

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Divergência Genética Interpopulacional em *Camponotus atriceps*
Smith, 1858 (Hymenoptera, Formicidae)**

Teresa Cristina Leandro de Jesus

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Uberlândia,
para a obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas

Uberlândia-MG
Julho-2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Divergência Genética Interpopulacional em *Camponotus atriceps*
Smith, 1858 (Hymenoptera, Formicidae)**

Teresa Cristina Leandro de Jesus

Orientador: Prof. Dr. Malcon A. M. Brandeburgo

Co-Orientador: Prof. MSc. Marcus Teixeira Marcolino

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Uberlândia,
para a obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas

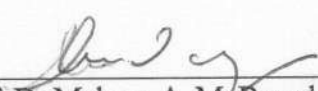
Uberlândia-MG
Julho-2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Divergência Genética Interpopulacional em *Camponotus atriceps*
Smith, 1858 (Hymenoptera, Formicidae)**

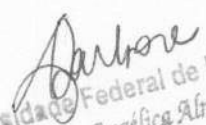
Teresa Cristina Leandro de Jesus

Aprovado Pela Banca Examinadora Em 25/07/03 Nota 100,00


Prof. Dr. Malcon A. M. Brandeburgo
Orientador


Prof. MSc. Marcus Teixeira Marcolino
Co-Orientador


Prof. Dr. Waldesse Piragé Junior
Co-Orientador


Universidade Federal de Uberlândia
Prof.ª Dra. Ana Angélica Almeida Barbosa
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

Uberlândia, 25 de Julho de 2003

DEDICATÓRIA

À minha família,
meu porto seguro e
fonte de minhas maiores alegrias,
pela confiança depositada!

Agradecimentos

A Deus pela vida e por me guiar por todos os caminhos. Os que já caminhei e os que ainda caminharei.

Aos meus pais Rosangela e Rubens, pelo amor e sacrifício dedicados durante toda a minha vida.

Ao Prof. Dr. Malcon A. M. Brandeburgo, pela orientação e sugestões para este trabalho.

Ao grande amigo Marcolino, pela oportunidade de realização deste trabalho, pela valiosa orientação, pela amizade, pelos conselhos e ainda pelo incentivo constante.

Ao amigo Waldesse pela orientação na parte molecular e pelo interesse em colaborar durante todo o trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Genética: Alcione, Ana Paula, Borella, Carlos, Carol, Cauê, Cícero, Cida, Cynara, Dona Norita, Fabíola, Fausto, Fernanda, Flávia, Guilherme, Jaqueline, Joaquim, Juliana Côbo, Juliana Franco, Juliano, Katiana, Luciana, Luciano, Narcisa, Milla, Paula, Renato, Rosana, Simone, Soraya, Tininha, Vanessa, Vânia, Walter (e mais alguém que eu tiver esquecido!) pelos ensinamentos e alegrias. Aprendi e diverti muito com vocês!

Aos amigos que perderam noites de sono para coletar as amostras deste trabalho: Cynara, Jaqueline, Joaquim, Jú Franco, Marcolino, Milla, Narcisa e Waldesse.

Ao Vinícius pelo carinho, compreensão e paciência nas intermináveis horas de espera.

Aos amigos da 49ª Turma de Biologia, especialmente: Cristiane, Daniela do Carmo, Daniela Valéria, Érika, Fausto, Juliana, Lorraine, Lúbia, Luciana, Narcisa, Paula e Vanessa pela amizade, companheirismo, pelas farras e pelos pagodes.

A todos os meus grandes amigos de Uberaba-MG, especialmente Camila, Flávia, Lisiane e Thabbta por entenderem minha ausência e pelos bons momentos que curtimos juntos!

Aos meus mais que amigos Fausto e Vanessa pelo apoio em todos os momentos felizes ou não. Vocês foram verdadeiros irmãos para mim, obrigada por tudo!

Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart e ao CEIS- UNESP- Rio Claro pelos *primers* gentilmente cedidos para a realização deste trabalho.

Ao CNPq, CAPES, FAPEMIG e UFU pelo apoio financeiro.

A todos vocês o meu muito obrigada!

ÍNDICE

ABREVIACÕES.....	iv
RESUMO.....	v
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	5
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	9
4. CONCLUSÕES.....	15
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	16
APÊNDICE.....	20

ABREVIACÕES

%	por cento (porcentagem)
°C	grau (s) Celsius
µl	microlitro(s)
µM	micromolar
ABS	absorbância
MgCl ₂	cloreto de magnésio
dATP	5'-desoxiadenosina trifosfato
dCTP	5'-desoxicitosina trifosfato
dGTP	5'-desoxiguanosina trifosfato
dTTP	5'-desoxitimidina trifosfato
DNA	ácido desoxirribonucléico
EDTA	ácido etilenodiaminotetra acético sal dissódico
h	hora (s)
HCl	ácido clorídrico
KCl	cloreto de potássio
M	molar
Mers	bases em fitas simples
min	minuto (s)
ml	mililitro (s)
mM	milimolar
NaCl	cloreto de sódio
ng	nanograma (s)
nm	nanômetro (s)
pb	pares de base
pH	potencial hidrogeniônico
pmol	pico-mol
RAPD	DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso
rpm	rotações por minuto
s	segundo (s)
SDS	dodecilsulfato de sódio
U	unidade (s) de enzima
UV	ultra-violeta
UPGMA	unweighted-pair group method using arithmetic averages
V	volts

