

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@uefs.br
3. Mestre, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: antforjane@gmail.com

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

INTRODUÇÃO

O gênero de formigas *Pheidole*, foi descrito por Wilson (2003) como um grupo “hiperdiverso”, tendo em vista o total de 1124 táxons válidos, elevando-o ao cargo de maior gênero de formigas (Longino 2009). No Novo mundo encontra-se 624 espécies dessa diversidade total e apoiado em evidências moleculares sua origem é creditada no Novo Mundo (Moreau 2008). Esta elevada riqueza também está presente no Brasil, já que 152 espécies deste gênero são encontradas aqui e dos 19 grupos de *Pheidole* reconhecidos por Wilson (2003) apenas quatro não estão presentes no Brasil, por serem exclusivamente Neárticos e Africanos. Dos outros 15 grupos, *tristis*, *diligens*, *fallax* e *flavens* são os que apresentam maior número de espécies, englobando cerca de 84% da mimercofauna do país, bem como estes grupos também são os mais representativos do Novo Mundo.

Apesar dos avanços nos estudos e compreensão da filogenia do gênero *Pheidole*, a taxonomia clássica ainda apresenta muita dificuldade na identificação do mesmo, devido ao tamanho diminuto do animal, que dificulta a caracterização das estruturas morfológicas corretamente, desta forma muitos trabalhos fazem uso da classificação por meio de morfoespécies para tentar sanar este obstáculo (e.g., Brito 2012, Freire 2012). Assim sendo faz-se necessário mais estudos envolvendo uma melhor compreensão na variação das espécies, buscando complementar sua taxonomia, filogenia e descobrir espécies novas.

Para auxiliar essa compreensão, os pesquisadores fazem cada vez mais o uso das ferramentas de identificação molecular, associadas à taxonomia clássica. A partir do uso do DNA mitocondrial, foi proposta por Herbert (2003) a ferramenta DNA *Barcode*, onde por meio de um fragmento de 648pb do gene Citocromo Oxidase subunidade I (COI) – este flanqueado por regiões de sequências conservadas e sendo responsável por funções bioenergéticas – é possível separar e identificar espécies, tendo como premissa que cada espécie tem seu próprio “código de barra” genético e que a variação interespecífica é bem mais elevada que a intraespecífica (cerca de 3%). O DNA *Barcode* além do uso como ferramenta taxonômica, pode desempenhar um papel importante na biologia da conservação, tanto como objetivos a preservação da biodiversidade (Rubinoff 2006).

Na última década, com a utilização de ferramentas moleculares, houve um crescente avanço na compreensão das relações filogenéticas de Formicidae. Desta forma a identificação molecular, por meio de ferramentas como o DNA *Barcode* e sequenciamento do DNA, é essencial para atuar em duas frentes de trabalhos filogenéticos: a primeira seria revelar os grupos de espécies e as suas relações e a outra na resolução de espécies crípticas e problemas de identificação nos ramos das árvores filogenéticas (e.g., Moreau 2006, Smith 2007, Moreau 2008, Szalanski 2010, Ng’endo 2013). A crescente difusão do uso do DNA *Barcode*, atrelada a todas as dificuldades para se compreender a megadiversidade encontrada no gênero *Pheidole* justificam a realização desse estudo, que tem como objetivo avaliar a eficácia desta ferramenta molecular na identificação de espécies do gênero em questão coletadas no bioma

Mata Atlântica, considerado um dos maiores “hotspot” da biodiversidade do mundo (Myers *et al.* 2000).

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* (PheidR/PheidF) a partir da sequência depositada no National Center for Biotechnology Information (NCBI – GenBank™) (Moreau 2006), este último foi desenhado no Laboratório de Entomologia Molecular (LENT-Mol) e sendo o principal utilizado para o desenvolvimento do trabalho.

As reações de PCR foram realizadas em volume total de 25µl contendo 3µl de tampão Taq 10x com (NH₄)₂SO₄; 1µl de dNTP mix 2,5mM; 1µl MgCl₂ 25mM; 1µl de cada primer 20mM; 0,3µl (1U) Taq DNA polimerase (LGC Biotecnologia); 16,7µl de água ultra-pura e 1µl 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 Biotecnologia) em substituição ao método de brometo de etídio (25µg/µl). 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.

