

## MARCADORES MOLECULARES *COI*, *28S* E *GP-9* COMO FERRAMENTAS NA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Solenopsis* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

Débora Yumi Kayano<sup>1</sup>; Maria Santina de Castro Morini<sup>2</sup>; Rodrigo Fernando de Souza<sup>3</sup>

1. Estudante do curso de Biologia; e-mail: yumi.debora@hotmail.com
2. Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: morini@umc.br

Área do Conhecimento: **Biologia Molecular**

**Palavras-chave:** DNA; Áreas urbanas; DNA; Taxonomia; *Solenopsis*.

### INTRODUÇÃO

O gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade I (*COI*), que consiste em uma região de aproximadamente 650 pares de bases, foi proposto por Hebert *et al.* (2003) como ferramenta molecular para identificação de espécies. O gene nuclear ribossomal, *28S*, é pouco polimórfico, porém com taxa evolutiva suficiente para distinguir gêneros e espécies (BELLEMAIN *et al.*, 2010). O gene *Gp-9* tem 15% dos nucleotídeos com variação, havendo separação de alelos por espécie, o que possibilita testá-lo como uma ferramenta de identificação molecular (KRIEGER e ROSS, 2005; GOTZEK *et al.*, 2007).

### OBJETIVOS

O objetivo geral foi avaliar os marcadores moleculares *28S* e *GP-9* como auxiliares de identificação molecular em espécies do gênero *Solenopsis*. Especificamente (1) verificamos os haplótipos mitocondriais do gene *COI*, (2) amplificamos e sequenciamos parcialmente os genes *28S* e *Gp-9* e (3) comparamos os resultados com os genes *COI*, *28S* e *Gp-9* averiguando a congruência com sequências do *GenBank*.

### MÉTODO

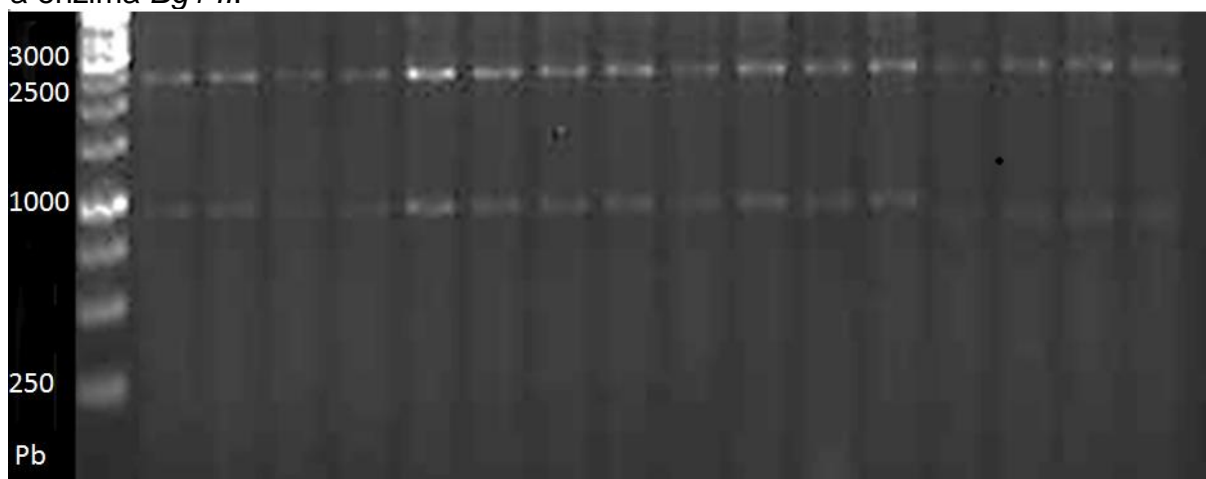
As coletas das colônias foram realizadas nas cidades de Biritiba-Mirim, Salesópolis e Mogi das Cruzes, que pertencem à Região do Alto Tietê. Em cada cidade, foram selecionadas cinco localidades onde foram coletadas duas colônias/localidade, utilizando a técnica de Banks *et al.* (1981). As formigas foram armazenadas em freezer - 20°C e em etanol 90%. A extração de DNA foi realizada com o protocolo adaptado de Martins (2010). Para a reação de polimerização em cadeia do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I foram utilizados os *primers*, *foward* CIJ, *reverse* DDS e o ciclo térmico descritos por Ahrens, Ross e Shoemaker (2005). Os *primers foward* 28sF3633, *reverse* 28sR4076 e o ciclo térmico descritos por Al-Abd *et al.* (2016), foram utilizados para a amplificação parcial do gene *28S*. O gene *Gp-9* foi amplificado utilizando os *primers foward* *Gp9-pre3* (OAKEY *et al.*, 2011), o *primer reverse* 16BAS (VALLES e PORTER, 2003) e o kit de PCR Invitrogen™ Platinum™ SuperFi™ PCR Master Mix para a amplificação de um fragmento de 935pb do gene *Gp-9*. A ligação do fragmento do gene *Gp-9* foi feita com o kit de clonagem CloneJET PCR Cloning Kit, e a transformação foi realizada com a linhagem DH 10β de *Escherichia coli* por eletroporação. A purificação dos plasmídeos clonados foi feita de acordo com Schmitz e Riesner (2006). Foi feita a digestão dos plasmídeos com a enzima *Bg1 II* para averiguar se havia o fragmento desejado inserido, sendo observado em eletroforese em gel de agarose 1,5%. O