RESUMO

Camponotus atriceps tem apresentado uma intensa adaptação a ambientes urbanos e vem causando incômodo e prejuízos econômicos ao homem. A técnica de RAPD, baseada na amplificação de segmentos genômicos múltiplos ao acaso, a partir de *primers* arbitrários, tem sido muito utilizada por possibilitar a caracterização de populações e a detecção de polimorfismos genéticos. Nesse trabalho, objetivou-se estimar a diversidade genética entre 10 populações de *C. atriceps* (Uberlândia, Uberaba, Patos de Minas, Paracatu, Franca, São José do Rio Preto, Itumbiara, Rio Verde, Porangatu e Rio de Janeiro), por uso de marcadores RAPD, usando *Atta sexdens* como *outgroup*. Os 13 *primers* utilizados produziram 105 bandas informativas, das quais 98 evidenciaram polimorfismos (93.3%). A distância genética por Porcentagem de Desacordo e UPGMA dividiu a população de *C. atriceps* em dois grupos ao nível de 40% de distância genética (grupo 1: Uberlândia, Paracatu, Patos de Minas, Franca, Rio de Janeiro e Porangatu; grupo 2: demais amostras). *Atta sexdens* divergiu em 57% das amostras de *C. atriceps*. A diferenciação genética encontrada entre as populações de *C. atriceps*, bem como a ausência de um padrão geográfico, parece sugerir apenas efeitos decorrentes da necessidade de adaptação ao dinâmico ambiente urbano em que essas se encontram.

Palavras- chave: Formiga, *Camponotus*, RAPD.

1. INTRODUÇÃO

As formigas pertencem à classe Insecta, ordem Hymenoptera, família Formicidae e são todas eusociais, pois, apresentam as três características que definem o comportamento dito verdadeiramente social: (1) superposição de ao menos, duas gerações em determinado instante do desenvolvimento colonial, com (2) indivíduos estéreis e reprodutivos, e (3) cuidado cooperativo com a prole (WILSON, 1971). São os animais dominantes na maioria dos ecossistemas terrestres possuindo assim, papéis fundamentais nos fluxos de energia e nutrientes ao nível de ecossistema. (WILSON, 1987).

Uma colônia de formigas é formada de indivíduos adultos e em desenvolvimento (ovos, larvas e pupas). Os adultos, em sua maioria, são fêmeas e estão divididos geralmente em duas castas: as fêmeas férteis ou rainhas, cuja função primordial é a postura de ovos, e as fêmeas estéreis que podem ser soldados, geralmente responsáveis pela defesa da colônia, ou operárias que realizam todas as demais atividades da colônia, tais como: coleta de água e alimento, alimentação da cria e da rainha e construção do ninho (WILSON, 1971; BUENO, 1998).

Camponotus pertence à subfamília Formicinae, tribo Camponotini e é o maior e mais amplamente distribuído de todos os gêneros de formigas, ocorrendo em todos os continentes. Suas espécies mostram maior diversidade comportamental e ecológica que a maioria das formigas. Quase todas as espécies de *Camponotus* são polimórficas, possuindo subcastas maiores e menores bem definidas. As operárias são muitas e as colônias são relativamente populosas, em alguns casos contendo centenas ou milhares de adultos (WILSON, 2000).

A maioria das formigas carpinteiras (*Camponotus* spp.) nidificam em madeira morta, mas podem também fazê-los em troncos de árvores, porém não se alimentam da madeira. Também fazem seus ninhos dentro das casas, aproveitando falhas na estrutura, podendo ser encontradas em vigas de madeira e molduras de porta. Podem construir ninhos secundários,

menores e ligados ao formigueiro principal, que é maior, podendo até mesmo ser encontradas dentro de aparelhos eletrônicos (BUENO, 1998; MARCOLINO, 1999).

Freqüentemente as alterações ambientais causadas pela ação antrópica provocam aumentos populacionais de certos insetos, tornando-os “praga” e isso ocorre quando esses insetos exploram um habitat diferente ou modificado do original, fazendo com que encontrem novas condições, propícias ao seu desenvolvimento (MARCOLINO, 1999). É o que ocorre com *Camponotus atriceps* (BOLTON, 1995), essa espécie vem apresentando uma intensa atividade sinantrópica. A degradação do cerrado (habitat natural da formiga) pelo homem faz com que as espécies sofram um processo de dispersão para ambientes urbanos, causando ao homem incômodo e prejuízos econômicos (MARCOLINO, 1999). Sendo assim, torna-se cada vez mais importante entender o processo de dispersão dessas formigas, das áreas naturais perturbadas para a área urbana, e analisar o modo como isso ocorre é essencial para o controle dessa espécie.

A manutenção e a evolução das populações diante das mudanças ambientais têm por requisito indispensável a existência de variabilidade genética, ou seja, é necessário um certo grau de variação gênica em uma população para que esta possa responder adequadamente às flutuações ambientais, sejam elas bióticas e/ou abióticas (DIEHL-FLEIG, 1995).

A genética de populações é o estudo da variação herdada dentro de uma população e sua modificação no tempo e no espaço. Uma população consiste de todos os indivíduos que, ao se reproduzir uns com os outros, compartilham de um *pool* de genes, que é o total de informações genéticas possuído pelos membros da população (BURNS, 1991).

A distribuição das freqüências dos alelos e dos genótipos no espaço e no tempo determina a estrutura genética de uma população. As populações naturais, muitas vezes apresentam diferenças nas freqüências gênicas e genotípicas de uma região geográfica para outra, esta estrutura espacial da população pode ter um efeito importante sobre a evolução da espécie (DIEHL-FLEIG, 1995).

A teoria da sociobiologia proposta por WILSON (1971) propõe que o comportamento social poderia ser compreendido a partir do conhecimento da demografia e da estrutura genética das populações. Estes conhecimentos permitiriam determinar o tamanho da população, os coeficientes de parentesco dentro da sociedade e quantidade de fluxo gênico entre as populações.

A eventual variabilidade genética presente em uma população está relacionada à quantidade de variabilidade presente na população parental, tamanho da população fundadora,

taxa de crescimento intrínseco do organismo e tempo decorrido desde o início da colonização (NEI *et al.*, 1975).

