

DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES GENÉTICOS E DIVERSIDADE GENÉTICA EM FORMIGAS *DINOPONERA QUADRICEPS SANTSCHI* (FORMICIDAE, PONERINAE).

Rosana Santos Matos¹; Eddy José Francisco de Oliveira²; Juliana Caramés Duarte³

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: rosanamatos@hotmail.com.br
2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: eddyfo@uefs.br
3. Mestranda, Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: julianacarames@yahoo.combr

PALAVRAS-CHAVE: Microsatélite, Formigas, *Dinoponera quadriceps*

INTRODUÇÃO

A necessidade de preservação da biodiversidade tem se tornado prioridade em todo o mundo, visto que é compreendido que existe uma rede de interações entre as espécies e que a perda de qualquer uma delas pode levar a variações no status de espécies relacionadas a ela, chegando ao ponto de prejudicar todo o complexo de gerações existentes nesse ecossistema e adjacentes. (Savard *et al.*, 2000, Sih *et al.*, 2000).

Para realizar uma melhor análise e compreender a estrutura das populações faz-se necessário um estudo aprofundado de sua biologia, incluindo suas características genéticas. Entre essas características pode-se destacar a variabilidade genética como uma característica intrínseca fundamental, responsável pela manutenção da espécie à longo prazo.

Diversos estudos populacionais, ecológicos e evolutivos foram realizados a partir de microsatélites, seqüências que possuem de 2 a 6 nucleotídeos, repetidas em tandem, altamente polimórficos e flanqueiam seqüências conservadas (Avisé, 1994). Esse marcador é uma importante ferramenta nos estudos de diversidade genética, estrutura populacional, comportamento reprodutivo e fluxo gênico em formigas, foram utilizados em estudos como *Pogonomyrmex rugosus* (Gadua, J.; Strehl, C.P.J. & Hölldobler, B. 2003) e *Solenopsis invicta* (Zeng-Qiang *et al.*, 2009).

A espécie *Dinoponera quadriceps Santschi* 1921 é endêmica Do nordeste brasileiro, são formigas relativamente grandes, cujas operárias chegam a medir cerca de três centímetros e não apresentam diferenças morfológicas de castas. Toda operária é capaz de reproduzir, mas apenas uma se torna gamergate (operária fertilizada) e monopoliza a reprodução na colônia (Peeters, 1993)

Compreender a estrutura e a variabilidade genética é um importante mecanismo para possibilitar a preservação de uma espécie. Essa condição torna-se mais importante quando se trata de uma espécie endêmica de uma região que sofre constante devastação, como a região do “Polígono das secas”.

Essa devastação constante e as consequências que ela traz para a fauna da região tornam imprescindíveis os estudos sobre a diversidade genética dos indivíduos dessa região, objetivo central desse projeto, a fim de preservar o patrimônio genético dessa espécie.

METODOLOGIA

Foram analisados 172 indivíduos de *D. quadriceps* de 45 colônias. Os espécimes são provenientes de diferentes ecorregiões do Bioma Caatinga (Velloso, 2001). Além disso, serão amostrados 10 indivíduos de aproximadamente 3 diferentes ninhos localizados no campos da UEFS com objetivo de avaliar a estrutura nidial.

Genotipagem

Foram amostrados 10 indivíduos (operárias) de cada ninho e o material coletado foi estocado a -20°C. O DNA total foi extraído dos indivíduos de cada colônia, a partir do tórax, segundo Higuchi (1989), modificado.

A reação de PCR foi realizada de acordo com a temperatura ideal de cada indicador microssatélite e os produtos da amplificação foram separados em gel de poliacrilamida 10% (desnaturante – Uréia 7M) corado com nitrato de prata, de acordo com a metodologia apresentada por Creste *et al.*, (2001).

Isolamento e caracterização de microssatélites:

1. Verificação da qualidade do DNA -gel de agarose (1%)-TAE 1x.
2. Digestão com a enzima de restrição RsaI
3. Eluição - Quantificação - gel de agarose (1%)-TAE 1x.
4. Ligação dos adaptadores
5. Verificação da ligação por PCR
6. Biotinização – sondas
7. Enriquecimento GT/CT
8. Verificação do enriquecimento por PCR
9. Ligação no vetor de clonagem
10. Transformação bacteriana
11. Captura das colônias positivas
12. Extração do DNA plasmidial-Mini-Prep - Quantificação
13. PCR – Seqüenciamento
14. Seqüenciamento - ABI PRISM 377 DNA
15. Alinhamento e análise das seqüências
16. Obtenção dos iniciadores-Gene Runner ® software

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para cada um dos dois indivíduos de *D. quadriceps* foram realizadas duas amplificações de cada primer ISSR. Os seis primers ISSR utilizados obtiveram sucesso na amplificação dos fragmentos de DNA desejados. Dos 56 clones sequenciados 44 foram positivos (78,56%) com regiões repetidas contendo microssatélites.

As seqüências contendo microssatélites foram submetidas ao site www.biophp.org/minitools/microsatellite_repeats_finder/demo.php, a fim de analisar o motif (repetição) e o número de repetições.

A nomenclatura dos microssatélites foi feita utilizando a primeira letra do nome gênero em maiúscula seguida das três primeiras letras do nome da espécie em minúsculo, de acordo com o padrão de submissão do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Tabela 1).

Tabela 1: Resultados da submissão ao site Microsatelites repeats finder.

Amostra	Motif	Número de Repetições
Dqua1	GT	10
Dqua3	CA	5
Dqua8* ¹	AC	11
Dqua8.1	TT	3

Dqua13	CA	6
Dqua13.1	AC	4
Dqua15	AC	10
Dqua15.1	CA	6
Dqua17	TAAA	3
Dqua17.1	GT	10

Após a identificação dos microssatélites de cada sequência, os primers foram desenhados com utilizando o programa Primer3 (Rozen e Skaletsky, 2000) com um tamanho de 18 a 20pb, contendo 35-50% de GC, temperatura de anelamento entre 50 e 56°C e para ampliações entre 100 e 300pb. Os Primers foram encomendados à empresa Prodimol Biotecnologia. Os Primers encomendados foram entregues e foi padronizado os protocolos de PCR utilizando os Primers Dqua1, Dqua8 e Dqua17.1.

O banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) foi consultado a fim de identificar sequências de microssatélites depositadas no site são referentes à Subfamília Ponerinae. Das 1385 sequências de microssatélites depositadas, 75 são de espécies do Subfamília Ponerinae, sendo referentes às espécies *Diacamma indicum* (11 sequências); *Diacamma cyaneiventre* (10 sequências); *Pachycondyla luteipes* (10 sequências); *Platythyrea punctata* (10 sequências); *Simopelta pergandei* (9 sequências); *Pachycondyla verenae* (8 sequências); *Diacamma ceylonense* (6 sequências); *Pachycondyla inversa* (5 sequências); *Hypoponera opacior* (5 sequências); e *Diacamma sp.* Okinawa – 2006 (1 sequência).

A busca no banco de dados do NCBI foi feita com o intuito de averiguar o possível sucesso das sequências obtidas para o desenvolvimento de marcadores microssatélites em *D. quadriceps*, visto que, segundo Tóth (2000) a comparação demonstra quais motifs possuem maior variabilidade em espécies correlatas e motifs encontrados na espécie que se encontram na subfamília são excelentes indicativos de marcadores moleculares específicos.

Tóth (2000) afirma ainda que dentre os microssatélites, os classificados como perfeitos são ainda melhores como marcadores genéticos. A análise dos dados obtidos com o presente estudo mostra que foram encontrados apenas microssatélites perfeitos, como foi demonstrado na tabela 7, evidenciando e comprovando a eficácia e o provável sucesso dos microssatélites isolados para *D. quadriceps*.

REFERÊNCIAS

- Avise, J.C. (1994). Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman & Hall, New York.
- Gadau, J.; Strehl, C.P.J. & Hölldobler, B. Determinants of intracolony relatedness in *Pogonomyrmex rugosus* (Hymenoptera; Formicidae): mating frequency and brood raids. *Molecular ecology*, 12, 1931-1938, 2003.
- Higuchi, R 1989. Simple and rapid preparation of samples for PCR. In PCR technology (ed. H.A. Erlich), pp. 31-38. Stockton Press
- Peeters, C (1993) Monogyny and polygyny in ponerine ants with or without queens. *Queen Number and Sociality in Insects*, Oxford University Press, p. 235–261.
- Rozen, S.; Skaletsky, H.J. (2000) "Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers". *Methods in Molecular Biology*, vol.132, 365-386.

- Savard JL, Clergeau P, Mennechez G (2000) Biodiversity concepts and urban ecosystems. *Landscape and Urban Planning*, 48, 131-142.
- Sih A, Jonsson BG, Luikart G (2000) Habitat loss: ecological, evolutionary and genetic consequences. *Trends in Ecology and Evolution*, 15, 132-134.
- Tóth G., Gaspari Z., Jurka J (2000) Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research* 10, 967-981.
- Velloso, A. L.; Sampaio, E. V. S. B. Pareyn (2001) Ecorregiões Propostas para o Bioma Caatinga, Recife: Associação Plantas do Nordeste; Instituto de Conservação Ambiental The Nature Conservancy do Brasil, 76p.
- Zeng-Qiang Qian, Y. Ching Crozier, Birgit C. Schlick-Steiner, Florian M. Steiner, Ross H. Crozier (2010) Characterization of expressed sequence tag (EST)-derived microsatellite loci in the fire ant *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae) 13:244-254.