

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR COM DNA BARCODE DE FORMIGAS DO GÊNERO *Pheidole* Westwood 1840 (Hymenoptera: Formicidae)

Adonilson Alves de Menezes Neto¹; Eddy José Francisco de Oliveira²; Janete Jane Resende³

1. Bolsista PROBIC/UEFS, Graduando em Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: netomenezes_uefs@yahoo.com.br
2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: eddyfo@gmail.com
3. Mestre, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: antforjane@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: DNA Barcode, Formigas, *Pheidole*

INTRODUÇÃO

A biodiversidade pode ser definida em seu amplo sentido como a “variabilidade da vida” e envolve diferentes níveis desde genes até comunidades, em todas as escalas espaço-temporais (Savard *et al.*, 2000).

Em geral, os insetos são excelentes indicadores ambientais e, dentre estes, as formigas apresentam grande potencial, pois, entre outras características, apresentam grande diversidade correlacionada com a de outros componentes bióticos (Leal, 2005). As formigas estão entre os organismos mais conspícuos dos ecossistemas; além de sua abundância local relativamente alta, são especialmente ricas em espécies e diversificadas quanto aos hábitos de forrageamento, nidificação, alimentação (Holldobler & Wilson, 1990).

Pheidole é um gênero “hiperdiverso” de formigas que ocorre desde ambientes desérticos a florestas tropicais úmidas (Jeanne, 1979; Wilson, 1987; Moreau, 2008). Apresenta elevada riqueza, cerca 1500 morfoespécies compreendidas em 67 gêneros, onde 152 espécies de 47 gêneros diferentes são encontradas no Brasil, comprovando assim a mega-diversidade existente no país (Wilson, 2003), atrelada a essa “hiperdiversidade” está a dificuldade na identificação em nível de espécie pela taxonomia clássica, seguindo a morfologia, uma vez que o tamanho diminuto dos espécimes dificulta esse trabalho, gerando assim esse gênero “hiperdiverso”.

Tendo em vista a necessidade de um método alternativo à identificação morfológica das espécies foi desenvolvido o “Projeto do Código de Barras da Vida” (*The Barcode of Life Project* – Hebert *et al.*, 2003), uma iniciativa internacional que visa o desenvolvimento de um sistema universal para identificação de todos os seres eucarióticos baseado em uma abordagem molecular padronizada (Miller, 2007). O sistema de identificação por DNA *Barcoding* pretende identificar as espécies através da utilização de um pequeno segmento padronizado do DNA mitocondrial (Citocromo Oxidase I - *COI*). Esta abordagem representa uma estratégia extremamente promissora para o diagnóstico da biodiversidade.

Diversos trabalhos estão sendo feitos utilizando esse sistema, juntamente com o fragmento do gene *COI*, como em Szalanski (2010), que a partir do fragmento de DNA mitocondrial foi avaliada a variação genética de formigas. Ou em Smith (2007) onde o DNA *Barcode* é usado para reduzir e identificar as espécies crípticas, auxiliando desta forma a revisão taxonômica.

Visto todas as dificuldades para se compreender a hiperdiversidade encontrada neste gênero e os diversos trabalhos realizados com este no Laboratório de Entomologia (LENT), a realização do presente trabalho foi de grande importância para a definição de espécies destas formigas, além de auxiliar os futuros projetos realizados pelo Grupo de pesquisa.

Como objetivos do presente trabalho tem-se a necessidade de avaliar a aplicabilidade do DNA *Barcode* na identificação de espécies de formigas do gênero em questão e a definição da melhor região de iniciador (*primer*) do DNA *Barcode* de *Pheidole*. Para isso serão

analisadas as sequências do gene *COI* estimando seus níveis de variabilidade intra- e inter-específicas.

METODOLOGIA

Em laboratório procedemos com a extração do DNA total das amostras que estavam armazenadas a -20°C , usamos para tal o protocolo segundo Higuchi (1989) com algumas alterações. Para amplificação das regiões do DNA mitocondrial, foram selecionados os *primers*, LCO/HCO, LepR/LepF, MtD7/MtD9 (*primer* universal para DNA *Barcode*), entre outros, bem como o específico para o gênero *Pheidole* a partir da sequência depositada no NCBI (GenBank™) (Moreau, 2006), este último sendo o principal utilizado para o desenvolvimento do trabalho.

As reações de PCR foram realizadas em volume total de $25\mu\text{l}$ contendo $3\mu\text{l}$ de tampão Taq 10x com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; $1\mu\text{l}$ de dNTP mix $2,5\text{mM}$; $1\mu\text{l}$ MgCl_2 25mM ; $1\mu\text{l}$ de cada *primer* 20mM ; $0,3\mu\text{l}$ (1U) Taq DNA polimerase (LGC Biotecnologia); $16,7\mu\text{l}$ de água ultra-pura e $1\mu\text{l}$ de DNA total. A amplificação foi conduzida em termociclador (Biocycler® – MJ96G) usando o seguinte programa: um ciclo de desnaturação a 94°C com duração de 5 minutos, seguido de 35 ciclos de: desnaturação a 94°C por 1min, anelamento por 1min e 20 segundos a 42°C e elongação por 1 min a 72°C e um ciclo de extensão final a 72°C por 20 min.

Os fragmentos amplificados foram então submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com Blue-Green® (LGC Biotecnology) em substituição ao método de brometo de etídio ($25\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Sendo utilizado na corrida de eletroforese um marcador de peso molecular de 100 pares de base (pb) Ladder (GE Healthcare®). Assim sendo os fragmentos puderam ser visualizados em transluminador e posteriormente fotografados, para futuras consultas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No início do desenvolvimento do projeto havia um questionamento sobre qual método de extração seria adotado, todavia que o método já utilizado pelo laboratório (Sambrook et al, 2001), oferecia riscos de contaminação para o mesmo e principalmente aos pesquisadores, visto que para o sucesso da extração era usado um complexo químico de fenol-clorofórmio.