Com o advento da biologia molecular, as técnicas de trabalho com DNA constituem exímias ferramentas em estudos aprofundados de genética, além de diversidade e dinâmica de populações e estudos da evolução pela capacidade de inferir dados filogenéticos (NUNES, 1999).

O desenvolvimento da tecnologia da reação em cadeia de polimerase possibilitou que inúmeras outras técnicas fossem desenvolvidas para a detecção de polimorfismos de DNA (OLIVEIRA, 1998). A análise de polimorfismos de DNA tem se mostrado particularmente útil para a caracterização genética de fontes biológicas, pois estes polimorfismos são fenotipicamente neutros e não sujeitos aos efeitos do ambiente (FAIRBANKS *et al.*, 1993).

Uma dessas técnicas tem sido muito usada em estudo de populações e foi desenvolvida independentemente por WILLIAMS *et al.* (1990) e WELSH & MACCLELLAND (1990). A técnica foi denominada de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e AP-PCR (*Arbitrary Primed-Polymerase Chain Reaction*), respectivamente, e é baseada na amplificação de segmentos genômicos múltiplos ao acaso, a partir de *primers* de sequência arbitrária (cerca de 10 pb). Os *primers* utilizados são colocados em condições de baixa estrigência tendo assim maiores chances de se ligar a várias sequências de DNA complementares. Para que haja amplificação de um fragmento RAPD no genoma analisado, duas sequências de DNA complementares ao *primer* devem estar suficientemente adjacentes (menor que 4000pb) e em orientação oposta, de maneira a permitir a amplificação exponencial de um segmento de DNA pela DNA polimerase (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

A técnica tem sido empregada para caracterizar populações, análises de pedigree, estudos filogenéticos, mapeamento genético, melhoramento de plantas e animais domésticos e na confirmação de taxonomia baseada em dados morfológicos. (VALENTINI *et al.*, 1996), além de permitir uma análise mais acurada em investigações de parentesco entre populações de uma mesma espécie ao invés de espécies menos relacionadas (GONZÁLEZ & FERRER, 1993).

A técnica de RAPD apresenta uma série de vantagens práticas: não são necessárias informações prévias sobre a sequência a ser amplificada, a quantidade de DNA utilizada é mínima, permite gerar uma grande quantidade de polimorfismo de DNA fazendo uma busca

por todo o genoma do organismo, além de ser muito eficiente em termos de baixos custos e tempo requerido (SCHIEWATER & ENDER, 1995; FERREIRA & GRATTAPALIA, 1998). Entretanto, esta técnica possui algumas limitações. O comportamento dos marcadores RAPD é de caráter dominante, ou seja, para um indivíduo homozigoto dominante para um determinado alelo, amplificam-se dois fragmentos de mesmo peso molecular, que se sobrepõem. Da mesma forma, para heterozigotos, há amplificação de apenas um alelo, com mesmo peso molecular, que será identificado como os do homozigoto. Neste caso, apenas os homozigotos recessivos podem ser diferenciados devido à não amplificação de nenhum dos alelos. A natureza dominante dos marcadores não permite a distinção de um locus em estado heterozigoto, exceto, por análise de segregação dos marcadores, em progênies. A pequena consistência de um laboratório para outro, dificulta a comparação de dados obtidos em diferentes locais e a baixa repetibilidade é outra senão a maior limitação (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Este trabalho teve por objetivos estimar a distância genética entre populações de *Camponotus atriceps* provenientes das regiões Sudeste e Centro-Oeste do país, utilizando a técnica de marcadores RAPD; e identificar os *primers* polimórficos que permitam uma rápida distinção em indivíduos de tais populações, obtendo assim um panorama geral da diversidade e similaridade inter populacional.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi desenvolvido nos Laboratórios de Genética do Comportamento e de Genética Molecular do Instituto de Genética e Bioquímica (INGEB) da Universidade Federal de Uberlândia.

Coletaram-se operárias de *Camponotus atriceps* Smith 1858, de quatro Estados (MINAS GERAIS: Uberlândia, Uberaba, Patos de Minas e Paracatu; SÃO PAULO: Franca e São José do Rio Preto, GOIÁS: Itumbiara, Rio Verde e Porangatu; RIO DE JANEIRO: Rio de Janeiro), também foi utilizada uma amostra de *Atta sexdens* como *outgroup*. As amostras foram coletadas vivas, encaminhadas ao laboratório e congeladas a - 80 °C até o momento da sua manipulação.

Antes de iniciar a extração do DNA genômico os indivíduos foram identificados através de chave de identificação (BOLTON, 1995) utilizando-se de um estereomicroscópio, marca Wild, modelo 308700. Cada população foi representada por um *pool* de oito indivíduos, para aumentar a quantidade de DNA e melhorar a caracterização da população. O protocolo de extração utilizado foi o de PAXTON *et al.* (1996) com algumas modificações (Apêndice). A gáster dos indivíduos foi retirada com o auxílio de um bisturi, por estar localizado ali o aparelho digestivo da formiga sendo assim, uma região de possível contaminação.

A qualidade do DNA foi avaliada subtraindo-se o DNA a eletroforese em gel de agarose 1%, por 1 hora a 100V para verificar se o DNA estava fragmentado ou se apresentava contaminantes.

O DNA foi quantificado por absorbância (ABS) a 260nm em espectrofotômetro HITACHI U-2000. Em seguida, suas concentrações foram calculadas pela fórmula:

$$[\text{DNA}] = \text{ABS (260)} \times 50 \times \text{Fator de Diluição}$$

As amostras de DNA foram diluídas para uma concentração de 5 ng/μl e constituíram as soluções de trabalho.

Através de uma bateria de reações foram selecionados *primers* (10 Mers, da Operon Technologies e alguns gentilmente cedidos pelo CEIS-UNESP/ Rio Claro). Assim, dos 35 *primers* testados utilizou-se de 13 *primers* informativos, ou seja, que denotaram um bom padrão de bandas pra posterior análise (Tabela 1).