Os produtos da amplificação dos genes foram purificados com o protocolo de precipitação de DNA com PEG 20%. As reações de sequenciamento foram realizadas pelo método direto, em ambas as direções – forward e reverse – contendo: 50ng de produto de PCR purificado, 1,0 µl de tampão de sequenciamento (Save Money 5X), 0,5 µl de BigDye v3.1 (Applied Biosystems®), 0,25 µl do oligonucleotídeo (pmol/ µl) iniciador (*primer*) e quantidade de água ultra pura que complete 10 µl. Ao término da reação de sequenciamento, que consistiu de 35 ciclos compostos por uma etapa a 96°C por 15 s, uma etapa a 52°C por 10 s e uma etapa de polimerização a 60°C por 4 min, as amostras foram mantidas a 4°C até o momento do uso e então, submetidas ao sequenciamento em um sequenciador automático 3130XL DNA Analyzer conforme metodologia sugerida pelo fabricante do equipamento (Applied Biosystems®).

Sequências “forward” e “reverse” de cada amostra foram comparadas, corrigidas e editadas no programa BioEdit (Hall 1999), criando uma única sequência consenso e alinhadas utilizando o programa Muscle versão 3.6 (Edgar 2004) ou o programa MEGA v.5.1 (Tamura 2007).

A busca por sequências semelhantes às obtidas neste trabalho foram realizada através do programa BLAST (Altschul *et al.* 1990) no banco de dados do NCBI – GenBank™ (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Adicionalmente foram utilizadas 185 sequências do gênero *Pheidole* depositadas no NCBI.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir das 20 morfoespécies de *Pheidole*, disponível para o desenvolvimento do trabalho, foi feito o sequenciamento resultando 68 sequências distribuídas entre os *primers* PheidR, LCO e HCO, destas sequências ao serem editadas e alinhadas obteve-se um total de 13 morfoespécies definidas. As outras sete morfoespécies não apresentaram sequências com uma boa qualidade para análise, visto que seu tamanho foi abaixo do esperado para a região

(cerca de 600pb), apresentavam muitos picos duplos no eletroferograma ou estavam sujas. Devido à excelente qualidade da sequência da espécie *Pheidole* sp18, a mesma foi depositada no NCBI sob o voucher número 1586725. Sendo a primeira sequência de uma espécie de *Pheidole* brasileira a ser depositada neste banco de dados.

As sequências das 13 morfoespécies possuem um tamanho variando entre 551 pb e 715 pb, tendo como tamanho médio o comprimento de aproximadamente 647 pb. Considerando o tamanho médio das sequências, observou-se 425 pares de bases conservados e 222 pb variáveis. Ao observar a composição nucleotídica das sequências, é possível identificar uma maior porcentagem de Adenina (35,6), seguida de Timina (30,2), Citosina (17,8) e Guanina (16,6). A composição nucleotídica obtida a partir do sequenciamento das morfoespécies deste trabalho diferencia das 185 sequências depositadas no NCBI, uma vez que a maior concentração é de Timina. Uma explicação lógica para esse fenômeno é que a maioria das sequências depositadas no banco de dados do NCBI são referentes às espécies do Velho Mundo, sendo poucas espécies originadas na América ou Neotropicais.

Através do método Neighbour-joining um dendograma foi construído, tendo como base as 13 sequências finais. Foi acrescentada, ainda, a espécie *Myrmica* sp. como grupo externo e as espécies *Pheidole amazonica* – devido à sua alta similaridade com a sequência da espécie *Pheidole* sp18 – e *Pheidole adrianoi*, para verificar a veracidade das sequências obtidas (Figura 1).

