).

Esse é o primeiro estudo que visa verificar a variabilidade populacional dessa espécie que por apresentar características como baixa capacidade de voo e dispersão e pouca habilidade de colonização em novas áreas (Overall, 1980; Paiva & Brandão, 1995) é possível que as populações de diferentes regiões apresentem variabilidade genética de baixa à média, resultado do baixo fluxo gênico entre populações.

O presente trabalho analisou a variabilidade genética de populações naturais de *D. quadriceps*, distribuídas na região do semiárido baiano, buscando obter informações acerca do nível de fluxo gênico e do grau de diferenciação genética.

MATERIAL E MÉTODOS

As coletas foram realizadas nos municípios de Serra do Ramalho, Pilão Arcado, Feira de Santana, Baixa Grande, Banzaê e Senhor do Bonfim, localizados no estado da Bahia. Em cada uma das localidades foram coletadas amostras de *D. quadriceps* procedentes de três colônias. O DNA total foi extraído do tórax de 18 indivíduos utilizando o protocolo fenol-clorofórmio modificado de Azeredo-Espin *et al.*, (1991).

Após a extração, os genes mitocondriais Citocromo Oxidase I/ II, COI e 16S foram submetidos à amplificação. As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 25 μ l e a amplificação dos fragmentos de DNA foi feita usando as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C (5 min), seguida de 35 ciclos (94°C por 1 min, 44°C por 1 min e 20 seg e 72°C por 1 min) e terminando com a extensão final a 72°C por 20 min. Para as reações de digestão enzimática foram utilizadas as enzimas DraI, SspI, e Hae III. No entanto, com o uso das enzimas de restrição, verificou-se, inicialmente, a deficiência deste método para se detectar a variabilidade genética da espécie estudada, uma vez que não houve corte dos fragmentos. Assim sendo, resolvemos utilizar a técnica de sequenciamento por esta permitir uma maior possibilidade na detecção de variação.

As reações de sequenciamento foram realizadas para a porção inicial do gene COI, compreendida entre os *primers* mtD7/mtD9, em algumas amostras de Feira de Santana, Senhor do Bonfim e Baixa Grande. Para a análise, o alinhamento das seqüências das populações foi realizado utilizando-se o método Clustal W 1.8 (Thompson *et al.*, 1994).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a região COI/COII, os protocolos utilizados permitiram a amplificação de todas as populações amostradas, demonstrando diferentes padrões entre as populações. O tamanho do fragmento para as populações de Feira de Santana, Pilão Arcado e Serra do Ramalho foi de aproximadamente 600 pb, tamanho semelhante ao encontrado para *D. lucida* (cerca de 603 pb) (Costa *et al.*, 2006). Por outro lado, para as populações de Baixa Grande, Banzaê e Senhor do Bonfim, o tamanho do fragmento foi de aproximadamente 800 pb (Figura 1). Visto que o DNAm_t é bastante conservado e, portanto, o tipo de diferenciação no padrão de amplificação é muito raro de acontecer, nos leva à hipótese de que essa diferença no tamanho do fragmento sejam repetições de A+T, denominada sequência Q, que têm cerca de 196 pb (Cornuet *et al.*, 1991), o que corresponde justamente à diferença aproximada entre os padrões de amplificação encontrados. Outra hipótese é que estas duas populações seriam espécies crípticas, ou seja, com grupos genéticos distintos que estão passando por processos de especiação resultante do isolamento reprodutivo (Futuyma, 1992). No entanto, com os dados obtidos com o sequenciamento de algumas populações, ainda não é possível confirmar qualquer uma das duas hipóteses.



Figura 1. Eletroforese em gel de agarose (2%) mostrando a amplificação diferenciada da região intergênica COI/COII do mtDNA de seis populações de *D. quadriceps*: Baixa Grande-BA, Senhor do Bonfim, Banzaê (600pb) (1,2,3, respectivamente). Feira de Santana, Serra do Ramalho, Pilão Arcado, (800pb) (4,5,6, respectivamente). M – marcador 100pb.

Para o gene COI, o tamanho do fragmento de 1600 pb e os fragmentos de 800 pb e 600 pb não apresentaram diferenciação evidente entre as populações, pelo menos quanto ao tamanho do fragmento amplificado.