TABELA 1: *Primers* utilizados, suas respectivas seqüências de nucleotídeos e características dos produtos amplificados. S= Sim, N= Não.

<i>Primers</i>	Seqüência (5' 3')	Polimorfismo
OPC 12	TGTCATCCCC	S
OPI 04	CCGCCTAGTC	S
OPI 05	TGTTCCACGG	S
OPI 09	TGGAGAGCAG	N
OPI 13	CTGGGGCTGA	N
OPI 18	TGCCCAGCCT	N
OPV 03	CTCCCTGCAA	N
OPV 05	TCCGAGAGGG	N
OPV 08	GGACGGCGTT	N
OPV 09	TGTACCCGTC	N
OPV 11	CTCGACAGAG	N
OPV 13	ACCCCCTGAA	N
OPV 14	AGATCCCGCC	N
OPV 19	GGGTGTGCAG	N
OPY 01	GTGGCATCTC	N
OPY 03	ACAGCCTGCT	S
OPY 04	GGCTGCAATG	N
OPY 06	AAGGCTCACC	S
OPY 12	AAGCCTGCGA	N
OPY 13	GGGTCTCGGT	S
OPY 14	GGTCGATCTG	N
OPY 16	GGGCCAATGT	N
OPY 17	GACGTGGTGA	N
OPY 19	TGAGGGTCCA	N
OPY 20	AGCGTTGGAA	S
OPZ 01	TCTGTGCCAC	S
OPZ 02	CCTACGGGGA	N

OPZ 03	CAGCACCGCA	N
OPZ 12	TCAACGGGAC	S
OPZ 14	TCGGACGTTC	N
OPZ 17	CCTTCCCACT	S
OPZ 19	GTGCGAGCAA	N
66 pmol		S
41 pmol		S
166 pmol		S

As amostras foram amplificadas na presença de Tris-HCl 10mM, KCl 50mM, MgCl₂ 2mM, 400 µM de dNTPs (100 µM de dGTP, 100 µM de dCTP, 100 µM de dATP e 100 µM de dTTP), 10 pmoles de *primer*, 1,0 U de Taq DNA polimerase, 20 ng de DNA genômico e água ultrapura para completar o volume de 15 µl. Em cada reação foi adicionada uma gota de óleo mineral para evitar a evaporação. As reações foram amplificadas em termociclador MJ Research, Inc. modelo PTC-100, por 3 ciclos de 94 °C/1min, 37°C/1min e 72 °C/2min; seguidos de 34 ciclos de 94 °C/10s, 40 °C/20s e 72 °C/2min; seguidos de 72°C por 5 min e 4°C por tempo indeterminado.

As reações foram realizadas em duplicata para cada *primer*, a fim de confirmar os padrões de bandas obtidos.

Os produtos amplificados foram separados em gel de agarose 1.5% e tampão Tris-Borato EDTA (TBE) 0.5X e corado com brometo de etídio que estava diluído no gel a uma concentração de 0.5 µg/ml de gel.

Foram adicionados em cada amostra (15 µl) 3 µl de tampão de carregamento (azul de bromofenol 3,61M, Xileno Cianol 4,6M, Sacarose 1,17M e EDTA 0,1M pH8.0). A eletroforese foi conduzida a 150V por 2 horas. Os resultados foram visualizados em transiluminador UV e fotografados em VDS Image System-Pharmacia.

A partir das bandas obtidas foi montada uma matriz binária (1- presença de banda e 0- ausência de banda), utilizando-se de bandas reproduzíveis e mais intensas. A matriz foi gerada com o auxílio do programa STATISTICA 5.0 (SLICE *et al.*, 1994) e foi usada para o cálculo das distâncias genéticas pelo Método de Porcentagem de Desacordo (N'_{AB} / N_T , onde N'_{AB} é o número total de bandas polimórficas entre os genótipos comparados e N_T é o número total de bandas) e análise de *cluster* pelo Método Não-Ponderado de Agrupamento aos Pares (UPGMA), o qual agrupa através de médias aritméticas, inicialmente indivíduos mais

similares e assim, sucessivamente, até os indivíduos ou grupos mais distantes (OLIVEIRA, 1998).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O protocolo de extração de DNA seguido (PAXTON *et al.*, 1996) mostrou-se eficiente e rápido para o material biológico em questão, além de não utilizar produtos tóxicos, como o fenol bastante utilizado em outros protocolos. A única modificação feita foi o uso de *pools* de oito indivíduos ao invés de um único indivíduo.

Vários trabalhos têm ressaltado a dificuldade, na análise das bandas polimórficas e monomórficas, produzidas por RAPD, visto que dois fragmentos de mesmo peso molecular, comum entre duas ou mais amostras, podem significar um alelo homólogo (herdado do ancestral) ou homoplásico (aparecimento independente na população). Assim como em outras classes de marcadores moleculares, encontra-se dificuldade na análise e interpretação das bandas geradas. Na análise de RAPD deve haver flexibilidade do pesquisador em selecionar marcadores mais informativos, ou seja, que apresentam melhor nitidez (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Neste trabalho, 35 *primers* foram testados para a análise. Um padrão variável baixo foi observado entre os indivíduos de *C. atriceps* e *Atta sexdens* quando os *primers* OPI 09, OPI 13, OPI 18, OPV 03, OPV 05, OPV 08, OPV 09, OPV 11, OPV 13, OPV 14, OPV 19, OPY 01, OPY 04, OPY 11, OPY 14, OPY 16, OPY 17, OPY 19, OPZ 02, OPZ 03, OPZ 14 e OPZ 19 foram usados. Treze dos 35 *primers* foram selecionados por gerarem um padrão de bandas adequado para a análise da diversidade genética entre os genótipos. Para cada *primer* foram realizadas duas ou mais repetições sendo computadas apenas as bandas que mostraram boa repetibilidade e intensidade. Estes cuidados na montagem da matriz reduzem a possibilidade de eventuais erros na contagem incorreta de produtos fracamente amplificados que não correspondem à verdadeira história evolutiva da espécie (LOWE *et al.*, 1996; CABRAL, 1997; OLIVEIRA, 1998). Dessa forma, pode-se verificar uma alta taxa de polimorfismo em *Camponotus atriceps* e *Atta sexdens* para cada *primer* analisado.