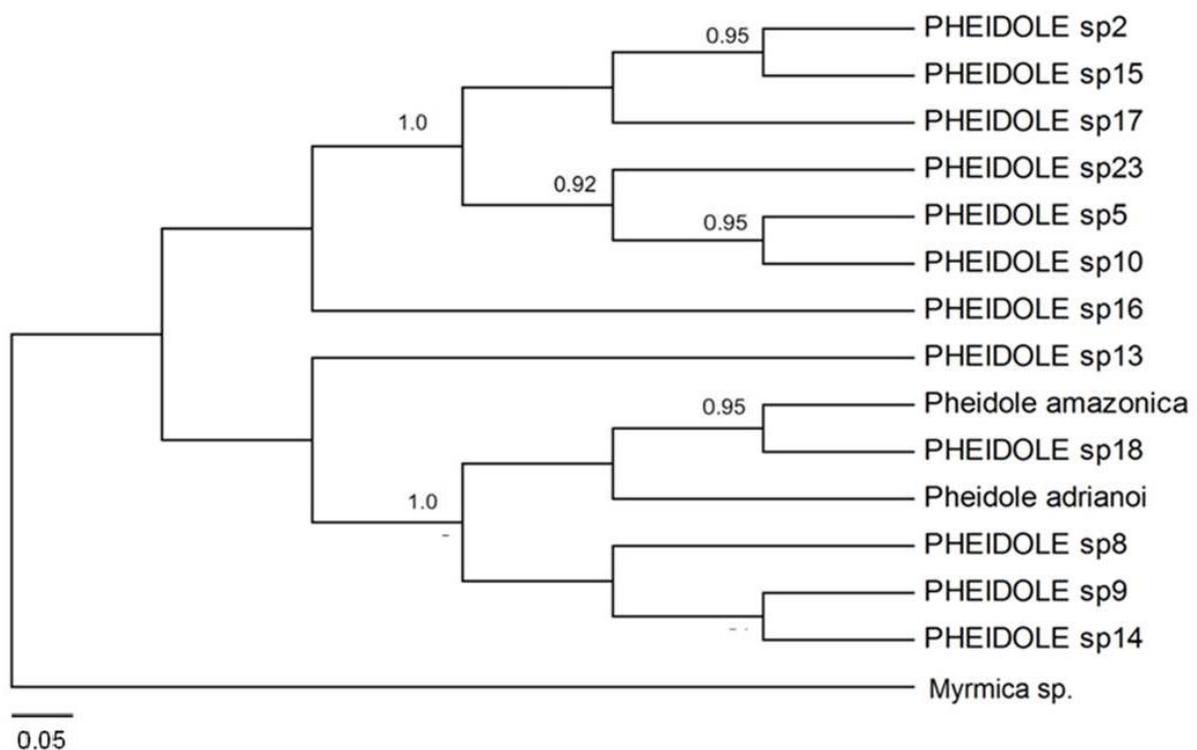


Figura1: Dendograma obtido a partir das sequencias de *Pheidole*.

Após as análises, não foram encontradas nenhuma deleção, inserção ou stop-codons, evidenciando assim que todas as regiões das morfoespécies de *Pheidole* sequenciadas correspondem à sequência funcional do gene COI. A distância K2P média entre espécies do presente estudo foi de aproximadamente 2,75%, taxa esta menor que os 3% proposto por Herbert et. al (2003), como variação intraespecífica. Toda via conforme proposto por Moreau (2008), sobre a origem única e recente de *Pheidole* no Novo Mundo, nossos resultados corroboram com especiação recente comprovando assim a eficácia da ferramenta molecular (DNA Barcode) na determinação a nível de espécies de formigas do gênero *Pheidole*.

Este estudo fornece evidências para ratificar a já comprovada grande eficiência do DNA *Barcode* na identificação a nível de espécie, dando a oportunidade para que a grande lacuna existente na taxonomia de *Pheidole* do Novo Mundo comece a ser desvendada. Desta forma resoluções de casos, como a “hiperdiversidade” do gênero *Pheidole*, necessitam de minuciosos estudos morfológicos feitos por taxonomistas especializados antes que qualquer afirmação possa ser feita. Sendo assim a ferramenta molecular do DNA *Barcode* e a Taxonomia clássica (morfológica) devem caminhar em conjunto, buscando elucidar os problemas taxonômicos existentes.

REFERÊNCIAS

- ALTSCUL S. F., GISH, W., MYERS E. W. & LIPMAN D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- BRITO A. F., PRESLEY S. J. & SANTOS, G. M. M. 2012. Temporal and trophic niche overlap in a guild of flower-visiting ants in a seasonal semi-arid tropical environment. *Journal of Arid Environments*, 87: 161-167.
- EDGAR R. C. 2004. Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5): 1792-97.
- FREIRE C. B, OLIVEIRA G. V., MARTINS F. R. S., SOUZA L. E. C., RAMOS-LACAU L. S. & CORRÊA M. M. 2012. Riqueza de formigas em áreas preservadas e em regeneração de caatinga arbustiva no sudoeste da Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Biociências*. 10(1): 131-134.
- HALL T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- HERBERT P. N. D. 2003. 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.
- LONGINO J. T., CODDINGTON J., COLWELL R. K. 2002. The ant fauna of a tropical rain forest: Estimating species richness three different ways. *Ecology* 83: 689–702.
- MYERS N., MITTERMEIER R. A., MITTERMEIER C. G., DA FONSECA G. A. B., KENT J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853–858.
- 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.
- NG'ENDO R. N., OSIEMO Z. B., BRANDL R. 2013. DNA barcodes for species identification in the hyperdiverse ant genus *Pheidole* (Formicidae: Myrmicinae). *Journal of Insect Science* 13:27
- RUBINOFF D. 2006. Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation. *Conserv. Biol.*, 4, 1026-1033.
- 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.
- TAMURA K. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology Evolution*. v. 24.
- WILSON E. O. 2003. *Pheidole* in the New World: A Dominant, Hyperdiverse Ant Genus. *Rev. Biol. Trop* v.53 n.1-2