Com isso surgiu uma preocupação de se mudar o método para algo que fosse tão eficiente quanto e que oferecesse um menor risco de contaminação, partimos para a literatura e encontramos o método de Higuchi (1989). Este método usa os detergentes P40 e Tween como base para a extração acrescida da Proteinase-K. É importante ressaltar que esse método não nos concede uma amostra totalmente limpa do DNA, porém esse problema é resolvido quando o material extraído é passado por um filtro (coluna de afinidade) ou feita uma limpeza, com determinados reagentes, oferecendo desta forma a mesma qualidade que o outro método.

A partir desse protocolo foram realizadas seis extrações de DNA, totalizando 55 amostras extraídas. Das quais três extrações foram feitas utilizando outros gêneros de formigas, além do estudado, *Pheidole*, como *Brachymyrmex*, *Crematogaster*, *Tapinoma*, já as três últimas extrações, foram utilizadas exclusivamente espécimes do gênero em questão. Todas as amostras extraídas encontram-se devidamente identificadas e armazenadas no Laboratório de Entomologia Molecular (LENT-Mol).

Como previsto no projeto do referido trabalho, mandamos sintetizar um *primer* específico para o gênero *Pheidole*, Pheid-R/Pheid-F, utilizado no trabalho desenvolvido por Moreau (2006) e que obteve ótimos resultados com espécimes do gênero. Aproveitamos também para testar outros *primers* contém a mesma região do DNA em estudo, foram eles: LepR/LepF; DinoR/DinoF (desenhado pelos pesquisadores do Laboratório de Entomologia Molecular – UEFS); LCO/HCO. A escolha de utilizamos um *primer* para borboletas

(LepR/LepF) e para outro gênero de formigas (Dinoponera – DinoR/DinoF) foi para servir de guia para as amplificações, visto que obtivemos sucessos nas reações em quase todos os testes que realizamos.

Com estes *primers* fez-se 48 reações de PCR, e com as primeiras 18 reações não foram obtidos resultados. Com a chegada do específico e a realização de ajustes nos protocolos de amplificação, foram feitos às outras 30 reações e então, obtivemos amplificações da região do DNA em quase todas as reações, resultados estes que podem ser comprovados por meio do registro fotográfico disponível no LENT-Mol. Assim sendo, dos 30 morfotipos que se possui para o desenvolvimento do projeto, já se obteve a amplificação da região do DNA *Barcode* de 20 delas.

Durante a realização do referido projeto, encontramos algumas dificuldades, principalmente em conseguir estabelecer um protocolo padrão para as reações de amplificação (PCR), sendo necessário recorrer várias vezes à literatura para buscar novas soluções. Foi então que percebemos que o problema era oriundo da pouca quantidade de DNA usada nas reações, reparamos esse empecilho quando aumentamos a quantidade de material genético utilizada nas reações.

Assim sendo, é possível afirmar que a ferramenta de DNA *Barcode* apresenta um resultado satisfatório e potencial para a resolução do problema a cerca da “hiperdiversidade” do gênero em estudo.

REFERÊNCIAS

- HERBERT P.N.D. 2003a. Biological Identifications through DNA Barcodes. Proc. R. Soc. Lond. B 270: 313-321.
- HIGUCHI R. 1989. Simple and rapid preparation of samples for PCR. In *PCR technology* (ed. H.A. Erlich), pp. 31-38. Stockton Press.
- HÖLLDOBLER B. & WILSON E.O. 1990. The Ants. Massachussets, The Belknap Press of Harvard University Press, 732p.
- JEANNE R.L 1979. A latitudinal gradient in rates of ant predation. Ecology, 60:1211-1224.
- LEAL I.R. 2005. Formigas como indicadores de diversidade. In: Simpósio de Mirmecologia – Biodiversidade e Bioindicação, 27, Anais, Mato Grosso, CD-Rom.
- MILLER S.E. 2007. DNA barcoding and the Renaissance of taxonomy. Proceedings of the Natural Academy of Science of USA 104: 4775-4776.
- MOREAU C.S. 2006. Phylogeny of the Ants: Diversification in the Age of Angiosperms. Science, 312: 101.
- MOREAU C.S. 2008. Unraveling the evolutionary history of the hyperdiverse ant genus Pheidole (Hymenoptera: Formicidae). Molecular Phylogenetics and Evolution, 48: 224-239.
- SAMBROOK J., RUSSEL D.W. 2001. Molecular Cloning: A laboratory manual. 3 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- SAVARD J.L., CLERGEAU P. & MENNECHEZ G. 2000. Biodiversity concepts and urban ecosystems. *Landscape and Urban Planning*, 48, 131-142.
- SMITH A.M. 2007. The Ants of North America: A Flagship Taxon for CO1 DNA Barcoding. PNAS. 104: 4967-4972.
- SZALANKI A.L. 2010. Genetic Diversity of Ants (Hymenoptera: Formicidae) from the Ozark-St. Francis National Forest, Arkansas, USA. Sociobiology. v. 56, No 3.
- WILSON E.O. 1987. Causes of ecological success: the case os ants. Journal Animal Ecology, 56: 1-9.
- WILSON E.O. 2003. Pheidole in the New World: A Dominant, Hyperdiverse Ant Genus. Rev. Biol. Trop v.53 n.1-2