Os 13 *primers* selecionados geraram 105 posições de bandas informativas (Tabela 2) com tamanho variando entre 300 e 2600 pb, uma média de 8.08 posições de banda por *primer*, das quais 98 (93.3%) evidenciaram polimorfismos. Desconsiderando o *outgroup* foram detectadas 77 posições de bandas para *C. atriceps*, com 73.3% de polimorfismo.

TABELA 2: Relação do número de bandas amplificadas (polimórficas e monomórficas) por *primer* para a população de *C. atriceps*.

<i>Primer</i>	Polimórficas	Monomórficas	Total
166pmol	6	0	6
41pmol	7	0	7
66pmol	6	1	7
OPC 12	8	5	13
OPI 04	3	5	8
OPI 05	7	0	7
OPY 03	6	7	13
OPY 06	3	3	6
OPY 13	8	1	9
OPY 20	0	1	1
OPZ 01	12	1	13
OPZ 12	6	2	8
OPZ 17	5	2	7
TOTAL	77 (73.3%)	28 (26.7%)	105

A análise de agrupamentos fornecida pelas 105 posições de bandas revelou a distância genética entre as populações estudadas (Figura 1). A análise de *cluster* é o método padrão para estudo de relações de parentesco entre indivíduos (WILKIE *et al.*, 1993).

Ao nível de 40% de divergência, as amostras de *C. atriceps* foram divididas em dois grupos distintos. O primeiro grupo, com distância genética variando de 14% a 24% foi constituído de seis genótipos, sendo Uberlândia, Paracatu, Patos de Minas, Franca, Rio de Janeiro e Porangatu, enquanto que o segundo grupo, com distância genética variando de 22%

a 34% ficou representado por cinco genótipos: Uberaba, São José do Rio Preto, Iturama, Itumbiara e Rio Verde.

FUTUYMA (1992) diz que quanto menor o fluxo gênico entre as populações mais diferenças poderão ser adquiridas ao longo do tempo evolutivo.

No grupo 1 de *C. atriceps* o genótipo mais distante foi o de Porangatu (0.245) apresentando-se como grupo irmão de todos os outros genótipos. O grupo 2 foi separado em outros dois no limite de 0.346 de dissimilaridade genética e Rio Verde foi o genótipo mais distante, sendo essa amostra a única a ser coletada em uma edificação rural ao contrário das demais que foram todas coletadas em áreas urbanas. A menor distância entre os genótipos do grupo 2 foi apresentada entre Iturama e Itumbiara (0.222) e a menor distância do grupo 1 foi entre Franca e Rio de Janeiro (0.141). *Atta sexdens* divergiu em 57% das amostras de *C. atriceps*, este grau de distância genética talvez poderia ser aumentado com uso de *primers* longos que separam *clusters* mais altos, considerando que essas espécies pertencem à sub-famílias diferentes (OLIVEIRA, 1998).

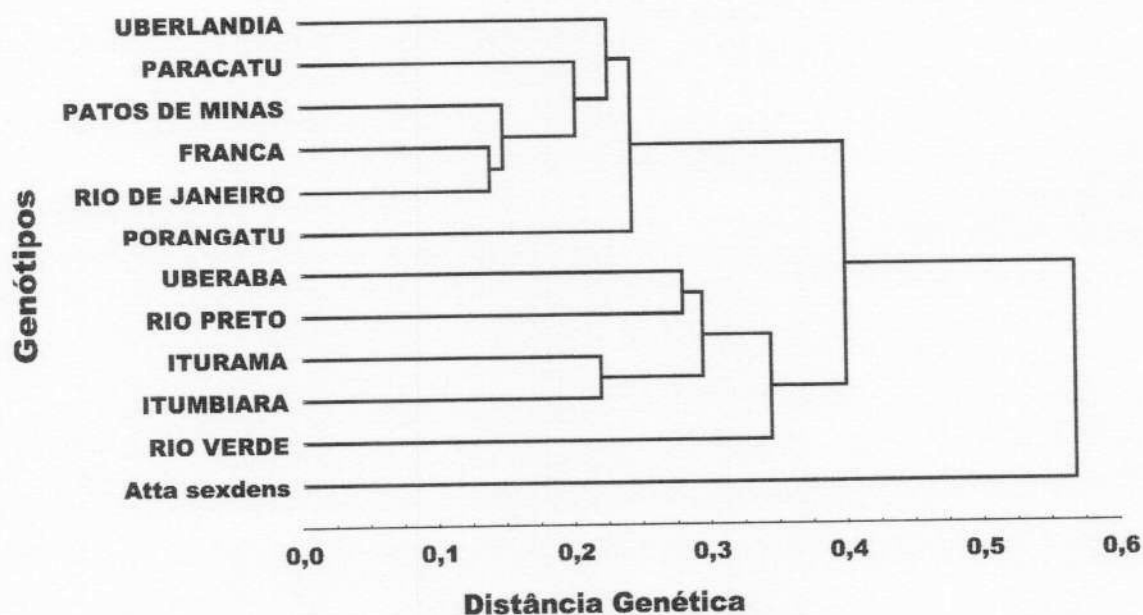


Figura 1: Dendrograma representativo da distância genética por porcentagem de desacordo e agrupamento pelo método de UPMGA entre os 12 genótipos (11 de *Camponotus atriceps* e 1 de *Atta sexdens*) por meio de 105 marcadores RAPD obtidos por 13 *primers*.