sequenciamento dos produtos de PCR e a clonagem foram realizados por meio de serviço terceirizado pelo Instituto Biológico, Laboratório de Bioquímica Fitopatológica. Os dados foram analisados no *software BioEdit Sequence Alignment Editor*, Mega 4.0. Foram realizadas comparações entre as sequências dos genes no *GenBank* com a das sequências encontradas nas regiões de estudo. O *software DnaSP 5.10.1* foi utilizado para analisar os haplótipos pertencentes a cada espécie.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as sequências do gene *COI* possuem similaridade maior que 98% com aquelas depositadas no *GenBank*. Como esse nível de similaridade confere o “status” de espécie (RUBINOFF, 2006), temos a ocorrência de três espécies de *Solenopsis* nas áreas urbanas. Foram 11 colônias de *Solenopsis invicta*, com haplótipo mitocondrial H41 e três com o haplótipo H47/H40; 12 colônias de *Solenopsis saevissima*, com o haplótipo W51 e uma colônia com o haplótipo W51/73; três colônias de *Solenopsis macdonaghi*, com o haplótipo MAC1. A comparação das sequências do gene *28S* com as do *GenBank* não possibilitou a distinção das espécies de *Solenopsis* como o *COI*; todas se assimilaram às sequências de *S. saevissima* e *S. invicta* simultaneamente, com apenas um haplótipo. Apesar de Noronha *et al.* (2003), Saux, Fisher e Spicer (2004) e Oliveira *et al.* (2009) demonstrarem que o *28S* é usado na distinção de espécies, para *Solenopsis* não está sendo viável, provavelmente porque o gene *28S* é conservado e as taxas evolutivas são mais lentas do que o *COI* (HILLIS e DIXON, 1991). Os fragmentos originários dos plasmídeos extraídos no processo de clonagem do gene *Gp-9*, com a enzima *Bg1 II*, gerou fragmentos de 1000pb referente ao inserto e de 2500pb do plasmídeo (Figura 1). Os fragmentos clonados se encontram em processo de sequenciamento e para posterior análise.

**Figura 1** – Fragmentos gerados pela digestão do pJET1.2/blunt Cloning Vector com a enzima *Bg1 II*.



## CONCLUSÕES

O gene *COI* distinguiu três espécies de *Solenopsis* com haplótipos mitocondriais distintos, enquanto o gene *28S* não apresentou diferenças nucleotídicas que possibilite a separação de espécies. Todas as sequências apresentaram o mesmo haplótipo, indicando que *S. invicta* e *S. saevissima* é a mesma espécie. O gene *Gp-9* será o sequenciado e analisado.