A região 16S do DNAm_t apresentou um tamanho estimado em 800 pb para todas as populações amostradas. A ausência de diferenciação pode ser resultante da característica do próprio gene, que tende a ser mais conservado e, portanto, geralmente é utilizado em análises filogenéticas (Alberts *et al.*, 1994).

As enzimas utilizadas não apresentaram sítios ou a quantidade deles gerou dúvidas quanto ao padrão de bandas e, desta forma, os resultados não foram informativos. Então, foi utilizada a técnica de sequenciamento para o gene COI. O estudo populacional realizado por Assis (2010) com a abelha *Nannotrigona testaceicornis*, utilizando o mesmo fragmento do COI e a técnica PCR+RFLP, também não encontrou polimorfismo entre as populações, e o uso do sequenciamento como segunda opção para a análise, por outro lado, demonstrou variabilidade entre as populações da espécie estudada, revelando a sensibilidade desta técnica na detecção de polimorfismo.

A análise de cerca de 350 pb das sequências da porção inicial do gene COI, das populações de Feira de Santana, Baixa Grande e Senhor do Bonfim (Figura 2), demonstrou uma diferenciação quanto a composição de bases em determinados sítios das populações de Baixa Grande e Senhor do Bonfim em relação à amostra de Feira de Santana. Esta população diferiu das duas outras em pelo menos 8 sítios, enquanto Baixa Grande e Senhor do Bonfim tiveram apenas uma diferença de base (Tabela 1). Esse resultado confirmou a diferenciação observada com a amplificação do COI/COII, onde as populações de Baixa Grande e Senhor do Bonfim formaram um grupo distinto de Feira de Santana.

```

a.
AACCTTCTCAGGTTCAAGAACTGGATGAACCATATATCTCCATTATCTCTTTATAGTTTTTCATAGAAGATTTTCAATAGACTTAA
CAATTTTCTTTACATATAGCTGGAAATCTCTCAATTCCTAGAGCAATCAACTTATTCTACAATTTAAATATACACCATAAAA
TTTATCAATTGATAAAATTCCTTTATTAATTTGATCAATCTTAATTAACATAAATTTACTTTTACTATCTCTCCAGTTTTAGCGGAG
CTATTTACTATACITTTAAGAGATCGAAATTTAATACATCTTTTTTGTCCATCCGGAGGAGGGATCTATTCTATTTCAACATT
TATTTTGATTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTT

b.
AACCTTCTCAGGTTCAAGAACTGGATGAACCATATATCTCCATTATCTCTTTATAGTTTTTCATAGAAGATTTTCAATAGACTTGA
CAATTTTCTTTACATATAGCTGGAAATCTCTCAATTCCTAGAGCAATCAATTTATTCTACAATTTAAATATACACCATAAAA
TTTATCAATTGATAAAATTCCTTTATTAATTTGATCAATCTTAATTAACATAAATTTACTTTTACTATCTCTCCAGTTTTAGCGGAG
CTATTTACTATACITTTAAGAGATCGAAATTTAATACATCTTTTTTGTCCATCCGGAGGAGGGATCTATTCTATTTCAACATT
TATTTTGATTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTT

c.
AACCTTCTCAGGTTCAAGAACTGGATGAACCATATATCTCCATTATCTCTTTATAGTTTTTCATAGAAGATTTTCAATAGACTTGA
CAATTTTCTTTACATATAGCTGGAAATCTCTCAATTCCTAGAGCAATCAATTTATTCTACAATTTAAATATACACCATAAAA
TTTATCAATTGATAAAATTCCTTTATTAATTTGATCAATCTTAATTAACATAAATTTACTTTTACTATCTCTCCAGTTTTAGCGGAG
CTATTTACTATACITTTAAGAGATCGAAATTTAATACATCTTTTTTGTCCATCCGGAGGAGGGATCTATTCTATTTCAACATT
TATTTTGATTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTT

```

Figura 2. Sequências obtidas da porção inicial do Gene COI (compreendida entre os *primers* mtD7/mtD9), com aproximadamente 500pb cada uma. **a.** Amostra de Feira de Santana; **b.** Amostra de Baixa Grande. **c.** Amostra de Senhor do Bonfim.

Tabela 1. Sítios variáveis quanto à composição de bases nitrogenadas referentes ao fragmento de 350pb nas sequências da porção inicial do COI (mtD7) das três populações analisadas. FSA – Feira de Santana; BDE - Baixa grande; SBM – Senhor do Bonfim. Os números verticais localizados acima das bases indicam a posição delas.

		Sítios						
		1	1	1	1	1	2	3
8	1	0	3	5	6	8	9	6
1	8	5	6	8	9	5	7	7
FSA	C	T	A	A	T	C	C	G
BDE	T	A	G	G	C	T	T	.
SBM	T	A	G	G	C	T	T	T

Apesar das poucas sequências analisadas, com os dados obtidos do COI, já foi possível observar a diferenciação das populações, revelando o potencial deste gene para a detecção de polimorfismo. Vários estudos com formigas utilizaram as sequências do COI para investigar a variabilidade genética das populações (AZUMA et al., 2006; QUECK et al., 2007). Além disso, o COI vem sendo amplamente utilizado em DNA barcoding, tendo sido demonstrada a sua utilidade na caracterização de diversos grupos de organismos, como os insetos, e para a identificação de espécies (FOOTTIT et al., 2008).

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que tanto a amplificação do COI/COII quanto os resultados encontrados com o sequenciamento da porção inicial do COI, revelaram diferenciação entre as populações. Assim, estes resultados representam informações iniciais a respeito da variabilidade genética de *D. quadriceps*, e a ampliação das áreas de estudo, bem como de genes a serem analisados, podem ampliar o conhecimento a respeito da estrutura genética destas populações e auxiliar em processos futuros de elaboração de planos de manejo e conservação desta espécie endêmica.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B.; BRAY D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing. Inc., New York, 1994.
- ASSIS, A.F. Estudo populacional e molecular de *Nannotrigona testaceicornis* Cockerell (Hymenoptera, Apidae, meliponini) através do DNA mitocondrial. Tese de Mestrado: Ribeirão Preto – SP- 2010.
- AZUMA, N.; OGATA, K.; KIKUSH, T.; HIGASHI, S. Phylogeography of Asian Weaver ants *Oecophylla smaragdina* Ecol. Res. 21, 126-136, 2006.
- CORNUET, J. M.; GARNERY, L. & SOLIGNAC, M. Putative Origen and Function of the Intergenic Region Between COI and COII *Apis mellifera* L. Mitochondrial DNA. Genetics Society of America, 1991, p. 394-403.
- COSTA, M.A. et al. Padrões de diferenciação geográfica em populações de *Dinoponera lucida* Emery (formicidae: ponerinae) estimado por meio análises de PCR-RFLP. Resumos do 52º Congresso Brasileiro de Genética, pp.327, 2006.
- FOOTTIT, R. G.; MAW, H. E. L.; DOHLEN, C. D. VON; HEBERT, P. D. N. Species identification of aphids (Insecta: Hemiptera: Aphididae) through DNA barcodes. Molecular Ecology Resources 8, 1189–120, 2008
- FUTUYMA, D. Biologia evolutiva. 2. ed Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 631p
- KEMPF, W.W. A preliminary review of the ponerine ant genus *Dinoponera* Roger Hymenoptera: Formicidae. *Studia Entomologica*. 14: 369-394, 1971.
- MATIOLI, S. Biologia Molecular e Evolução. 2ª Edição; Ribeirão Preto-SP: Holos, 2001.
- MAJER, J. D. Ants: bio-Indicators of minesite rehabilitation, land-use, and land conservation. *Environment Management* 7(4): 375-383, 1983.

- MONNIN, T; PEETERS, C.. Monogyny and regulation of worker mating in the queenless ant *Dinoponera quadricaps*. *Animal Behavior* 55:299-306, 1998.
- OVERAL, W.L. Observations on colony founding and migration of *Dinoponera gigantea*. *Journal of Georgia Entomological Society*. 15: 467-469, 1980.
- QUEK, S.P; DAVIES, S.J.; ASHTON, O.S.; ITINO, T.; PIERCE, N.E. The geography of diversification in mutualistic ants: a genes-eye view into neogene history of Sundaland rain forest. *Mol. Ecol.*, 16, 2045-2062, 2007.
- PAIVA, R.V.S & C.R.F. BRANDÃO. Nests, worker population, and reproductive status of workers, in the giant queenless ponerine ant *Dinoponera Roger* (Hymenoptera: Formicidae). *Ethol. Ecol. Evol.* 7: 297-312, 1995.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS D. G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673-4680, 1994.