CHALMERS *et al.* (1992) afirmam que RAPD é uma ótima ferramenta para detectar diversidade máxima e pode ser usada para estimar níveis de variabilidade genética em populações. A variabilidade genética é importante à adaptação e a processos de especiação e dependendo da amplitude, denota oportunidade para alterações evolutivas (DOBZHANSKY *et al.*, 1977 *apud* FALCÃO, 1984).

Na Figura 2 podemos evidenciar um alto polimorfismo genético gerado pelo padrão de posições de bandas resultado da amplificação das 11 amostras de populações de *C. atriceps* e 1 amostra de população de *Atta sexdens* por meio do *primer* OPZ 01. Para este *primer* foram analisadas 13 posições de bandas de forte intensidade.

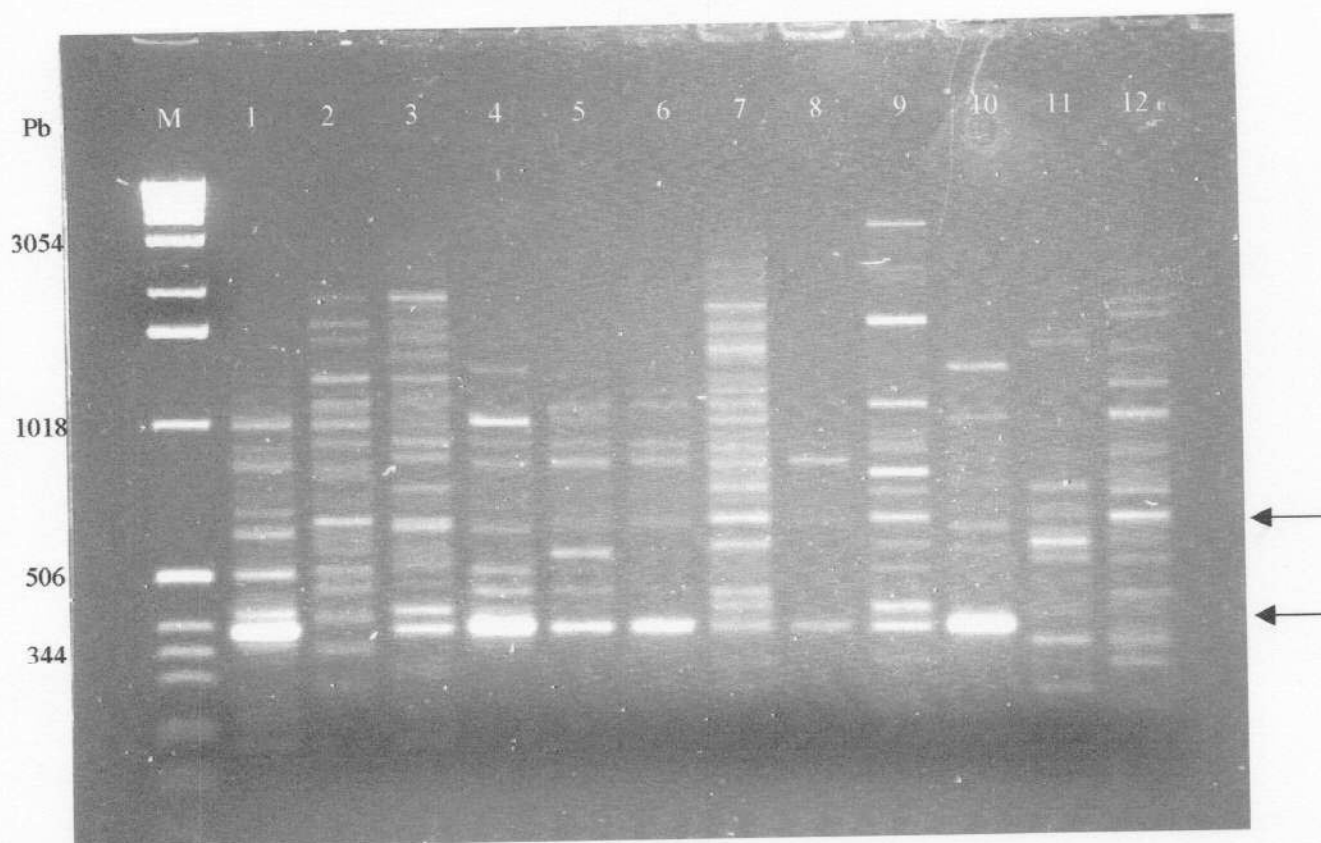


Figura 2: Perfil eletroforético dos produtos amplificados utilizando o *primer* OPZ 01- M (marcador de 1 kb), 1 (Uberlândia), 2 (Uberaba), 3 (Iturama), 4 (Paracatu), 5 (Patos de Minas), 6 (Franca), 7 (São José do Rio Preto), 8 (Rio de Janeiro), 9 (Itumbiara), 10 (Porangatu), 11 (Rio Verde), 12 (*Atta sexdens*). Setas indicam exemplos de polimorfismos.

Geralmente quanto mais distanciadas estão as populações, mais divergentes elas são em frequências alélicas e nas características fenotípicas de base genética, embora não haja, freqüentemente correlação estrita entre ambos (FUTUYMA, 1992; OLIVEIRA, 1998).

Aparentemente não foi encontrada nenhuma correlação geográfica entre as populações estudadas, o que poderia ser explicado provavelmente pela grande variabilidade genética da espécie devido às características como a poliginia (mais de uma rainha fisogástrica na colônia), o alto grau de polimorfismo e a possível ocorrência de poliandria (as rainhas copulam com mais de um macho). Além de apresentar um alto fluxo gênico por ser uma espécie facilmente dispersa e transportada pelo homem de um lugar para outro (BERNDT & EICHLER, 1987).