## REFERÊNCIAS

- AHRENS, M. E.; ROSS, K. G.; SHOEMAKER, D. D. Phylogeographic structure of the fire ant *Solenopsis invicta* in its native south American range: roles of the natural barriers and habitat connectivity. **Evolution**, v. 59, p. 1733-1743, 2005.
- AL-ABD, N. M.; NOR, Z. M.; MANSOR, M., HASAN, M. S.; KASSIM, M. Antifilarial and antibiotic activities of methanolic extracts of *Melaleuca cajuputi* flowers. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 54, n. 3, p. 273, 2016.
- BANKS, W. A., LOFGREN C. S.; JOUVENAZ, D. P.; STRINGER, C. E.; BISHOP, P. M.; WILLIAMS, D. F.; WOJCIK, D. P.; GLANCEY, B. M. Techniques for collecting, rearing and handling imported fire ants. USDA. Scientific and Educational Administrative Advances in Agricultural Technology, AAT-S-21, 1981.
- BELLEMAIN, E.; CARLSEN, T.; BROCHMANN, C.; COISSAC, E.; TABERLET, P.; KAUSERUD, H. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals PCR biases. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 189, 2010.
- GOTZEK, D.; SHOEMAKER, D. D. F; ROSS, K. G. Molecular variation at a candidate gene implicated in the regulation of fire ant social behavior. **PLoS One**, v. 2, n. 11, p. e1088, 2007.
- HEBERT, P. D.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313-321, 2003.
- HILLIS, D. M.; DIXON, M. T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **The Quarterly Review of Biology**, v. 66, n. 4, p. 411-453, 1991.
- KRIEGER, M. J. B.; ROSS, K. G. Molecular evolutionary analyses of the odorant-binding protein gene *Gp-9* in fire ants and other *Solenopsis* species. **Molecular Biology and Evolution**, v. 22, n. 10, p. 2090-2103, 2005.
- MARTINS, C. Análises moleculares das formigas lava-pés (*Solenopsis* spp.) (Hymenoptera: Formicidae) e da presença da endobactéria *Wolbachia*. 2010. 85 f. Dissertação (mestrado em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular)) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.
- NORONHA, A.; MOTA, A.; MORAES, G. J.; COUTINHO, L. L. Molecular characterization of mite populations of *Euseius citrifolius* Denmark & Muma and *Euseius concordis* (Chant)(Acari: Phytoseiidae) using sequences of the ITS1 and ITS2 regions. **Neotropical Entomology**, v. 32, n. 4, p. 591-596, 2003.

Oakey, J.; Harris, E.; Pease, B.; Jennings, C.; McCubbin, K. Differentiation of *Solenopsis invicta* social forms using high resolution melt PCR. *Bulletin of Entomological Research*, v. 101, n. 05, p. 581-589, 2011.

Oliveira, C. M. G.; Machado, A. C.; Kubo, R. K.; HaraKava, R. Diagnose de *Aphelenchoides fragariae* e *Pratylenchus* spp. pela aplicação da tecnologia do código de barras do DNA. *Nematologia Brasileira*, v. 33, n. 3, p. 218-225, 2009.

Rubioff, D. Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation. *Conservation Biology*, v. 20, n. 4, p. 1026-1033, 2006.

Saux, C.; Fisher, B. L.; Spicer, G. S. *Dracula* ant phylogeny as inferred by nuclear 28S rDNA sequences and implications for ant systematics (Hymenoptera: Formicidae: Amblyoponinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 33, n. 2, p. 457-468, 2004.

Schmitz, A.; Riesner, D. Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. *Analytical Biochemistry*, v. 354, n. 2, p. 311-313, 2006.

Schultz, T. R.; Brady, S. G. Major evolutionary transitions in ant agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 105, n. 14, p. 5435-5440, 2008.

Valles, S. M.; Porter, S. 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.