Foi sugerido por HOLLOBLER & WILSON (1977) que, nas formigas a poliginia estaria associada com ambientes de curta duração ou com ambientes estáveis, porém em habitats distribuídos irregularmente (como as áreas urbanas).

PAMILO *et al.* (1978) estudando a variabilidade isoenzimática em espécies de *Formica* obtiveram resultados indicando interação genótipo-ambiente encontrando menor variabilidade genética nas espécies que constroem ninhos mais estáveis e permanentes. A variação genética dentro dos ninhos apresentou-se correlacionada com o grau de poliginia nas espécies que nidificam no solo, o mesmo não ocorrendo com as espécies que constroem montes. No entanto, PAMILO (1982 a, b) sugeriu que a evolução e a manutenção da poliginia dependeriam tanto da estrutura genética quanto das circunstâncias ecológicas. *Camponotus atriceps* (carpinteiras) é uma espécie poliginica, que nidifica em áreas urbanas e que constrói ninhos instáveis e não permanentes, o que poderia sugerir de acordo com o autor citado acima uma maior variabilidade genética, como o comprovado pelo uso de marcadores RAPD.

Quando a variabilidade genética é pequena, a baixa similaridade entre as populações pode estar indicando o efeito do fundador ou da deriva, enquanto que a alta similaridade pode sugerir homogeneidade ambiental e pressões seletivas uniformes como responsáveis pela baixa variabilidade. Paralelamente, se a diversidade gênica já era baixa na população original, é esperada uma alta similaridade entre as populações (PAMILO *et al.*, 1978). Por sua vez, quando a variabilidade é alta, a baixa similaridade pode sugerir tanto efeitos estocásticos quanto seletivos, embora neste último caso espere-se um padrão de distribuição geográfica e/ou correlações específicas entre ambiente e frequência gênica.

A alta variabilidade genética encontrada entre as populações de *C. atriceps* neste trabalho, bem como a ausência de um padrão geográfico, parece sugerir apenas efeitos decorrentes da necessidade de adaptação ao dinâmico ambiente urbano em que essas se encontram.

A rapidez dos marcadores RAPD em monitorar grandes populações, a quantidade ilimitada de loci polimórficos encontrados e a pequena quantidade de material biológico exigida, faz com que os marcadores RAPD sejam preferidos em estudos de populações

(KAMBHAMPATI, *et al.* 1992; CHAPCO *et al.* 1992; LU & HANK, 1996; OLIVEIRA, 1998). Estas justificativas são de extrema importância ao considerar a enorme plasticidade existente em *Camponotus* e o ritmo acelerado de devastação do seu ambiente natural.

4.CONCLUSÕES

A técnica de marcadores RAPD mostrou-se eficiente para estimar divergência genética entre as populações de *C. atriceps* e destas com *Atta sexdens*.

Este trabalho abriu horizontes para novos trabalhos sobre o tema como:

- fazer estudos sobre a variabilidade genética em cada ponto de coleta, utilizando amostras de colônias distintas e das mesmas colônias a fim de se comparar os dados obtidos com este trabalho.
- fazer um estudo mais detalhado em uma área restrita para se comparar o efeito das distâncias geográficas com as distâncias genéticas.
- fazer estudos sobre a diferenciação genética e comportamental encontrada entre as formigas de áreas urbanas e de áreas naturais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERNDT, K. P. & EICHLER, W. D., 1987, Die Pharaoameise, *Monomorium pharaonis* (L.) (Hym., Myrmicinae). *Mitt. Zool. Berl.* 63(1): 3-186.
- BOLTON, B., 1995, *A new general catalogue of ants of the world*. Harvard University Press Cambridge London. England, 504p.
- BUENO, O. C., 1998, Formigas Urbanas: Comportamento das espécies que invadem as cidades brasileiras. *Vetores & Pragas: Ano I*, 12:13-16.
- BURNS, G. W. & BOTTINO, P. J., 1991, *Genética*. Rio de Janeiro, 299p.
- CABRAL, T. A. T., 1997. *Divergência genética entre os genótipos de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) estimada por análise de marcadores RAPD*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG.
- CHALMERS, K. J., WAUGH, R., SPRENT, J. I., SIMONS, A. J. & POWELL, W., 1992, Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculata* using RAPD markers. *Heredity* 69:465-472.
- CHAPCO, W., ASHTON, N. W., MARTEL, R. K. B., ANTONISHYN, N. & CROSBY, W. L., 1992, A feasibility study of the use of random amplified polymorphic DNA in the population genetics and systematics of grasshoppers. *Genome* 35:569-574.

- DIEHL-FLEIG, E., 1995, *Formigas: organização social e ecologia comportamental*. São Leopoldo. Editora Unisinos, 168p.
- FALCÃO, T. M. M. A., 1984, *Polimorfismos protéicos em populações naturais de abelhas brasileiras*. Dissertação de Doutorado. FMRP/USP, Ribeirão Preto-SP.
- FAIRBANKS, D. J., WALDRIGUES, A., RUAS, C. F., RUAS, P. M., MAUGHAN, P. J., ROBINSON, L. R., ANDERSEN, W. R., RIEDE, C. R., PAULEY, C. S., CAETANO, L. G., ARANES, M. N., FUNGARO, M. H. P., VIDOTTO, M. C. & JANKEVICIUS, S. E., 1993, Efficient characterization of biological diversity using field DNA extration and random amplified polymorphic DNA markers. *Rev. Brasil. Genet.* 16(1): 22.
- FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D., 1998, *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética 3ª ed.* Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 220p.
- FUTUYMA, D. J., 1992, *Biologia Evolutiva*. Trad. Mario de Vivo e Fábio M. Sene, 2ª.ed., Ribeirão Preto-SP, Soc. Bras. de Genética/ CNPq, 646p.
- GONZÁLEZ, J. M & FERRER, E., 1993, Random Amplified Polymorphic DNA analysis in *Hordeum* species. *Genome* 36: 1029-1031.
- HOLLDÖBLER, B. & WILSON, E. O., 1977, The number of queens: An important trait in ant evolution. *Naturwissenschaften* 64:8-15.
- KAMBHAMPATI, S., BLACK, W. C & RAI, K. S., 1992, Random amplified polymorphic DNA of mosquito species and populations (Diptera: Culicidae) techniques, statistical analysis, and applications. *J. Med. Entomol.* 29(6):939-945.
- KLEIN-LANKHORST, R. M., VERMUT, A., WEID. R. , LIHARSKA, T. & ZUBEL, P., 1991, Isolation of molecular markers for tomato (*L. esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPDs). *Theor. Appl. Genet.* 81:101-108.

- LOWE, A. J., HANOTTE, O. & GUARINO, L., 1996, Standardization of molecular genetic technique for the characterization of germplasm collections: The case of random amplified polymorphic DNA (RAPD). *FAO*, p.50-54.
- LU, R. & RANK, G. H., 1996, Use of RAPD analyses to estimate population genetic parameters in the alfafa leaf-cutting bee, *Megachile rotundata*. *Genome* 39:655-663.
- MARCOLINO, M. T., 1999, *Estudos Genéticos e Comportamentais de Formigas Carpinteiras Camponotus atriceps Smith (Hymenoptera, Formicidae)*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG.
- NEI, M., MARUYAMA, T. & CHAKRABORTY, R., 1975, The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* 29:1-10.
- NUNES, F. M. F., 1999, *Divergência Genética Interpopulacional em Tetragonisca angustula Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)*. Monografia para a obtenção do grau de Bacharel, Centro de Ciências Biomédicas, Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia –MG.
- OLIVEIRA, R. C., 1998, *Divergência Genética por marcadores RAPD em Tetragonisca angustula Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG.
- PAMILO, P., ROSENGREN, R., VEPSALAINEN, K., VARVIO-AHO, S. L. & PISARSKI, B., 1978, Population genetics of *Formica* ants. I Patterns of enzyme gene variation. *Hereditas* 89:233-248.
- PAMILO, P., 1982a, Genetic evolution of sex ratios in eusocial Hymenoptera: allele frequency simulations. *The American Naturalist* 119(5): 638-656.
- PAMILO, P., 1982b, Genetic population structure in polygynous *Formica* ants. *Heredity* 48(1):95-106.

- PAXTON, R. J., THREN, P. A., TENGO, J., ESTOUPA, P. A. & PAMILO, P., 1996, Mating structure and nestmate relatedness in a communal bee, *Adrena jacobae* (Hymenoptera: Adrenidae) using microsatellite. *Molecular Ecology* 5:511-519.
- SCHIERWATER, B. & ENDER, A., 1995, Different thermostable DNA polymerase may amplify different RAPD products. *Nucl. Acid. Res.* 21:4647-4648.
- SLICE, D. E.; KIM, J.; WALKER, J., 1994, Ntsys- Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System: versão 1.80 [S.l.]: [s.n]. Não paginado.
- VALENTINI, A., TIMPERIO, A. M., CAPPUCCIO, I. & ZOLLA, L., 1996, Random amplified polymorphic DNA (RAPD) interpretation requires a sensitive method for the detection of amplified DNA. *Electrophoresis* 17:155-1554.
- WELSH, J. & MACCLELLAND, M., 1990, Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acid. Res.* 18:7213-7218.
- WILKIE, S. E., ISAAC, P. G. & SLATER, R. J., 1993, Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. *Theor. Appl. Genet.* 86:497-504.
- WILLIAMS, J. G. K., KUBELIK, A. R., LIVAK, K. J., RAFALSKI, J. A. & TINGEY, S. V., 1990, DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acid. Res.* 18:6531-6535.
- WILSON, E. O., 1971, *The insects societies*. Belknap Press of Harvard Univ. Press. Cambridge, Mass, 548p.
- WILSON, E. O., 1987, Causes of ecological success: the case of the ants. *J. Anim. Ecol.* 56:1-9.
- WILSON, E. O., 2000, *Sociobiology, The New Synthesis*. Belknap Press of Harvard Univ. Press. Cambridge, Mass, 697p.

APÊNDICE

1. Oito formigas foram colocadas em cadinhos de porcelana, adicionando-se nitrogênio líquido e maceradas em seguida;
2. Adicionou-se 500 µl de Tampão SET (NaCl 0.15M, Tris-HCl 0.02M, EDTA 1mM pH 8.0), transferindo o material para um microtubo estéril de 1.5 ml;
3. Adicionou-se em cada microtubo 18 µl de proteinase K (10 mg/ml) e 22 µl de SDS 25%, homogeneizando a solução em vórtex e incubando-a por 2h a 55 °C;
4. Adicionou-se 430 µl de NaCl 6M por microtubo, centrifugando o material por 10 min a 13000rpm;
5. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1.5 ml adicionando 215 µl de Tris-HCl (0.01M pH 8.0);
6. Completou-se o volume dos microtubos com etanol 99.5% gelado (-20 °C), estocando o material em freezer - 20 °C *overnight*;
7. Centrifugou-se os microtubos por 15 min a 13000rpm, retirando-se em seguida o etanol 99.5% e acrescentando-se 500 µl de etanol 70% gelado (-20°C), invertendo-se os microtubos para lavar bem o *pellet* e centrifugando-se por 10 min a 13000rpm;
8. Retirou-se o etanol 70% com cuidado para não deslocar o *pellet*, deixando o material secar a vácuo ou estufa a 37 °C;
9. Ressuspendeu-se o *pellet* em 100 µl de Tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM).