
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

**ANÁLISES MOLECULARES E DA PRESENÇA DE
ENDOBACTÉRIAS DE *Camponotus textor* FOREL, 1899
(HYMENOPTERA, FORMICIDAE).**

Manuela de Oliveira Ramalho

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas - Biologia Celular e Molecular

Rio Claro
2013

Manuela de Oliveira Ramalho

**ANÁLISES MOLECULARES E DA PRESENÇA DE
ENDOBACTÉRIAS DE *Camponotus textor* FOREL, 1899
(HYMENOPTERA, FORMICIDAE).**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Orientador: Odair Correa Bueno

Co-orientador: Vanderlei Geraldo Martins

Rio Claro
2013

Dedico este trabalho ao meu Avô Amadeu Ramalho que faleceu recentemente. Sua inteligência e genialidade ultrapassaram todas as barreiras impostas pela vida, tornando o maior exemplo de bondade e felicidade que tive oportunidade de conhecer!

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, por me dar forças, saúde e ter colocado pessoas maravilhosas na minha vida, pois sem elas, eu não teria chegado a lugar algum.

Agradeço aos meus pais (Ana e Zé Ramalho), minha sogra (Roselei), minha irmã (Marília) e meu cunhado (Sonic) pelo apoio incondicional, mesmo não entendendo muito que eu faço, sempre acreditaram em mim. Aos meus familiares Tio Rê e Paty, por despertar-me o interesse por esta profissão maravilhosa e por terem feito o Pedrinho (meu priminho amado). À minha vó Nadir (FIDIDA), que sempre ficou ao meu lado.

Ao querido orientador e amigo professor Odair, que sempre me auxiliou com muita paciência e carinho e co-orientador Vanderlei por toda ajuda e disposição!

Às amigas do LABIS Catarina e Cintia que sempre trabalharam de bom humor e facilitaram muito a minha vida! Agradeço também pela paciência e disponibilidade pra dividirmos a Thermo e pelas inúmeras discussões acadêmicas (e outras Tb rs) que obtivemos nestes anos.

As amigas do (Lab LEM) Cynara, Carol e Milene por toda ajuda e carinho dedicados nestes anos! A ajuda para desenhar os primers, clonagens, e bioinformática foram fundamentais para a elaboração deste trabalho. Aprendi demais com vocês, garotas!! Muito obrigada mesmo!

Ao CEIS e funcionários, sem o café forte de todos os dias esse trabalho não teria acontecido. Aos companheiros de trabalho Marcela, Ita, Necis, e mais muita gente..., Muito Obrigada!

À minha companheira de TODAS as horas Pâmela (Keka) por todas as aventuras que vivemos. Desde início sempre uma ao lado da outra, e agora espero esta parceria também como minha madrinha de casamento!!

Aos professores da Unesp de Rio Claro por toda dedicação.

Aos companheiros de Pós- graduação... BioCelMol é pura MAGYA! rs

A todo pessoal que me ajudou nas coletas, em especial aos professores Kleber Del-Claro e Jacques Delabie pela disposição.

Gostaria também de dedicar um agradecimento especial às minhas cachorrinhas Luppy e Bibi que sempre fazem festa quando eu chego! AMO DEMAIS VCS!! 😊

À parceira e amiga (futura madrinha tb) Monizze por dividimos a casa e as tarefas nestes anos. Muito obrigada por tudo mesmo! Nossas conversas e brejas me fizeram muito bem.. rs

Aos companheiros de sala CBN 2006...os “mediócras” que sobraram Monizze, Pâmela, Gisele, Eli, Dom, Cazuzza, Nati, Van! rs Nossas TQABs foram fundamentais pra minha sobrevivência!!! Ninguém no mundo fofoca tão bem quanto nós!!! Amo vcs, queridos!! TQAB forever!!!

Ao Pantoja e tio patinhas que fizeram meu dinheiro render fazendo um ótimo preço da cerveja nestes anos (mais barato que a Dona Ana)!!

Aos amigos de Campinas Jholl, Horse, Pablo, Laurence, Tata, Joice, Cebola, Karla, Digo, Andressa, Nenê da Andressa e do Pablo, Simone, Vó Elza, Maria Clara, Melissa, Vitor Hugo, Gi, Tito, Marivane, Valdi, Giovanna, Bruno, Angélica, Arthur, Kats, Oda e Ângela por me esperarem chegar de final de semana. =)

À Débora, sempre ela, por toda amizade desde nossos três anos. Você é mais do que uma irmã pra mim... pode estar em Natal, ou em DUBAI...pra mim você sempre estará no meu coração (e tb na janela do Bloco B 11, rs)!

Ao CNPq e Capes, pelo apoio financeiro.

E finalmente ao meu grande amigo, noivo e, futuro marido (Tá chegando!! Rs) Marcelo - Parsa que me aguenta todos os dias e mesmo assim me ama muito! Muito obrigada por todo amor, apoio e paciência. Sou muito feliz de ter você e toda sua família na minha vida! Uma vida é pouco pra aproveitar toda a felicidade de vc me faz sentir! Te amo MAIS QUE TUDO!! Você é minha VIDA! “Te amo, beijos e tchau tchau”!! rs

“Todos querem uma solução mágica para tudo,
mas todos recusam-se a acreditar na magia.”

Chapeleiro Maluco

Resumo

A formiga *Camponotus textor* é uma espécie tecelã, que constrói seu ninho a partir da seda produzida pelas suas próprias larvas. Existem poucos estudos sobre esta espécie e estes acabam abordando comportamento, genética, endossimbiontes e filogenia. De acordo com dados da literatura, o sequenciamento do gene citocromo oxidase I tem sido extensamente utilizado como um DNA barcoding na diferenciação e identificação de espécies, e o citocromo oxidase II é um dos mais utilizados para estudos em insetos. Relatos de ocorrências de endobactérias são comuns em artrópodes e vem sendo muito estudadas em formigas. Dentre elas, pode se destacar a *Blochmannia* e a *Wolbachia*. Sendo assim, o presente trabalho realizou o sequenciamento fragmento COI, tRNA, COII do DNA mitocondrial de colônias distintas de *Camponotus textor* para ser utilizado como marcador molecular, tornando-se uma ferramenta para determinação das relações filogenéticas entre estas colônias e espécies relacionadas. A análise de correlação de Pearson entre distância genética e a geográfica indicou que existe uma relação - maior distância geográfica- maior distância genética, caracterizando um padrão filogenético de colonização antiga. A análise filogenética das colônias (máxima parcimônia e baesiana) e a rede de haplótipos confirmaram a existência dessa correlação. Também ficou evidenciada uma grande diversidade de haplótipos mitocondriais, a qual podem ter ocorrido também pela alta incidência de infecção por *Wolbachia*. Na investigação da presença e da frequência das endobactérias *Wolbachia* e *Blochmannia* das colônias de *C. textor*, utilizaram-se os pares de primers do MLST, mais o *wsp* como um marcador adicional (para *Wolbachia*), e os primers Bloch 16S-462F e Bloch 16S-1299R (para evidenciar a *Blochmannia*). Como ficaram evidentes múltiplas infecções de *Blochmannia*, foi necessária a clonagem para o isolamento das cepas. Todos os indivíduos analisados apresentaram infecção por *Blochmannia*; e além desse endossimbionte também foi detectado o *Candidatus Sodalis melophagi*, porém novos estudos são necessários para compreender essa relação de simbiose. A análise de *Wolbachia* permitiu a incorporação de uma cepa inédita ao banco de dados pertencente ao supergrupo A. Segundo os resultados obtidos, a forma de dispersão da *Wolbachia* e da *Blochmannia* dentro do hospedeiro pode ter ocorrido tanto verticalmente como horizontalmente.

Palavras- chave: *Wolbachia*. *Blochmannia*. Formiga-tecelã. Barcode.

Abstract

The ant *Camponotus textor* is a weaver species, which builds its nest from the silk produced by their own larvae. There are few studies on this species addressing behavior, genetics, phylogeny and endosymbionts. According to literature data, the sequencing of the cytochrome oxidase I gene has been widely used as a DNA barcoding in the differentiation and identification of species, and cytochrome oxidase II is one of the most widely used for studies on insects. Reports endobactérias occurrences are common in arthropods and has been extensively studied in ants. Among them, we can highlight the *Blochmannia*, and *Wolbachia*. Thus, this paper carried out the sequencing fragment COI, tRNA, COII mitochondrial DNA from different colonies of *Camponotus textor* to be used as a molecular marker, becoming a tool for determining the phylogenetic relationships between these colonies and related species. The Pearson correlation analysis of genetic distance and geographical entity has indicated that there is a relation - greater geographic distance-largest genetic distance, featuring a standard phylogenetic old colonization. Phylogenetic analysis of the colonies (maximum parsimony and bayseana) network and haplotype confirmed the existence of this correlation. It was also shown a great diversity of mitochondrial haplotypes, which may have occurred due to the high incidence of *Wolbachia* infection. In investigating the presence and frequency of *Wolbachia* and endobactérias *Blochmannia* colonies of *C. textor*, we used the primer pairs of MLST, the more *wsp* as an additional marker (for *Wolbachia*), and primers 462F and Bloch 16S-16S Bloch-1299R (to show the *Blochmannia*). As became evident *Blochmannia* multiple infections, cloning was necessary for the isolation of the strains. All individuals analyzed presented *Blochmannia* infection, and beyond that was also detected the endosymbiont *Candidatus Sodalís melophagi*, but further studies are needed to understand this symbiotic relationship. *Wolbachia* analysis allowed the incorporation of a novel strain belonging to the database to supergroup A. According to the results, the form of dispersion *Wolbachia* and *Blochmannia* within the host may have occurred both vertically and horizontally.

Keys Word: *Wolbachia*. *Blochmannia*. Weaver-ant. Barcode.

Sumário

	Página
Introdução.....	10
Objetivos.....	17
Apresentação.....	18
Referências Bibliográficas.....	19
Artigo 1.....	25
Caracterização molecular parcial dos genes mitocondriais COI e COII de <i>Camponotus textor</i> Forel, 1899 (Hymenoptera, Formicidae).....	26
Resumo.....	26
Introdução.....	28
Objetivos.....	30
Material e Métodos.....	30
Coletas e identificação.....	30
Extração do DNA Total, Amplificação e Sequenciamento.....	32
Análises das Sequências.....	34
Resultados.....	36
Caracterização dos <i>Loci</i> COI, IGS, tRNA-Leu, e COII.....	36
Correlação entre as distâncias genética e geográfica.....	37
Análise Baesiana e Máxima Parcimônia.....	37
Network dos haplótipos.....	38
Análise do sinal filogenético.....	39
Discussão.....	40
Conclusão.....	45
Referências Bibliográficas.....	46
Artigo 2.....	50
Presença e distribuição dos endossimbiontes <i>Wolbachia</i> e <i>Blochmannia</i> em colônias de <i>Camponotus textor</i> Forel, 1899 (Hymenoptera, Formicidae).....	51
Resumo.....	51
Introdução.....	53
Objetivos.....	59
Material e Métodos.....	59
Coletas e Identificação.....	59
Extração do DNA Total, Amplificação e Sequenciamento.....	61
Primers para a identificação de <i>Wolbachia</i>	62
Primers para a identificação de <i>Blochmannia</i>	63
Análises das Sequências MLST- <i>Wolbachia</i>	63
Bioinformática MLST- <i>Wolbachia</i>	64
Análises das Sequências de <i>Blochmannia</i>	64
Clonagem <i>Blochmannia</i>	64
Bioinformática <i>Blochmannia</i>	65
Resultados.....	65
<i>Wolbachia</i>	65
Identificação <i>Wolbachia</i>	66
<i>Wolbachia</i> Máxima Parcimônia.....	68
Rede de Haplótipos <i>Wolbachia</i>	70
Sinal Filogenético <i>Wolbachia</i>	71
<i>Blochmannia</i>	71
Identificação <i>Blochmannia</i>	72

Sumário (Continuação)

Rede de Haplótipos – intraespecífico.....	72
Máxima Parcimônia interespecífica comparando Citocromo	
Oxidase subunidade 1 (COI) o e <i>Blochmannia</i>	76
Sinal Filogenético Intraespecífico.....	78
Discussão.....	79
<i>Wolbachia</i>	79
<i>Blochmannia</i>	82
Conclusão.....	86
Referências Bibliográficas.....	87
Considerações gerais.....	98

Introdução Geral

As formigas constituem um terço da biomassa dos insetos das florestas tropicais úmidas da América do Sul e pertencem a uma única família Formicidae da ordem Hymenoptera. Existem cerca de 20.000 espécies de formigas, as quais são distribuídas em ramificações evolutivas com grande sucesso ecológico. Isto deve-se ao fato de ser o primeiro grupo de predador social explorando o solo e a vegetação. A grande diversidade do grupo implica nas várias formas de nidificação, preferências alimentares e comportamento social com divisão de trabalho (WILSON, 1987; HÖLLDOLBLER; WILSON, 1990).

A interação das formigas com as plantas pode se dar de diferentes maneiras. Elas podem atuar como dispersoras de sementes, polinizadoras, herbívoras, além de utilizá-las como hospedeiras para a nidificação, como é o caso das formigas tecelãs, as quais constroem seus ninhos preferencialmente sobre a vegetação arbórea (HÖLLDOLBLER; WILSON, 1990).

As formigas tecelãs constroem seu ninho a partir da seda que é produzida pelas suas próprias larvas junto com galhos e folhas, e esta forma de construção é um dos mais notáveis exemplos de cooperação social em animais. Esse comportamento é observado em 15 espécies de três diferentes gêneros: *Oecophylla*, *Polyrhachis* e *Camponotus (Karavaievia)*, das regiões Paleotropicals e Australianas e dois da região Neotropical, *Dendromyrmex* e *Camponotus (Myrmobrachys)* (HÖLLDOLBLER; WILSON, 1990).

O gênero *Camponotus* (Mayr) compreende cerca de 2.111 táxons (BOLTON et al., 2006) e são conhecidas como formigas carpinteiras, podendo causar danos econômicos ao homem atacando, por exemplo, colônias de abelhas (AKRE; HANSEN, 1990). São comuns nos cerrados brasileiros e podem beneficiar as plantas através da predação dos herbívoros (DEL-CLARO; BERTO; RÉU, 1996).

O presente trabalho aborda um estudo sobre espécie *Camponotus textor* a qual é uma formiga tecelã comum em matas da América Central e a do Sul (desde a Costa Rica até a região sudeste do Brasil). Embora sejam

abundantes, existem poucos estudos sobre esta espécie no Brasil. Em geral, os estudos existentes sobre *C. textor* descrevem o comportamento de tecelagem e a construção de ninhos (SCHREMMER, 1979).

Santos e Del-Claro em 2009 abordaram vários aspectos no comportamento e ecologia dessa formiga evidenciando que *C. textor*, assim como outras tecelãs, utiliza grande parte do tempo na construção e manutenção de seus ninhos; porém, realiza maior investimento nessa atividade do que as demais formigas tecelãs. O fato de serem poligínicas e possuir abundância no número de operárias indica que o ninho pode se fragmentar em ninhos satélites como estratégia de defesa, minimizando a taxa de mortalidade causada por fatores bióticos e abióticos (SANTOS; DEL-CLARO, 2009). Outro trabalho também foi realizado com a *C. textor* descrevendo as larvas de operárias através do microscópio eletrônico de varredura (SOLIS et al., 2009).

Estudos recentes revelaram que as larvas produzem seda apenas no último instar. Esta seda é utilizada tanto para a construção do ninho, como do próprio casulo da pupa. Nesse último evento, a larva não se alimenta mais de dieta sólida, indicando que a necessidade energética para a metamorfose já foi estocada. Com auxílio do microscópio eletrônico de varredura foi possível uma melhor visualização de características morfológicas, desta maneira, foi evidenciado que a espécie em questão é polimórfica, diferente do que foi proposto por Wheeler em 1915 (ZARA; BUTION; CAETANO, 2010).

Com exceção desses estudos, não há na literatura dados consistentes sobre hábitos alimentares, biologia e ecologia comportamental deste grupo, que pode trazer vantagens para o homem, ao atuar no controle de pragas, uma vez que pode nidificar no cafeeiro (*Coffea arabica*), não permitindo assim o estabelecimento de diversas outras pragas, e principalmente a broca (*Hypothenemus hampei* – Coleoptera: Scolytidae) (PHILPOTT, 2005).

Quanto à nomenclatura, o catálogo elaborado por Kempf (1972) cita *Camponotus senex textor* duas vezes: uma descrita por Forel em 1899 com distribuição da Costa Rica até o Brasil (PA), e outra de variação *ruficylpeus* descrita por Emery em 1920, também com distribuição no Brasil. Bolton em 1995 cita como nome válido *Camponotus senex textor*, já Bolton em 2006 se

refere a duas subespécies: *Camponotus (Myrmobrachys) senex senex* (Smith, F., 1858) com distribuição do Brasil ao México e *Camponotus (Myrmobrachys) senex textor* (Forel, 1899) com ocorrência na Costa Rica.

Mackay (observações não publicadas) cita que *Camponotus senex* vem sendo identificada erroneamente baseada em caracteres morfológicos e sugere a distribuição representada na Figura 1. Uma vez que se ignora a variação com base no tamanho das operárias e na cor, torna-se claro que existe apenas uma espécie em questão. Assim, *Camponotus (Myrmobrachys) senex textor*, variação *ruficylpeus* Emery, 1920 é tida como um sinônimo de *Camponotus senex*.

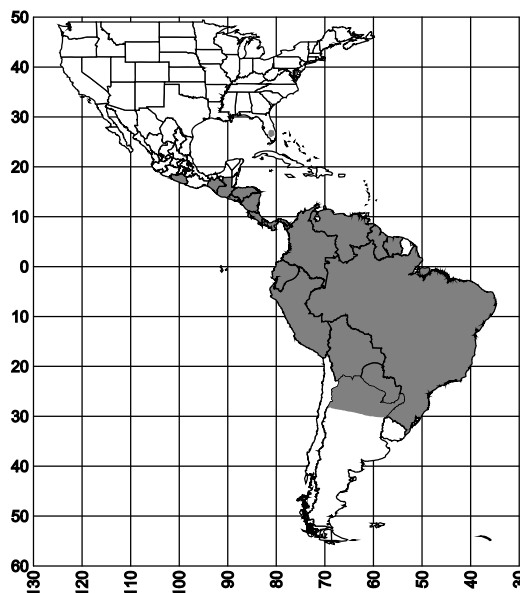


Figura 1- Mapa de distribuição de *Camponotus senex* elaborado por Mackay (observação não publicadas). Note que a região cinza representa a distribuição da espécie.

Por sua vez, Longino (2006) revisou alguns táxons de formigas e formalmente separou *Camponotus senex textor* em *Camponotus senex* e *Camponotus textor* uma vez que a primeira não foi confirmada como sendo formiga tecelã, mas sim, uma oportunista moradora em cavidades. Portanto, a formiga tecelã em questão encontrada no Brasil é a *Camponotus textor*.

Com o avanço das técnicas de biotecnologia (Reação em Cadeia da Polimerase -PCR e Sequenciamento de DNA) e ainda a síntese de primers universais foi possível a análise de fragmento de DNA mitocondrial para muitas

espécies ainda desconhecidas quanto às características moleculares, permitindo assim inferências filogenéticas (PALUMBI, 1996).

Marcadores mitocondriais são populares entre os geneticistas, em parte por causa do seu uso na identificação de espécies (BENZIE et al., 2002). Mesmo tendo dimensões mínimas perto do genoma nuclear, o DNA mitocondrial não é de difícil manipulação, pois possui um grande número de cópias. Assim, estes DNA têm sido utilizados extensivamente como ferramenta desde que se tornou viável na década de 70, em estudos evolutivos, fluxos gênicos, estudos de biogeografia e relações filogenéticas (MORITZ; DOWLING; BROWN, 1987).

Como decorrência da fecundação, os genes mitocondriais são herdados maternalmente e são transmitidos para as gerações sucessivas, sem ocorrência de mecanismos de recombinação. A herança paterna de genes mitocondriais, entretanto, ainda que em pequenas porções, pode ocorrer, conforme já constatado em mamíferos, inclusive no homem (SCHWARTZ; VISSING, 2002).

Estudos de espécies de vertebrados geralmente tem mostrado que sequências divergentes se acumulam mais rapidamente no DNA mitocondrial do que no DNA nuclear (BROWN, 1985). Tal fato é atribuído às rápidas taxas de mutação no DNA mitocondrial (mtDNA) que podem ser resultado da baixa eficiência do mecanismo de reparo durante a replicação (WILSON et al., 1985) e do menor tamanho efetivo da população devido à herança maternal do genoma mitocondrial haplóide (BIRKY et al., 1989).

O genoma mitocondrial tem um arranjo eficiente. Nele os íntrons são ausentes, e há pequenos espaços intergênicos em que matrizes de leitura se sobrepõem. A região de controle é fundamentalmente não codificante, e é responsável pela regulação da transcrição das cadeias pesadas e leves e da replicação. O gene da citocromo oxidase subunidade I é extremamente importante no mecanismo energético das espécies, pois faz parte da cadeia transportadora de elétrons, e é um dos mais estudados (DINIZ, 2005).

Com uma organização simples, o DNA mitocondrial possui uma dupla fita circular, contendo 37 genes, dos quais dois codificam RNAs ribossômicos, 22 RNAs transportadores e 13 proteínas, além da região não-codificante, chamada região controle ou D-Loop, rica em A+T, responsável pela replicação e transcrição do genoma da mitocôndria (HOY, 2003).

O DNA mitocondrial tem sido extensivamente utilizado para estudos evolutivos, populacionais e demográficos em termos de população e espécies de formigas (ABBOTT et al., 2007; DRESCHER et al., 2007; QUEK et al., 2007; SHOEMAKER et al., 2006).

O genoma mitocondrial de várias espécies de insetos tem sido sequenciado, como é o caso de *Drosophila yakuba* (CLARY; WOLSTENHOLME, 1985), *Apis mellifera* (CROZIER; CROZIER, 1993), *Anopheles quadrimaculatus* (MITCHELL et al., 1993), *Anopheles gambiae* (BEARD et al., 1993), *Cochliomyia hominivorax* (LESSINGER et al., 2000), e *Bombyx mandarina* (YUKUHIRO et al., 2002).

Com o sequenciamento de um fragmento do DNA pode-se obter o gene codificador da proteína da citocromo oxidase II, o qual é um dos mais utilizados para estudos em insetos (SIMON et al., 1994) e o da citocromo oxidase I (que é o gene mais conservado em termos de evolução de aminoácidos). Ele tem sido extensamente estudado devido a iniciativa de utilizá-lo como um DNA barcoding na diferenciação e identificação de espécies de animais (HERBERT et al., 2003; RATNASINGHAM; HEBERT, 2007; SMITH et al., 2005).

A ocorrência de endobactérias, ou seja, bactérias intracelulares são comuns nos artrópodes, pois análises em 63 espécies revelaram que 76% estavam infectados (JEYAPRAKASH; HOY, 2000). Dentre elas, duas se destacam a *Blochmannia*, a qual foi descoberta primeiramente em *Camponotus*, e a *Wolbachia*, também evidenciada nessa espécie de formiga em análises prévias para este trabalho.

Existem dois tipos de interação molecular entre as bactérias simbiotes e seus hospedeiros: a primária e a secundária. A interação primária caracteriza-se por associações especializadas, descendentes de um ancestral,

cujas árvores filogenéticas dos simbiotes são congruentes com a dos seus hospedeiros em períodos longos no tempo evolutivo (MUNSON et al., 1991; LO et al., 2007; BAUMANN, 2005; WU et al., 2006). Também ocorrem alterações na massa do genoma do simbiote primário e o simbiote geralmente localiza-se em algum órgão especializado no interior do hospedeiro. Um bom exemplo para formigas é a *Blochmannia* (GIL et al., 2004; DEGNAN.; LAZARUS; WERNEGREEN, 2005), a qual é considerada uma Gama- Proteobactéria, com estreitas relações filogenéticas com *Escherichia coli* (GOMEZ – VALERO et al., 2004)

A bactéria *Blochmannia* foi identificada pela primeira vez em *Camponotus* (BLOCHMAN, 1882), ocorrendo no interior de uma célula especializada denominada de bacteriócito. Sabe-se que sua presença desempenha um papel nutricional para o hospedeiro, fornecendo alguns aminoácidos essenciais (FELDHAAR et al., 2007) e isto se dá mais intensamente no início da vida (WOLSCHIN et al., 2004; GIL, 2003; DEGNAN; LAZARUS; WERNEGREEN, 2005).

A interação secundária normalmente é facultativa, podendo ser benéfica ou não, por exemplo, desde patógenos até mesmo a tão famosa *Wolbachia*. Shoemaker, Keller e Ross (2003) acreditam que *Wolbachia* é um dos principais simbiotes de insetos, uma vez que estimativas sugerem que milhões de espécies podem estar infectadas, e devido às formigas, de uma maneira geral, terem expandido rapidamente propiciando interação com diversos táxons, estas podem ter adquirido *Wolbachia* através de diversas formas de parasitóides (DEDEINE et al., 2005).

Primeiramente encontrada no mosquito *Culex pipiens*, a cepa de *Wolbachia* foi então designada como *Wolbachia pipiens*, (HERTIG, 1924), mas devido à variação genética ainda não interpretada completamente nas diferentes ordens de insetos onde ocorrem, os autores têm optado por não adotarem essa nomenclatura, referindo-se a esta apenas como *Wolbachia* e quando necessário completar com o táxon do inseto (WERREN; BALDO; CLARK, 2008).

As diferentes cepas de *Wolbachia* são classificadas de acordo com a análise filogenética dos genes 16SrDNA, *wsp* e *ftsZ*, definindo supergrupos A, B, C, D, E, e F, sendo A e B cepas encontradas em artrópodes, C e D em nematóides, e E e F em Collembola, artrópodes e nematóides (FENN; BLAXTER, 2004). Recentemente, mais grupos foram propostos: G em aranhas (ROWLEY; RAVEN; MCGRAW, 2004) e H em cupins (BORDENSTEIN; ROSENGAUS., 2005).

Wolbachia é uma endobactéria Gram negativa da Classe Alpha Proteobacteria, Ordem Rickettsiales, não cultivável fora da célula do hospedeiro, portanto, de difícil estudo. Com o avanço dos métodos moleculares, principalmente com o uso da PCR (Reação de Polimerização em Cadeia), tornou-se possível análises aprofundadas dessa bactéria. As alterações reprodutivas causadas nos hospedeiros infectados por *Wolbachia* caracterizam-se pela incompatibilidade citoplasmática entre descendentes, indução de partenogênese e feminilidade dos machos (WERREN, 1997; WERREN; BALDO; CLARK, 2008).

As cepas de *Wolbachia* infectam novos indivíduos através do citoplasma dos ovos (herança materna), ou seja, transmitida verticalmente. Contudo, a ampla taxa de hospedeiros infectados não pode ser explicada unicamente por essa forma de transmissão, levando a hipótese de transferência horizontal também, embora os mecanismos deste processo ainda não estejam totalmente esclarecidos (WERREN, et al., 1995).

Nos primeiros estudos com *Wolbachia* para confirmar sua presença, foi previamente desenvolvido um par de primer a partir do gene de uma proteína de superfície, o *wsp* (ZHOU; ROUSSET; O'NEILL, 1998), mas devido à taxa elevada de recombinação (BALDO; LO; WERREN, 2005; WERREN; BARTOS, 2001) e forte seleção de diversificação (BALDO et al., 2002; JIGGINS; HURST; YANG, 2002), atualmente tornou-se inadequado a utilização desse gene marcador sozinho. A abordagem de “*multigene typing*” tem sido muito utilizada para cepas de *Wolbachia*, conhecido também como MLST- *Multilocus Sequence Typing* (PARASKEVOPOULOS et al., 2006). Essa ferramenta tem fornecido hipóteses sobre o movimento global desta bactéria dentro das

comunidades de insetos (BALDO et al., 2006), e como um marcador molecular adicional o *wsp* será utilizado após as análises com MLST.

Objetivos

Diante da abundância e da ampla distribuição da espécie *Camponotus textor* no território brasileiro, tanto para o gênero de formigas quanto para a presença dos endossimbiontes *Wolbachia* e *Blochmannia* nas colônias, os objetivos do presente trabalho foram:

1. O objetivo deste trabalho foi sequenciar parcialmente os genes mitocondriais parciais COI e COII, o tRNA (RNA transportador) e seu espaçador intergênico para caracterização molecular de colônias de *Camponotus textor*, assim como verificar a relação entre a distância geográfica e a distância genética dessas colônias.

2. Investigar a presença e a frequência da ocorrência das endobactérias *Wolbachia* e *Blochmannia* nas colônias de *C. textor*, utilizando os pares de primer do MLST (incluindo os seguintes genes *ftsZ*, *gatB*, *coxA*, *hcpA* e *fbpA*), mais o *wsp* como um marcador adicional (para *Wolbachia*), e os primers Bloch 16S-462F e Bloch 16S-1299R (para evidenciar a *Blochmannia*) para elucidar as possíveis formas de transferências destes endossimbiontes e como eles se comportam dentro desta mesma espécie hospedeira *C. textor*.

Apresentação

O tema e os objetivos desta dissertação estão ligados à pesquisa desenvolvida com a espécie *Camponotus textor*, popularmente conhecida como formiga-tecelã e os endossimbiontes *Wolbachia*, de ampla ocorrência em artrópodes e *Blochmannia*, muito comum no gênero *Camponotus*.

A dissertação foi dividida em capítulos, contendo introdução geral, objetivos, resultados e dois artigos científicos.

Um dos artigos compreende os resultados do primeiro objetivo, que originou o artigo intitulado “Caracterização molecular parcial dos genes mitocondriais COI e COII de *Camponotus textor* Forel, 1899 (Hymenoptera, Formicidae)”. Nele são apresentados os resultados da caracterização de colônias de *Camponotus textor* coletadas em algumas localidades do Brasil, revelando através de estudos filogenéticos a relação de parentesco entre essas colônias.

O outro artigo contempla os resultados do segundo objetivo, que resultou em um artigo intitulado “Presença e distribuição dos endossimbiontes *Wolbachia* e *Blochmannia* em colônias de *Camponotus textor* Forel, 1899 (Hymenoptera, Formicidae)”. Nesse artigo, discutem-se os resultados obtidos no levantamento da infecção pelos endossimbiontes *Wolbachia* e *Blochmannia* nas colônias de *C. textor* de algumas localidades do Brasil, relacionando com diversas cepas já depositadas nos bancos de dados, verificando a filogenia e prováveis causas da distribuição variável encontrada.

Referências Bibliográficas

- ABBOTT, K.L.; GREAVES, S.N.J.; RITCHIE, P.A.; LESTER, P.J. Behaviorally and genetically distinct populations of an invasive ant provide insight into invasion history and impacts on a tropical ant community. **Biological Invasions**, v.9, p.1573-1464. 2007.
- AKRE, R.D. ; HANSEN. L.D. Management of carpenter ants. *In*: Meer, R.K.V., K. Jaffe; A. Cedeno (eds.). **Applied Myrmecology – A world perspective**, Westview Press, San Francisco, p. 693-700. 1990.
- BALDO, L.; BARTOS, J. D.; WERREN, J. H.; BAZZOCCHI,C.; CASIRAGHI, M.; PANELLI, S. Different rates of nucleotide substitutions in *Wolbachia* endosymbionts of arthropods and nematodes: arms race or host shifts. **Parasitologia**. v.44, p.179–187. 2002.
- BALDO, L.; HOTOPP, J. C. D.; JOLLEY, K. A.; BORDENSTEIN, S. R.; BILBER, S. A.; CHOUDHURY, R. R.; HAYASHI, C.; MAIDEN, M. C. J.; TETTELIN, H.; WERREN, J. H. Multilocus Sequence Typing System for the Endosymbiont *Wolbachia pipiens*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 11, p. 7098- 7110. 2006.
- BALDO, L.; LO, N.; WERREN, J. H. Mosaic nature of *wsp* (*Wolbachia* surface protein). **Journal of Bacteriology**. v.187, p. 5406–5418. 2005.
- BAUMANN, P. Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of pant sap-sucking insects. **Annual Review of Microbiology**, v. 59, p. 155-189. 2005.
- BEARD, C.B.; HAMM, D.M. AND COLLINS, F.H. The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization, and comparisons with mitochondrial sequences of other insects. **Insect Molecular Biology**, n.2, p. 103-124. 1993.
- BENZIE, J.A., BALLMENT, E., FORBES, A.T., DEMETRIADES, N.T., SUGAMA, K., MORIA, S. Mitochondrial DNA variation in Indo-Pacific populations of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*. **Molecular Ecology**, v.11, p.2553– 2569. 2002.
- BIRKY, C.W., FUERST, P., MARUYAMA, T. Organelle gene diversity under migration, mutation, and drift: equilibrium expectations, approach to equilibrium, effect of heteroplasmic cells, and comparison to nuclear genes. **Genetics**, v.121, p.613– 627.1989.
- BLOCHMAN F. Über das vorkommen von bakterienähnlichen gebilden in den gewebe und eiern verschiedener insekten. **Zentbl Bakteriol**, v.11, p. 234-240. 1882.

BOLTON, B. G. **A New General Catalogue of the Ants of the World**. Harvard University Press, Cambridge. 1995.

BOLTON, B. G.; ALPERT, P. S.; WARD ; P. NASKRECKI. **Bolton catalogue of Ants of the World**, Harvard University Press, Cambridge. 2006.

BORDENSTEIN, S.; ROSENGAUS, R. B. Discovery of a novel *Wolbachia* supergroup in isopteran. **Current Microbiology**, v.51, p. 393- 398. 2005.

BROWN, W.M. The mitochondrial genome of animals. In: MacIntyre, R.J. (Ed.), **Molecular Evolutionary Genetics**. Plenum, New York, NY, p. 95–130. 1985.

CLARY, J.M. ; WOLSTENHOLME, D.R. The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. **Journal of Molecular Evolution**, n. 22, p. 252-271. 1985.

CROZIER, R.H.; CROZIER, Y.C. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: Complete sequence and genome organization. **Genetics**, n.133, p.97-117. 1993.

DEDEINE, F.; AHRENS, M.; CALCATERRA, L.; SHOEMAKER, D. D. Social parasitism in fire ants (*Solenopsis* spp.): a potential mechanism for interspecies transfer of *Wolbachia*. **Molecular Ecology**, v.14, p.1543–1548. 2005.

DEGNAN, P.H.; LAZARUS, A.B.; WERNEGREN, J. J. Genome sequence of *Blochmannia pennsylvanicus* indicates parallel evolutionary trends among bacterial mutualists of insects. **Genome Research**, v.15, n.8, p.1023-1033. 2005.

DEL-CLARO, K.; BERTO, V.; RÉU, W. Effect of herbivore deterrence by ants increase fruit set in an extrafloral nectary plant, *Qualea multiflora* (Vochysiaceae). **Journal of Tropical Ecology**, v.12. p. 887–892. 1996.

DINIZ, M. C. **Variabilidade do gene mitocondrial COI em dois plantéis reprodutores do camarão *Litopenaeus vannamei* do nordeste brasileiro**. 2005. 67 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Ceará, Ceará, 2005.

DRESCHER, J.; BLÜTHGEN, N.; FELDHAAR, H. Population structure and intraspecific aggression in the invasive ant species *Anoplolepis gracilipes* in Malaysian Borneo. **Molecular Ecology**, v.16, p.1453-1465. 2007.

FELDHAAR, H.; STRAKA, J.; KRISCHKE, M.; BERTHOLD, K.; STOLL, S.; MUELLER, M.J.; GROSS, R. Nutritional upgrading for omnivorous carpenter ants by the endosymbiont *Blochmannia*. **BMC Biology**, v.5, p.48. 2007.

FENN, K.; BLAXTER, M. Are filarial nematode *Wolbachia* obligate mutualist symbionts. **Trends in Ecology and Evolution**, v.19, p.163–166. 2004.

GIL, R.; SILVA, F.J.; PERETO, J.; MOYA, A. Determination of the core of a minimal bacterial gene set. *Microbiol. Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.68, p.518–537. 2004.

GIL, R.; SILVA, F.J.; ZIENTZ, E.; DELMOTTE, F.; GONZALEZ-CANDELAS, F.; LATORRE, A.; RAUSELL, C.; KAMERBEEK, J.; GADAU, J.; HÖLLDOBLER, B.; VAN HAM, R.C.; GROSS, R.; MOYA, A. The genome sequence of *Blochmannia floridanus*: Comparative analysis of reduced genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v.100, n.16, p. 9388-9393. 2003.

GOMEZ-VALERO, L.; SORIANO-NAVARRO, M.; PEREZ-BROCAL, V.; HEDDI, A.; MOYA, A.; GARCIA-VERDUGO, J.M.; LATORRE, A. Coexistence of *Wolbachia* with *Buchnera aphidicola* and a secondary symbiont in the aphid *Cinara cedri*. *Journal of Bacteriology*, v.186, p.6626–6633. 2004.

HEBERT, P.D.N.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B.*, v.270, p.313-321. 2003.

HERTIG, M.; S. B. WOLBACH. Studies on rickettsia-like microorganisms in insects. *Journal of Medical Research*, v.44, p.329–374. 1924.

HÖLLDOLBLER, B.; WILSON, E. O. *The ants*. Berlin: Springer – Verla. 1990.

HOY, M. A. Molecular Systematics and Evolution of Arthropods. Em: Insect Molecular Genetics, *Academic Press of Elsevier Science*, p. 363-365, 2003.

JEYAPRAKASH, A.; HOY, M. A. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: *wsp* sequences found in 76% of sixty-tree arthropods. *Insect Molecular Biology*, v. 9, p. 393-405. 2000.

JIGGINS, F. M.; HURST, G. D.; YANG, Z. Host-symbiont conflicts: positive selection on an outer membrane protein of parasitic but not mutualistic *Rickettsiaceae*. *Molecular Biology and Evolution*, v.19, p.1341–1349. 2002.

KEMPF, W.W. Catálogo Abreviado das Formigas da Região Neotropical (Hymenoptera: Formicidae). *Studia Ent*, v. 15. 1972.

LESSINGER, A.C.; JUNQUEIRA, A.C.M.; LEMOS, T.A.; KEMPER, E.L.; DA SILVA, F.R.; VETORRE, A.L.; ARRUDA, P. AND AZEREDO-ESPIN, A.M.L. The mitochondrial genome of the primary screwworm fly *Cochliomyia heminivorax* (Diptera: Calliophoridae). *Insect Molecular Biology*, n.9, p.521-529. 2000.

LO, N.; PARASKEVOPOULOS, C.; BOURTZIS, K.; O'NEILL, S. L.; WERREN, J. H.; BORDENSTEIN, S. R.; BANDI, C. Taxonomic status of the intracellular bacterium *Wolbachia pipientis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 57, p. 654- 657. 2007.

LONGINO, J.T. New species and nomenclatural changes for the Costa Rica ant fauna (Hymenoptera: Formicidae). **Mirmecologische Nachrichten**, v.8, p. 131-143. 2006.

MACKAY, W.P. **The systematics and biology of the new world carpenter ants of the hyperdiverse genus *Camponotus* (Hymenoptera: Formicidae)**. (observações não publicadas).

MITCHELL, S.E.; COCKBURN, A.F.; SEAWRIGHTS, J.A. The mitochondrial genome of *Anopheles quadrimacullatus* species: A complete nucleotide sequence and gene organization. **Genome**, n.36, p.1058-1073. 1993.

MORITZ, C., DOWLING, T.E., BROWN, W.M. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematic. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v.18, p.269-292. 1987.

MUNSON, M. A.; BAUMANN, P.; CLARK, M. A., BAUMANN, L.; MORAN, N. A.; VOEGTLIN, D. J.; CAMPBELL, B. C. Evidence for the establishment of aphid-eubacterium endosymbiosis in an ancestor of four aphid families. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 6321- 6324. 1991.

PALUMBI, S. Nucleic Acids II. The polymerase chain reaction. *In*: D.M. Hillis; C. Moritz and B.K.Mable (Eds.), **Molecular Systematics**. 2a. Ed. Sinauer Press, Sunderland, Massachusetts, p.205-248. 1996.

PARASKEVOPOULOS, C.; BORDENSTEIN, S. R. ; WERNEGREEN, J. J. ; WERREN, J. H.; BOURTZIS, K. Towards a *Wolbachia* multilocus sequence typing system: discrimination of *Wolbachia* strains present in *Drosophila* species. **Current Microbiology**, v.53, n. 5, p. 388–395. 2006.

PHILPOTT, S. M. Changes in arboreal ant populations following pruning of coffee shade-trees in Chiapas, Mexico. **Agroforestry Systems**, n.64, p.219–224. 2005.

QUEK, S.P.; DAVIES, S.J.; ASHTON, P.S.; ITINO, T.; PIERCE, N.E. The geography of diversification in mutualistic ants: a gene's-eye view into the Neogene history of Sundaland rain forests. **Molecular Ecology**, v.16, p.2045-2063. 2007.

RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P.D.N. Bold: The barcode of life data system (www.barcodinglife.org). **Molecular Ecology Notes**, 2007.

ROWLEY, S.M.; RAVEN, R. J.; MCGRAW, E. A. *Wolbachia pipiens* in Australian spiders. **Current Microbiology**, v. 49, p. 208-214. 2004.

SANTOS, J. C.; DEL-CLARO, K. Ecology and behaviour of the weaver ant *Camponotus (Myrmobrachys) senex*. **Journal of Natural History**, v. 43, p. 1423 – 1435. 2009.

SCHWARTZ, M., VISSING, J. Paternal inheritance of mitochondrial DNA. N. **The New England Journal of Medicine**, v.347, p.576-580. 2002.

SHOEMAKER, D.D.; AHRENS, M.E.; ROSS, K.G. Molecular phylogeny of fire ants of the *Solenopsis saevissima* species-group based on mtDNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.38, p.200-215. 2006.

SHOEMAKER, D. D.; KELLER, G.; ROSS, K. G. Effects of *Wolbachia* on mtDNA variation in two fire ant species. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 1757-1772. 2003.

SHREMMER, F. Die Nahezu unbekannte neotropische weberameise *Camponotus (myrmobrachys) senex* (Hymenoptera: Formicidae). **Entomologia Generalis**, v.5, n.4, p.363-378. 1979.

SIMON, C.; F RATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America**, v.87, p.651-70. 1994.

SMITH, M.A.; FISHER, B. L.; HEBERT, P.D.N. DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v.360, p.1825-1834. 2005.

SOLIS, D. R.; FOX, E. G. P.; ROSSI, M. L.; BUENO, O. C. Description of the Immatures of Workers of the Weaver Ant, *Camponotus textor* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v.54, n. 2, p.541-559. 2009.

WERREN, J. H. Biology of *Wolbachia*. **Annual Review of Entomology**, v. 42, p. 537-609. 1997.

WERREN, J. H.; BALDO, L.; CLARK, M. E. *Wolbachia*: master manipulator of invertebrate biology. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 741-751. 2008.

WERREN, J. H.; BARTOS, J. D. Recombination in *Wolbachia*. **Current Biology**, v.11, p.431–435. 2001.

WERREN, J. H.; ZHANG, W.; GUO, L. R. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v.261, p.55–63. 1995.

WILSON, E. O. Causes of ecological success: the case of the ants. **Journal of Animal Ecology**, v.56, p.1-9. 1987.

WILSON, A.C., CANN, R.L., CARR, S.M., GEORGE, M., GYLLENSTEN, U.B., HELM BYCHOWSKI, K.M., HIGUCHI, R.G., PALUMBI, S.R., PRAGER, E.M., et al. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. **Biological Journal of the Linnean Society**, v.26, p.375– 400. 1985.

WOLSCHIN, F.; HÖLLDOBLER, B.; GROSS, R.; ZIENTZ, E. Replication of the endosymbiotic bacterium *Blochmannia floridanus* is correlated with the developmental and reproductive stages of its ant host. **Applied Environment Microbiology** v. 70, n.7, p. 4096-4102. 2004.

WU, D.; DAUGHERTY, S.C.; VAN AKEN, S.E.; PAI, G.H.; WATKINS, K.L.; KHOURI, H.; TALLON, L.J.; ZABORSKY, J.M.; DUNBAR, H.E.; TRAN, P.L., Metabolic complementarity and genomics of the dual symbiosis of sharpshooters. **PLoS Biology**. v.4. 2006.

YUKUHIRO, K.; SEZUTSU, H.; ITOH, M.; SHIMIZU, K. AND BANNO, Y. Not trivial level of sequence divergence, and sequence rearrangements of mitochondrial genome between the wild mulberry silkworm, *Bombyx mandarina*, and its close relative, the domesticated silkworm *Bombyx mori*. **Molecular Biological and Evolution**, v.19, p.1385-1389. 2002.

ZARA, F. J.; BUTION, M. L.; CAETANO, F. H. Post-Embryonic Development of Larvae on the Weaver Ant *Camponotus textor* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 55, n. 2, p. 557- 578. 2010.

ZHOU, W.; ROUSSET, F.; O'NEILL, S. L. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences . **Proceedings of the Royal Society of London B**, v. 265, p. 509–515. 1998.

Artigo 1

**“Caracterização molecular parcial dos genes
mitocondriais COI e COII de *Camponotus textor* Forel, 1899
(Hymenoptera, Formicidae)”.**

Resumo:

O presente trabalho aborda um estudo sobre espécie *Camponotus textor*, que é uma formiga tecelã comum em matas das América Central e do Sul. Em geral, os estudos existentes sobre *C. textor* descrevem o comportamento de tecelagem e a construção de ninhos. Novos estudos desta formiga podem ser reveladores, uma vez que podem nidificar no cafeeiro (*Coffea arabica*) não permitindo o estabelecimento de outros organismos pragas, como a broca do café (*Hypothenemus hampei*). O sequenciamento do gene citocromo oxidase I tem sido extensamente utilizado como um DNA barcoding na diferenciação e identificação de espécies, e o citocromo oxidase II é um dos mais utilizados para estudos em insetos. O objetivo deste trabalho foi sequenciar parcialmente os genes mitocondriais parciais COI e COII, o tRNA (RNA transportador) e seu espaçador intergênico para caracterização molecular de colônias de *Camponotus textor*, assim como verificar a relação entre a distância geográfica e a distância genética dessas colônias. Operárias de seis colônias de formigas foram coletadas de algumas cidades dos estados SP, MG e BA e armazenadas no etanol 80% até a extração de DNA com TNES. A amplificação do fragmento foi feita com os primers elaborados para o trabalho, com cada reação totalizando volume de 25 μ L, contendo DNA molde, Tampão PCR, MgCl₂, dNTP's, e Taq DNA polimerase (Invitrogen). A purificação foi feita *kit* GFX PCR and Gel Band Purification (GE Healthcare), e o sequenciamento com o BigDye Terminator (v.3.1) da Applied Biosystems, no sequenciador automático 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As sequências foram editadas no BioEdit, e comparadas com as sequências depositadas no GenBank, através da ferramenta BLAST. Foi feita a anotação dos *Loci* COI (1103 pb), IGS (69 pb), tRNA-Leu (71 pb) e COII (244 pb). Observou-se também um forte sinal filogenético com transições excedendo as transversões. A análise de correlação de Pearson entre distância genética e a geográfica indicou que existe uma relação: - maior distância geográfica- maior distância genética, caracterizando um padrão filogenético de colonização antiga. A análise filogenética das colônias (máxima parcimônia e baesiana) e a rede de haplótipos confirmaram a existência dessa correlação. Também ficou evidenciada uma grande diversidade de haplótipos mitocondriais, a qual pode ter ocorrido também pela alta incidência de infecção por *Wolbachia*.

Palavras Chaves: Camponotini. Formiga- tecelã. Barcode.

**"Molecular characterization of partial mitochondrial genes
COI and COII of *Camponotus textor* Forel, 1899 (Hymenoptera,
Formicidae)."**

Abstract:

This paper discusses a study on species *Camponotus textor*, who is a weaver ant common in the forests of Central and South America in general, existing studies on *C. textor* describe the behavior of weaving and building nests. Further studies of this ant can be revealing, as they may nest in coffee (*Coffea arabica*) not allowing the establishment of other pest organisms, such as the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*). The sequencing of cytochrome oxidase I gene has been widely used as a DNA barcoding differentiation and identification of species, and cytochrome oxidase II is one of the most widely used for studies on insects. This work was partially sequenced partial mitochondrial genes COI and COII, tRNA (transfer RNA) and its intergenic spacer for molecular characterization of colonies of *Camponotus textor*, as well as to verify the relationship between geographic distance and genetic distance of these colonies. Workers of six colonies of ants were collected from some of the states cities SP, MG and BA and stored in 80% ethanol until DNA extraction with TNES. The fragment amplification was performed with primers designed to work with each total reaction volume of 25 μ L containing template DNA, PCR buffer, MgCl₂, dNTP's and Taq DNA polymerase (Invitrogen). Purification was done GFX PCR kit Gel Band Purification and (GE Healthcare) and sequencing with the BigDye Terminator (v.3.1) from Applied Biosystems, at 3130 Genetic Analyzer automated sequencer (Applied Biosystems). Sequences were edited in BioEdit and compared with the sequences deposited in GenBank by BLAST tool. The note was made of Loci COI (1103 bp), IGS (69 bp), tRNA-Leu (71 bp) and COII (244 bp). There was also a strong phylogenetic signal with transitions exceeding transversions. The Pearson correlation analysis between genetic distance and geographic indicated that a relationship exists: - greater geographic distance- largest genetic distance, featuring a standard phylogenetic old colonization. Phylogenetic analysis of the colonies (maximum parsimony and baesiana) network and haplotype confirmed the existence of this correlation. It was also shown a great diversity of mitochondrial haplotypes, which may have occurred by the high incidence of *Wolbachia* infection.

Key Words: Camponotini. Weaver- ant. Barcode.

1- Introdução

A interação das formigas com as plantas pode se dar de diferentes maneiras. Elas podem atuar como dispersoras de sementes, polinizadoras, herbívoras, além de utilizá-las como hospedeiras para a nidificação, como é o caso das formigas tecelãs, as quais constroem seus ninhos preferencialmente sobre a vegetação arbórea (HÖLLDOLBLER; WILSON, 1990). A estrutura dos ninhos é constituída de seda que é produzida pelas suas próprias larvas. Essa forma de construção é um dos mais notáveis exemplos de cooperação social em animais, conforme Hölldobler e Wilson (1977).

O gênero *Camponotus* (Mayr) compreende mais de 2.000 táxons (BOLTON et al., 2006) e são em geral conhecidas como formigas carpinteiras. Algumas espécies podem causar danos econômicos, como por exemplo, atacando colônias de abelhas (AKRE; HANSEN, 1990).

O presente trabalho aborda um estudo sobre a espécie *Camponotus textor*, que é uma formiga tecelã comum em matas das Américas Central e do Sul. Embora seja abundante, não há estudos suficientes sobre esta espécie no Brasil, apesar dela trazer vantagens para o homem ao atuar no controle de pragas quando nidifica no cafeeiro (*Coffea arabica*) por não permitir o estabelecimento de outras pragas (PHILPOTT, 2005). Em geral, os estudos existentes sobre *C. textor* descrevem o comportamento de tecelagem e a construção de ninhos (SCHREMMER, 1979). Representantes dessa espécie são comuns nos cerrados brasileiros e podem beneficiar as plantas através da predação dos herbívoros (DEL CLARO et al., 1996).

O catálogo elaborado por Kempf (1972) lista *Camponotus senex textor* duas vezes: uma descrita por Forel em 1899 com distribuição da Costa Rica até o Brasil (PA) e outra de *C. textor ruficylpeus*, descrita por Emery em 1920, também com distribuição no Brasil. Bolton (1995) considera nomes válidos *Camponotus senex textor* e Bolton (2006) se refere a duas subespécies: *Camponotus (Myrmobrachys) senex senex* (Smith, 1858) com distribuição do Brasil ao México e *Camponotus (Myrmobrachys) senex textor* (Forel, 1899) com ocorrência na Costa Rica.

Mackay (observações não publicadas) relata que *Camponotus senex* tem sido identificada erroneamente, quando baseada somente em caracteres morfológicos e sugere a distribuição representada na Figura 1. Uma vez que se ignora a variação com base no tamanho das operárias e na cor, é plausível se inferir que exista apenas uma espécie em questão. Assim, *Camponotus (Myrmobrachys) senex textor*, variação *ruficylpeus* Emery, 1920 é tida como um sinônimo de *Camponotus senex*, segundo esse mesmo autor.

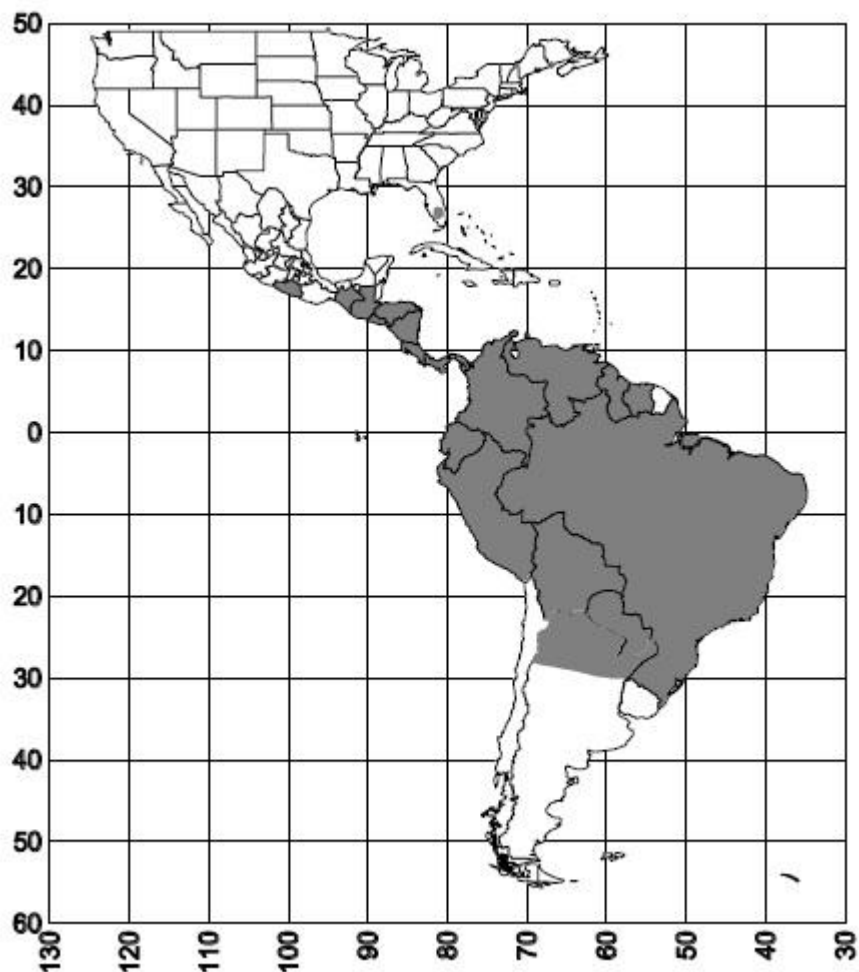


Figura 1- Mapa de distribuição de *Camponotus senex* elaborado por Mackay (observações não publicadas). Note que a região cinza representa a distribuição da espécie.

Por sua vez, Longino (2006) revisou alguns táxons de formigas e formalmente separou *Camponotus senex textor* em *Camponotus senex* e *Camponotus textor*, uma vez que a primeira não foi confirmada como sendo

formiga tecelã, mas sim, uma oportunista moradora em cavidades. Portanto, a formiga tecelã encontrada no Brasil é a *Camponotus textor* (Forel, 1899).

Com o uso de sequenciamento do DNA mitocondrial pode-se obter o gene codificador da proteína citocromo oxidase II (COII), o qual é um dos mais utilizados para estudos em insetos (SIMON et al., 1994) e o da citocromo oxidase I (COI), que é a sequência mais conservada em termos de evolução de aminoácidos. Esta última tem sido extensamente estudada para utilizá-la como um DNA *barcoding* (código de barras de DNA) na diferenciação e identificação de espécies de insetos (HERBERT et al., 2003; RATNASINGHAM; HEBERT, 2007; SMITH et al., 2005). A evolução do COI é ágil e o suficiente para permitir a distinção de não só apenas espécies relacionadas, mas também de grupos filogenéticos dentro de uma única espécie (HEBERT et al., 2003; COX; HEBERT, 2001; WARES; CUNNINGHAM, 2001).

O objetivo deste trabalho foi sequenciar parcialmente dois genes mitocondriais parciais, o tRNA (RNA transportador) e seu espaçador intergênico para caracterização molecular de colônias de *Camponotus textor*, com intuito de obter mais uma ferramenta de identificação da espécie através do barcode e outros marcadores, assim como verificar a relação entre a distância geográfica e a distância genética dessas colônias.

2-Material e métodos

2.1 -Coletas e identificação

Individualmente, operárias de *Camponotus textor* foram coletadas de seis colônias de diferentes localidades do Brasil em áreas urbanas (Tabela 1 e Figura 2). O material foi preservado em etanol 80% e mantido a -20° C até a extração individual do DNA total (número amostral entre parêntese na Tabela 1). Os espécimes foram identificados pelo Dr. Jaques Delabie e depositados em sua coleção no Laboratório de Mirmecologia - Convênio UESC/CEPLAC Centro de Pesquisas do Cacau – CEPEC- CEPLAC (Voucher #5692).

Cidade	Coordenadas
Rio Claro SP (30)	22° 23' 42,3" S 47° 32' 33,4" W
São João da Boa Vista SP (30)	21° 58' 10" S 46° 47' 56" W
Uberlândia I MG (15)	18° 53' 9,7" S 48° 15' 39" W
Uberlândia II MG (15)	18° 53' 0,64" S 48° 15' 34,35" W
Santa Rita Passa do Quatro SP (30)	21° 42' 3,52" S 47° 29' 22,35" W
Ilhéus BA (15)	14° 18' 45" S 39° 53' 13" W

Tabela 1- Locais de coleta de *Camponotus textor* para a realização deste trabalho e sua respectiva coordenada geográfica. O número entre parênteses refere-se à quantidade de operárias analisadas por colônia.

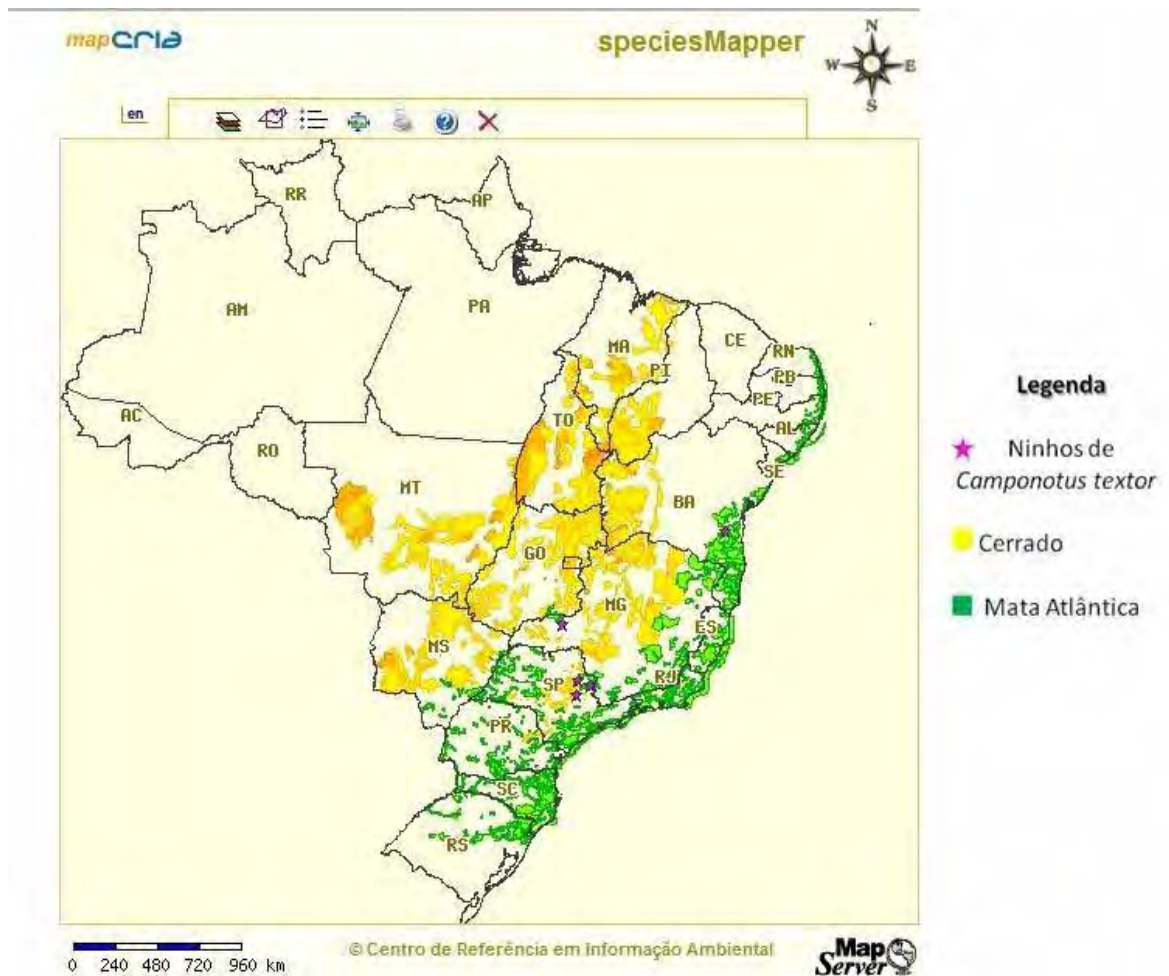


Figura 2- Localidades de coleta das colônias estudadas. A Tabela 1 detalha os locais. Mapa: speciesMapper, 2009.

2.2 - Extração do DNA total, Amplificação e Sequenciamento

O DNA foi extraído de operárias inteiras (ver tabela 1 para obtenção do número amostral por colônia) preservadas em etanol 80%. Os tecidos após a dissociação foram incubados em uma solução de lise celular (100mM Tris, pH 9.1, 100 mM NaCl, 200 mM sacarose, 50 mM EDTA, 0,5 % SDS) à 55 °C por 3 horas; subsequentemente, resíduos proteicos foram precipitados com NaCl 5 M e centrifugados a 16,000 g por 5 min; o sobrenadante que contém o DNA foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL contendo 600 µL de isopropanol 100 % e então misturados por inversão e centrifugados a 16,000 g por 5 min. Após remoção do sobrenadante, foram adicionados 600 µL de etanol 70% ao tubo e invertidos gentilmente por inversão e então centrifugados a 16,000 g por 3 min. O etanol foi removido e o pelete contendo DNA foi seco por 10 min na DNA 120

SpeedVac® da Thermo Savant. O DNA foi ressuspendido em 30 µL de TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH-8).

A amplificação do fragmento foi realizada através dos primers CAMP F 5' – ATCTCCYGATATAGCYTACC – 3' e CAMP R 5' – GCYCGWGTATCAATATCTA – 3' baseados em sequências de outras espécies de *Camponotus* depositadas no GenBank. Através desta técnica foi possível o sequenciamento de cerca de 700 pb da região do COI. Posteriormente, foi utilizada outra combinação de primers: CAMP F2 5' – TAGATATTGATACWCGAGC – 3' (já desenvolvido através das sequências de *Camponotus textor*) e ANT R 5' – TTCATAAGTTCAGTATCATTGGTG – 3' (MARTINS et al., 2007), que foram utilizados para amplificar a região terminal do COI, tRNA completo e parte da região COII , o que possibilitou o sequenciamento de mais 750 pb. Para a junção destas sequências, foi desenvolvido o CAMP COIN 5' – CCTATTGATAGGACATAGTG – 3' (também desenvolvido através das sequências de *C. textor*), o qual totalizou um contig de 1482 pb e permitiu mais confiabilidade dos dados. As sequências dos primers utilizados e o esquema das regiões amplificadas estão representados na Figura 3.

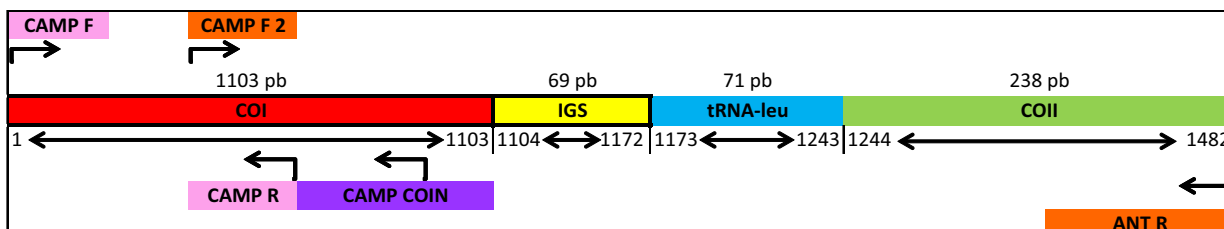


Figura 3- Desenho esquemático dos primers utilizados para este trabalho e suas regiões de amplificações em relação às sequências. Note que Camp F e Camp R em rosa, foram usados em conjunto, assim como Camp F2 e Ant R em laranja também.

Para a amplificação do fragmento foi usado o Kit da Invitrogen. O volume da reação de PCR foi de 25 µl, contendo 2 µl DNA molde, 5 µl Tampão, 2,5 µl MgCl₂, 1 µl dNTP's, e 0,13 µl Taq DNA polimerase, e água Mili-Q. Os parâmetros do termociclador foram: denaturação inicial de 94°C por 5 min, seguidos de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 48°C por 1,4 min, 68°C por 2,5 min, e por último, extensão final à 65°C por 7 min.

A purificação do produto da PCR foi realizada através do kit GFX PCR and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare), seguindo o protocolo do fabricante. As amostras foram quantificadas em NanoDrop 2000 Thermo Scientific – Uniscience e a reação de sequenciamento foi realizada fazendo uso do kit de reagentes denominado BigDye Terminator (v.3.1) da Applied Biosystems, de acordo com as recomendações do fabricante. Todos os amplicons foram sequenciados em ambas as direções. A leitura das sequências foi feita pelo sequenciador automático 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)

2.3 - Análises das Sequências

Para as análises do presente trabalho somente uma sequência consenso de cada colônia foi utilizada, uma vez que não houve diferenças de haplótipos entre as formigas da mesma colônia. As sequências consensos em conjunto com as sequências que enraizaram as árvores filogenéticas foram cortadas no software *Bioedit Sequence Alignment Editor Copyright 1997-2011* (HALL, 1999) e alinhadas com a ferramenta ClustalW (HIGGINS; BLEASBY; FUCHS, 1992).

As regiões codificadoras (COI e COII) foram analisadas separadamente na ferramenta ORF Finder (*Open Reading Frame Finder*) do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para a confirmação do sequenciamento do DNA mitocondrial e não de pseudogenes. A região do IGS (*inter-genic spacers*) foi caracterizada através de comparações com as sequências já depositadas no banco de dados, assim como o tRNA-Leu através do software tRNAscan-SE (LOWE; EDDY, 1997). Número e posição de substituições sinônimas e não sinônimas, inserções e deleções foram identificadas através do programa DAMBE (XIA; XIE, 2001).

Antes de realizar a análise Baesiana, o modelo apropriado de evolução de sequência foi escolhido através do Akaike Information Criterion utilizando Modeltest v 3.06 (POSADA; CRANDALL, 1998); com o uso do MrModeltest v2 (NYLANDER, 2004) o modelo apropriado encontrado foi GTR + G. A reconstrução da filogenia baseada na análise Baesiana foi realizada usando o software MrBayes (HUELSENBECK;

RONQUIST, 2001). A cadeia de Markov foi executada para 1.000.000 gerações e amostradas em cada 100 gerações. Para sumarizar os valores paramétricos e as árvores geradas foram descartadas 10% das árvores e os valores de probabilidade posterior foram calculadas com as árvores restantes.

Com o PAUP 4.0 (SWOFFORD, 1996) foram realizadas as análises de distância genética (uncorr. p -distância; parâmetro 2 Kimura ; HKY85; 1000 réplicas- bootstrap) e de máxima parcimônia (Busca Heurística, 1000 réplicas- bootstrap), com o objetivo de testar a confiabilidade da análise de baesiana.

A correlação de distância genética e geográfica das colônias estudadas foi testada por meio da correlação de Peason. Com os dados do GPS de cada colônia, foi possível calcular o UTM, o qual está correlacionado com a distância genética na Tabela 2.

Pairwise distance/KM	Rio Claro	São João Boa Vista	Uberlândia I	Uberlândia II	Sta Rita Passa IV	Ilhéus
Rio Claro	-	90,008	397,263	397,663	77,381	1207,881
São João da Boa Vista	0,00611	-	375,161	375,561	77,282	1098,695
Uberlândia I	0,00203	0,00679	-	0,400	323,154	1026,760
Uberlândia II	0,00135	0,00611	0,00068	-	323,554	1027,160
Santa Rita do Passa Quatro	0,00543	0,00068	0,00611	0,00543	-	1148,916
Ilhéus	0,02134	0,02062	0,02345	0,02275	0,01993	-

Tabela 2- Distância genética entre cada sequência, calculada usando o PAUP 4.0b10 (SWOFFORD, 1998); e distancia geográfica em Km de cada sequência, calculada através do UTM.

Com o programa Network 4510, obteve-se a análise da rede de haplótipos usando o método *median-joining*. (BANDELT; FORSTER; RÖHL, 1999).

3-Resultados

3.1 -Caracterização dos *Loci* COI, IGS, tRNA-Leu, e COII.

Em todas as colônias analisadas foram obtidas sequências de 1482 pares de base, sendo que 1103 pb são referente ao COI, 69 pb o IGS, 71 pb o tRNA-Leu e 238 pb de COII.

A estrutura do tRNA-Leu foi estabelecida através do software tRNA-Scan (LOWE; EDDY, 1997), e apresentou-se constante em todas as colônias de *C. textor* analisadas neste trabalho. Entretanto, a estrutura apresentou diferenças em relação à sequência de *Camponotus laevigatus* (cód. de acesso AY334384), que apresenta maior similaridade em relação a *C. textor*, depositada no GenBank. O tRNA de *C. textor* apresentou 71 nucleotídeos enquanto que o de *C. laevigatus* 69 (Figura 4).

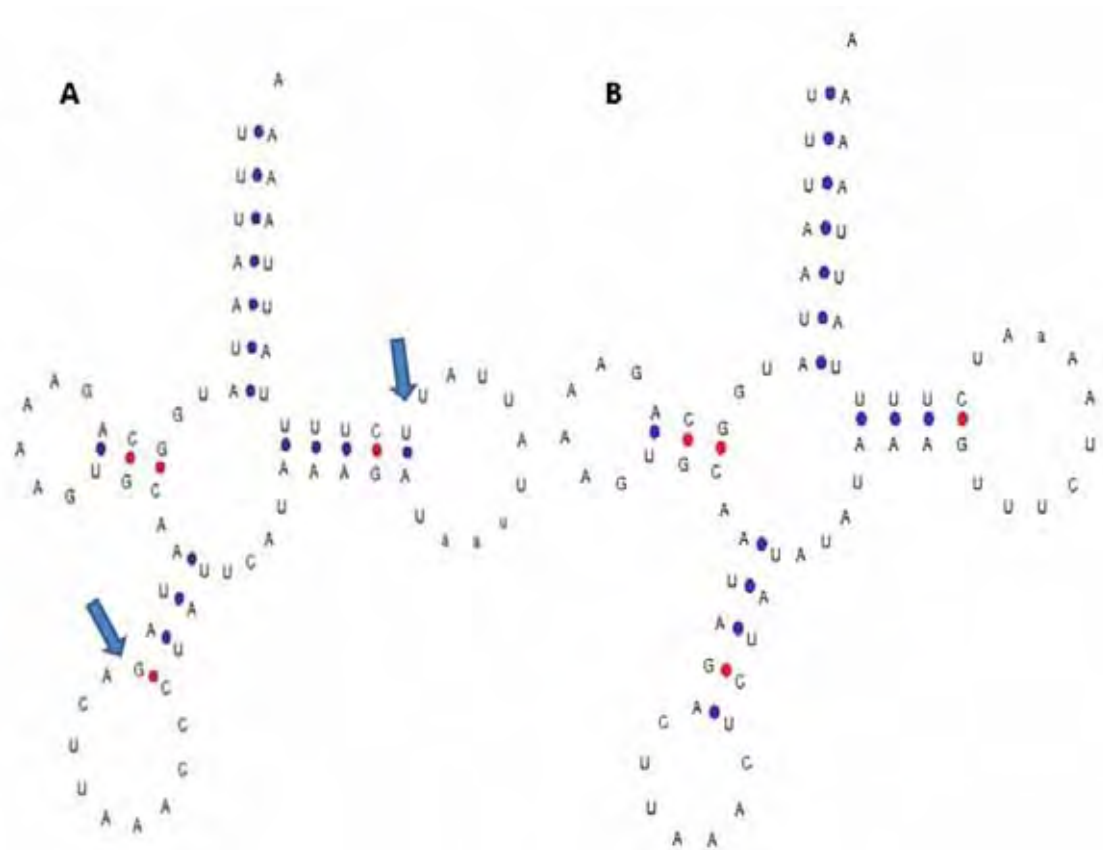


Figura 4- Estrutura gerada pelo TNRA-Scan. **A.** tRNA Leucina de *Camponotus textor*. **B.** tRNA Leucina de *Camponotus laevigatus*. As setas indicam inserções de nucleotídeos nas estruturas da espécie A em relação a B.

3.2 - Correlação entre as distâncias genética e geográfica

As coordenadas geográficas da localização das colônias foram transformadas para distância métrica UTM e a distância genética de cada sequência foi calculada com auxílio do PAUP 4.0 (SWOFFORD, 1996) (uncorr. p -distância; parâmetro 2 Kimura; HKY85; 1000 réplicas - bootstrap). O dados de todas as colônias foram submetidos à Correlação de Pearson, a qual apresentou-se positiva, com $r = 0.93$ valor significativo ao nível de 5%.

3.3 - Análise Baesiana e Máxima Parcimônia

As análises baesiana (Figura 5) e de máxima parcimônia (mp) apresentaram resultados congruentes. Os valores apresentados nas ramificações da figura representam bootstrap (abaixo dos ramos) e os da análise de baesiana (acima dos ramos). A árvore foi enraizada com as sequências de *Camponotus sansabeanus* (cód. de acesso- AY334382) e *Camponotus laevigatus* (cód. de acesso- AY334384) do GenBank sob os

valores de 100 e 100 (bootstrap e baesiana, respectivamente), após o alinhamento as sequências foram cortadas para que todas fossem com o mesmo tamanho antes da realização das análises. A colônia de Ilhéus ficou separada do restante das colônias de *Camponotus textor* sob os valores de 97 (bootstrap) e 82 (baesiana). Houve então a separação de mais dois cladós: as colônias de Santa Rita do Passa Quatro e de São João da Boa Vista juntas sob os valores de 91 (bootstrap) e 88 (baesiana); e Rio Claro e mais as duas colônias de Uberlândia sob os valores de 97 e 97, para os dois tipos de análises. Dentro deste último clado ainda, a colônia de Rio Claro ficou separada das outras duas colônias de Uberlândia sob os valores de 62 (bootstrap) e 98 (baesiana). Pela análise ficou evidente a separação da espécie em três grandes grupos: a colônia de Ilhéus formando um; as colônias de Santa Rita do Passa Quatro e São João da Boa Vista formando outro; e ainda as colônias de Rio Claro e as duas de Uberlândia juntas.

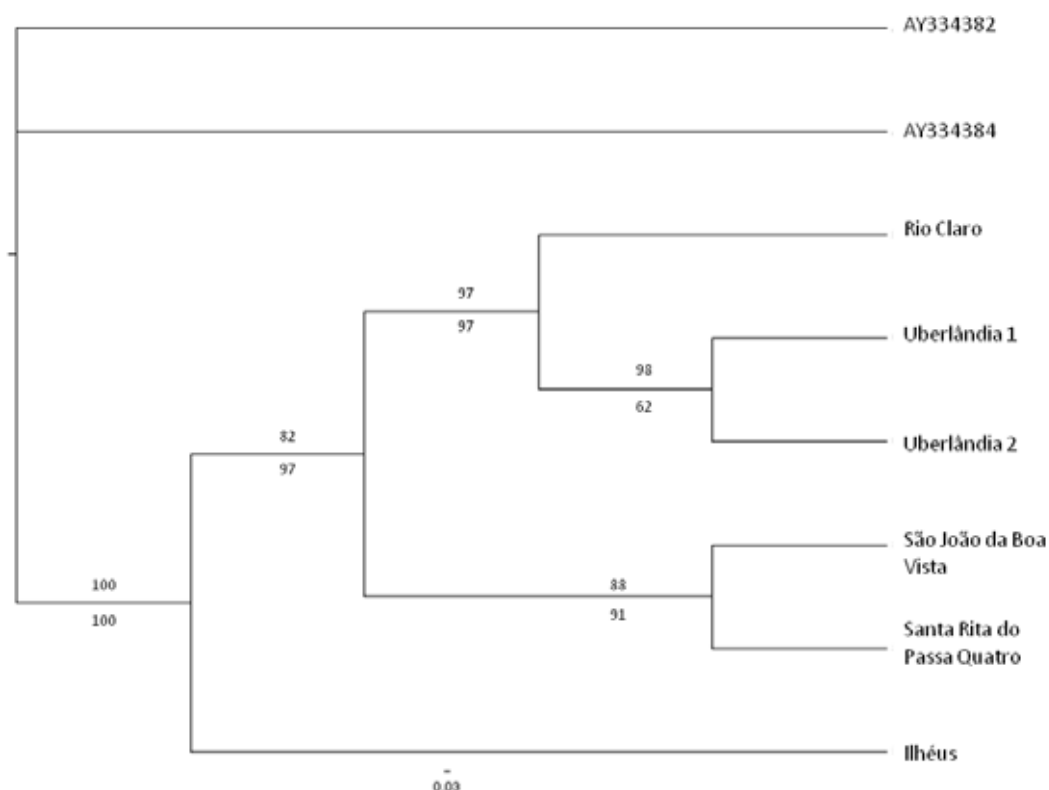


Figura 5- Análises filogenéticas Baesiana e de máxima parcimônia com as colônias de *Camponotus textor*. A árvore foi enraizada com as sequências de *Camponotus sansabeanus* (cód. de acesso- AY334382) e *Camponotus laevigatus* (cód. de acesso- AY334384) obtidas do GenBank. Valores de bootstrap abaixo e valores de baesiana acima.

3.4 -Rede dos haplótipos

As sequências obtidas também foram submetidas ao software NETWORK4.5 (fluxus-engineering.com) usando o método de *median-joining* (BANDELT; FORSTER; RÖHL, 1999) para estabelecer a rede de haplótipos (Figura 6), resultando em 6 haplótipos diferentes separados pelas regiões. A sequência de Rio Claro formou o H1 (haplótipo), sequência de São João da Boa Vista o H2, Uberlândia 1 o H3, Uberlândia 2 o H4, Santa Rita do Passa Quatro o H5, e Ilhéus o H6

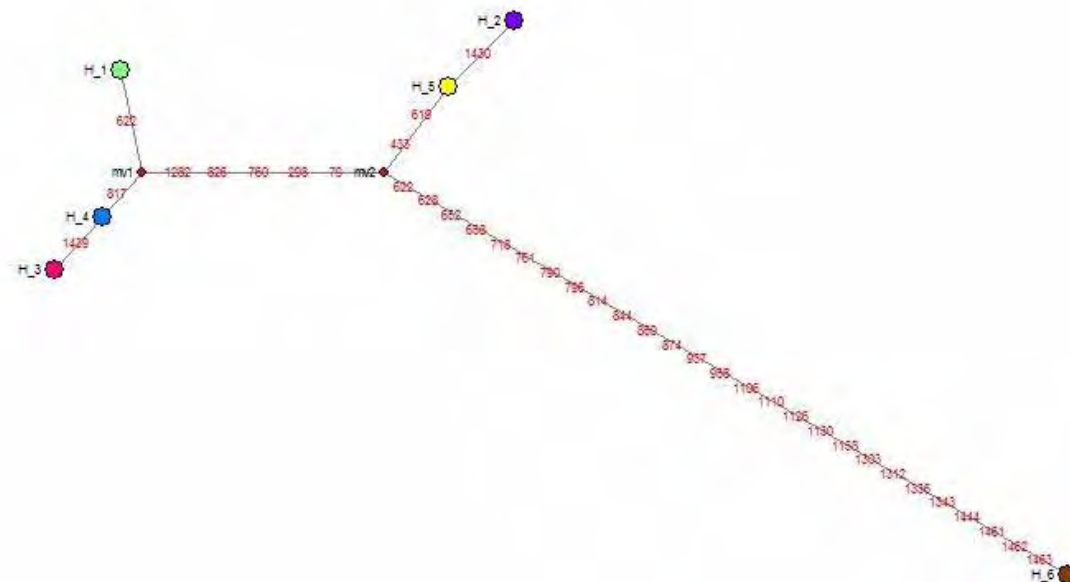


Figura 6- Rede de haplótipos das colônias de *Camponotus textor* pelo método *median-joining*. H_1 representa a colônia de Rio Claro; H_2 a colônia de São João da Boa Vista; H_3 a primeira colônia de Uberlândia; H_4 a segunda colônia de Uberlândia; H_5 a colônia de Santa Rita do Passa Quatro; e H_6 a colônia de Ilhéus.

3.5- Análise do sinal filogenético

Após o alinhamento no ClustalW e a edição manual, as sequências foram submetidas ao Dambe (XIA; XIE, 2001) para a verificação da quantidade de transição e transversão. Os resultados indicaram um forte sinal filogenético, com transições excedendo as transversões (Figura 7).

As modificações nas sequências de aminoácidos das regiões codificantes resultaram em vinte e sete mutações silenciosas e sete mutações não silenciosas.

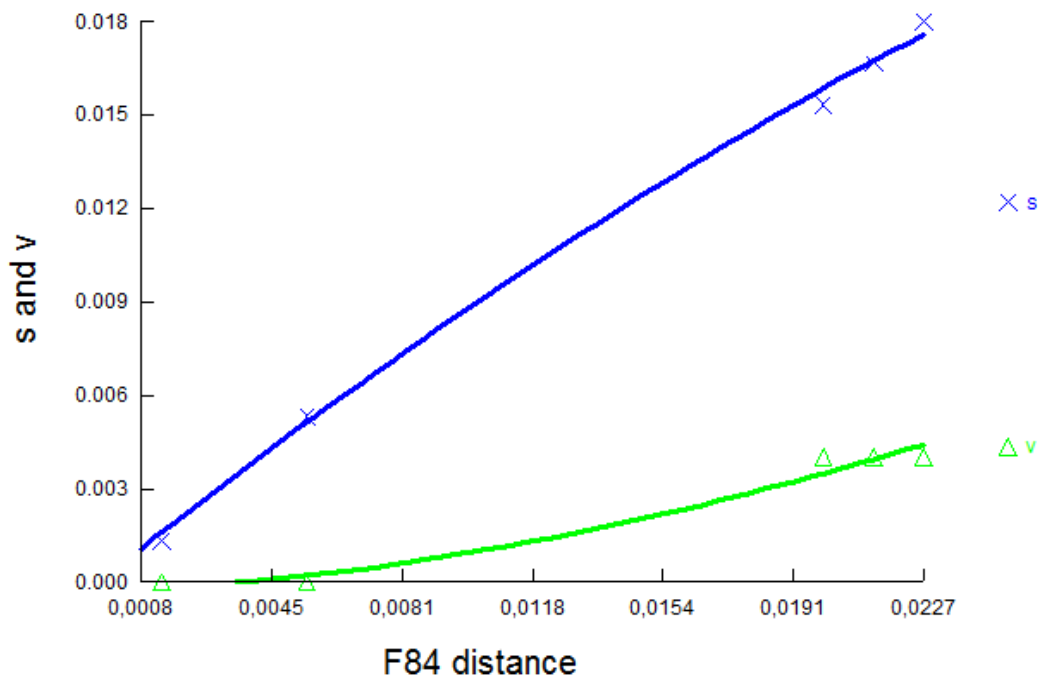


Figura 7- A análise do sinal filogenético de sequências estudadas neste trabalho. O eixo x indica a divergência entre as sequências. A linha azul representa transições e a linha verde representa transversões. O gráfico mostra um sinal filogenético satisfatório onde as transições aparecem com mais frequência do que transversões.

4- Discussão

Existem poucos trabalhos de taxonomia de *Camponotus*, e devido à imensa diversidade, muitas dessas espécies foram identificadas erroneamente (MACKAY, observações não publicadas). Após o trabalho de Longino (2006), que formalmente separou *Camponotus senex textor* em *Camponotus senex* e *Camponotus textor*, afirmando que a formiga-tecelã encontrada no Brasil é a *Camponotus textor*, o presente trabalho realizou uma abordagem de caracterização molecular desta espécie com intuito de obter mais uma ferramenta de identificação da espécie através do barcode e outros marcadores moleculares encontrados.

Primeiramente, foi realizada a anotação de todas as colônias, identificando cada região do COI (que pode ser utilizado como barcode), IGS, tRNA de

Leucina e COII. Poucas alterações foram verificadas entre as colônias, entretanto foi possível uma separação em três grandes grupos. Quanto às divergências, foram identificadas nas regiões codificadoras vinte e sete mutações sinônimas e sete mutações não sinônimas. A ausência ou a baixa quantidade de substituições não sinônimas é esperada em regiões codificadoras (MORITZ; DOWLING; BROWN, 1987).

As sequências apresentaram em média 65,92% de A e T e 34,07% de G e C, segundo o software “Gene Runner” versão 3.01 (<http://www.generunner.net/> Copyright © 1994 Hastings Software, Inc), corroborando os trabalhos de Simon et al. (1994) e Koulianos; Crozier (1999), os quais sugerem uma alta frequência nucleotídeos de A e T no genoma mitocondrial dos insetos em geral.

O IGS espaçador em *Apis* localiza-se em região diferente da encontrada neste trabalho, ficando entre tRNA de Leucina e COII, e possui 193 pb. Tanto para *C. textor*, assim como em outras espécies de formigas e abelhas, essa região possui um tamanho reduzido ou até mesmo ausente (CROZIER; CROZIER, 1993), entretanto, tem-se mostrado informativa para estudos evolutivos e filogenéticos (FRANCK et al., 1998; WETTERER; SCHULTZ; MEIER, 1998; KRONAUER; HÖLLDOBLER; GADAU, 2004; MARTINS et al., 2007).

O tRNA de Leucina quando comparado com o de *Camponotus laevigatus* (sequência de maior similaridade no “GenBank”) apresentou algumas divergências. Segundo Clary e Wolstenholme (1985), as maiores alterações encontradas estão presentes nos braços D e TΨC, entretanto, isso não foi observado no presente trabalho. A região D não apresentou diferenças. As demais regiões apresentaram diferenças consideráveis: na região TΨC de *C. textor* pode-se observar uma inserção de dois nucleotídeos (U e A) indicados pela seta e mais cinco substituições na alça (de A para U, A para U, C para U, U para A, e U para A); na região variável ocorreram duas substituições (de U para C e A para U); na região do anticódon houve uma deleção de dois nucleotídeos (U e A) indicados pela seta; na alça dessa região há também a inserção de dois nucleotídeos (A e C), totalizando nove, enquanto que na espécie de *C. laevigatus* há sete.

O estudo de um único tRNA não é o suficiente para elucidar a filogenia a nível da espécie (HIGGS et al., 2003), entretanto, há uma tendência de gêneros estritamente relacionados possuírem um tRNA similar (CHIOTIS; JERMIIN; CROZIER, 2000).

Todas as amostras de *C. textor* foram coletadas em áreas urbanas interligadas por rodovias, isto pode indicar a interferência do homem na dispersão das rainhas, resultando em um possível isolamento das colônias estudadas.

Pela análise de correlação de Pearson entre distância genética e a geográfica foi verificada que existe a relação: - maior distância geográfica-maior distância genética. Esta relação sugere um padrão filogenético com colonização antiga (STREHL; GADAU, 2004). Os polimorfismos de ancestrais que foram isolados podem originar relações filogenéticas distintas (BULGIN et al., 2003); portanto, ao assumir que a ação antrópica (ex. construção de rodovias e urbanização) pode reduzir o fluxo gênico entre as colônias de *C. textor* atuando como uma possível barreira, isto pode explicar a separação em três grandes grupos.

A atividade humana até pode reduzir os efeitos de barreiras geográficas e distância física pelo transporte de formigas, pois pode interferir no fluxo gênico. Por outro lado, esses movimentos não devem ser tão frequentes e regulares de maneira a prevenir a contínua divergência genética de populações geográficas (AHRENS; ROSS; SHOEMAKER, 2005).

Ahrens, Ross e Shoemaker (2005) em seu trabalho sobre *Solenopsis invicta* comentam que diversos fatores isolados ou agindo em conjunto podem limitar o fluxo gênico mediado matematicamente, como por exemplo: a baixa capacidade de dispersão das rainhas monogínicas (MARKIN et al., 1971), assim como a baixa vagilidade das rainhas poligínicas (DEHEER et al., 1999) e a presença de populações contaminadas com diferentes cepas de *Wolbachia* (SHOEMAKER; KELLER; ROSS, 2003), que pode gerar incompatibilidade entre os indivíduos reprodutivos de populações distintas. Como pouco se conhece sobre a biologia geral de *C. textor*, não se pode fazer inferências sobre a sua forma de dispersão, mas é possível que a bactéria reduza a performance locomotora de operárias, fato que já foi observado no parasitóide *Leptopilina heterotoma* (FLEURY et al., 2000).

No presente trabalho ficou evidenciado que há uma grande diversidade de haplótipos mitocondriais assim como ocorreu com *S. invicta* no trabalho de Ahrens, Ross e Shoemaker (2005). Os autores relatam que isso pode ser decorrente de alguns fatores, como por exemplo, linhagens divergentes dentro da mesma espécie. Ross; Shoemaker (2005) e Ross et al. (2007) defendem a ideia que a deriva genética e a seleção local podem gerar diferenças que resultam em linhagens diferentes de haplótipos mitocondriais em *S. invicta*.

Ramalho et al. (não publicado) verificou uma alta incidência de infecção de operárias de *C. textor* com múltiplas cepas de *Wolbachia*, o que poderia contribuir também para aumentar a diversidade de haplótipos mitocondriais, uma vez que a incompatibilidade citoplasmática causada por cepas distintas poderia reduzir o fluxo gênico entre as colônias.

A análise filogenética das colônias e a rede de haplótipos revelaram a existência da correlação entre as distâncias geográficas e genéticas evidentes na árvore e rede geradas, respectivamente.

No trabalho de Berghoff et al. (2008) ficou evidente que as rainhas de *Eciton burchellii* não possuíam asas e ficavam permanentemente na colônia, enquanto que os machos alados conseguiam dispersar longas distâncias e transpor barreiras como rios. Nesse estudo foi utilizado tanto a técnica de microsatélites nucleares quanto de sequências mitocondriais, e por isso que se obteve o cenário real da dispersão e a investigação do fluxo gênico. Se o estudo em questão levasse em consideração apenas as sequências de DNA mitocondrial (materno), não conseguiria verificar que os machos eram os responsáveis pela manutenção do fluxo gênico. Portanto, apesar dos dados aqui apresentados serem inéditos para a espécie de *Camponotus textor*, o atual trabalho levou em consideração apenas o DNA mitocondrial. Desta forma, os resultados que sugerem uma limitação do fluxo gênico entre as colônias necessitam de novos estudos, levando em consideração o DNA nuclear, pois não se sabe ao certo como se dá a dispersão desta espécie.

A análise baesiana e a de máxima parcimônia apresentaram a mesma topologia além de altos valores de bootstrap e valores de inferência baesiana dos ramos, os quais indicam forte suporte da análise. A resposta foi positiva, uma vez que a colônia de Ilhéus (a mais distante geograficamente) apresentou-se separada das demais na análise filogenética; as colônias de São João da

Boa Vista e de Santa Rita do Passa Quatro ficaram mais relacionadas, caracterizando assim um grupo, assim como as duas colônias de Uberlândia, locais em que a distância geográfica era menor. A colônia de Rio Claro ficou mais relacionada com o clado das colônias de Uberlândia, apesar de se localizar mais próximo à Santa Rita do Passa Quatro e São João da Boa Vista. Esta junção em um único grupo pode ser explicada com um ancestral comum mais recente do que de todas as outras colônias amostradas. Entretanto não se pode descartar a possibilidade de transporte humano dos ninhos também.

A rede de haplótipos também apresentou o mesmo resultado obtido na análise baesiana e máxima parcimônia, novamente oferecendo mais suporte aos dados.

5- Conclusões

Com as técnicas utilizadas foi possível a caracterização de dois genes mitocondriais parciais COI e COII, o tRNA-Leu e o IGS de *Camponotus textor*, a formiga-tecelã do Brasil.

A análise entre as distâncias geográfica e genética das colônias analisadas revelou correlação positiva, sugerindo um padrão de colonização antiga.

Foi evidenciada também uma ampla diversidade de haplótipos mitocondriais, e isto pode sugerir uma redução do fluxo gênico entre as colônias, decorrentes tanto de uma baixa capacidade de dispersão das rainhas, da ação antrópica, como também da presença de múltiplas cepas de *Wolbachia* as quais podem gerar incompatibilidade citoplasmática.

Referências Bibliográficas

- AHRENS, M. E.; ROSS, K. G.; SHOEMAKER, D. D. W. Phylogeographic structure of the fire ant *Solenopsis invicta* in its native south American range: roles of the natural barriers and habitat connectivity. **Evolution**, n.59, p.1733-1743. 2005.
- AKRE, R. D.; HANSEN, L. D. Management of carpenter ants. *In*: MEER RKV, JAFFE K, CEDENO A, (eds.). **Applied Myrmecology – A world perspective**, p.693-700.1990.
- BANDELT, H.J.; FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for 288 inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, n,16, p.37–48.1999.
- BERGHOFF, S. M.; KRONAUER, D. J. C.; EDWARDS, K. J.; FRANKS, N. R. Dispersal and population structure of a New World predator, the army ant *Eciton burchellii*. **Journal of Evolutionary Biology**, n.21, p.1125–1132. 2008.
- BOLTON, B.G. **A New General Catalogue of the Ants of the World**. Cambridge: Harvard University Press; 1995.
- BOLTON, B.G. **Bolton catalogue of Ants of the World**. Cambridge: Harvard University Press; 2006.
- BULGIN, N.L.; GIBBS, H.L.; VICKERY, P.; BAKER, A. J. Ancestral polymorphisms in genetic markers obscure detection of evolutionarily distinct populations in the endangered Florida grasshopper sparrow (*Ammodramus savannarum floridanus*). **Molecular Ecology**, n.12, p.831-844. 2003.
- CHIOTIS, M.; JERMIIN, L. S.; CROZIER, R. H. A molecular framework for the phylogeny of the ants subfamily Dolichoderinae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, n.17, p.108–116. 2000.
- CLARY, J. M.; WOLSTENHOLME, D. R. The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. **Journal of Molecular Evolution**, n. 22, p. 252-271. 1985.
- COX, A. J.; HEBERT, P. D. N. Colonization, extinction and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean. **Molecular Ecology**. n. 10, p. 371–386. 2001.
- CROZIER, R. H.; CROZIER, Y. C. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. **Genetics**, n..133, p. 97-117. 1993.
- DEHEER, C. J.; GOODISMAN, M. A. D.; ROSS, K. G. Queen dispersal strategies in the multiple-queen form of the fire ant *Solenopsis invicta*. **American Naturalist** , n.153, p.660–675. 1999.

DEL-CLARO, K.; BERTO, V.; RÉU, W. Effect of herbivore deterrence by ants increase fruit set in an extrafloral nectary plant, *Qualea multiflora* (Vochysiaceae). **Journal of Tropical Ecology**, n.12, p.887–892. 1996.

FLEURY, F.; VAVRE, F.; RIS, N.; FOUILLET, P.; BOULETREAU, M. Physiological cost induced by the maternally transmitted endosymbiont *Wolbachia* in the *Drosophila* parasitoid *Leptopilina heterotoma*. **Parasitology**. v. 121, p. 493–500. 2000.

FRANCK, P.; GARNERY, L.; SOLIGNAC, M.; CORNUET, J. M. The origin of West European subspecies of honeybees (*Apis mellifera*): new insights from microsatellite and mitochondrial data. **Evolution**, n.52, p.1119-1134. 1998.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series** n.41, p.95-98. 1999.

HEBERT, P.D.N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L. WAARD, J.R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London B**, n.270, p. 313-321 2003.

HIGGINS, D. G.; BLEASBY, A. J.; FUCHS, R. Clustal V: improved software for multiple sequence alignment. **Computer Applications in the Biosciences**, n. 8, p.189–191. 1992.

HIGGS, P. G.; JAMESON, D.; JOW, H.; RATTRAY, M.; The evolution of tRNA-Leu genes in animal mitochondrial genomes. **Journal of Molecular Evolution**, n.57, p.435–445. 2003.

HÖLLDOLBLER, B.; WILSON, E. O. **The ants**. Berlin: Springer – Verla; 1990.

HÖLLDOLBLER, B.; WILSON, E. O. Weaver ants. **Scientific American**, n.237, p.146-154. 1977.

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. **Bioinformatics**, n.17, p.754–755. 2001.

KEMPF, W. W. **Catálogo Abreviado das Formigas da Região Neotropical (Hymenoptera: Formicidae)**. Studia Ent.; 1972.

KOULIANOS, S.; CROZIER, R. H. Current intraspecific dynamics of sequence evolution differs from long-term trends and can account for the AT-richness of honeybee mitochondrial DNA. **Journal of Molecular and Evolution**, n.49, p.44–48. 1999.

KRONAUER, D. J. C.; HÖLLDOBLER, B.; GADAU, J. Phylogenetics of the new world honey ants (genus *Myrmecocystus*) estimated from mitochondrial DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolutions**, n.32, p. 416–421.2004.

- LONGINO, J. T. New species and nomenclatural changes for the Costa Rica ant fauna (Hymenoptera: Formicidae). **Mirmecologische Nachrichten**, n 8, p.131- 143. 2006.
- LOWE, T. M.; EDDY, S. R. tRNAscanSE: a program for improved detection of tRNA genes in genomic sequence. **Nucleic Acids Research**, n. 25, p.955–964. 1997.
- MACKAY, W.P. The systematics and biology of the new world carpenter ants of the hyperdiverse genus *Camponotus* (Hymenoptera: Formicidae). Unpublished observations
- MARKIN, G.P.; DILLIER, J. H.; HILL, S. O.; BLUM, M. S.; HERMANN, H. R. Nuptial flight and flight ranges of the imported fire ant *Solenopsis saevissima richteri* (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of the Georgia Entomological Society**, n.6, p.145–156. 1971.
- MARTINS, J.; SOLOMON, S. E.; MIKHEYEV, A. S.; MUELLER, U. G.; ORTIZ, A.; BACCI, M. Nuclear mitochondrial-like sequences in ants: evidence from *Atta cephalotes* (Formicidae: Attini). **Insect Molecular Biology**, n.16, p. 777-784. 2007.
- MORITZ, C.; DOWLING, T.E.; BROWN, W. M. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, n. 18, p. 269-292. 1987.
- NYLANDER, J. A. A. MrModeltest v2. **Evolutionary Biology Centre** 2004.
- PHILPOTT, S. M. Changes in arboreal ant populations following pruning of coffee shade-trees in Chiapas, Mexico. **Agroforestry Systems**, n.64, p. 219–224. 2005.
- POSADA, D.; CRANDALL, K. A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, n.14, p. 817–818. 1998.
- RAMALHO, M.O.; MARTINS, C.; MARTINS, V.G.; BUENO, O.C. Presence and distribution of *Wolbachia* and *Blochmannia* endosymbionts in colonies of *Camponotus textor* Forel, 1899 (Hymenoptera, Formicidae). (Não publicado).
- RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. N. Bold: The barcode of life data system (www.barcodinglife.org). **Molecular Ecology Notes**, n.7, p.355-364. 2007.
- ROSS, K. G.; SHOEMAKER, D. D. Species delimitation in native South American fire ants. **Molecular Ecology**, n.14, p. 3419–3438. 2005.
- ROSS, K. G.; KRIEGER, M. J. B.; KELLER, L.; SHOEMAKER, D. D. Genetic variation and structure in native populations of the fire ant *Solenopsis invicta*: evolutionary and demographic implications. **Biological Journal of the Linnean Society**, n.92, p. 541–560 2007.

SHOEMAKER, D. D.; AHRENS, M.; SHEILL, L.; MESCHER, M.; KELLER, L.; ROSS, K. G. Distribution and prevalence of *Wolbachia* infections in native populations of the fire ant *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). **Environment Entomology**, n. 32, p.1329–1336. 2003.

SHREMMER, F. Die Nahezu unbekannte neotropische weberameise *Camponotus (myrmobrachys) senex* (Hymenoptera: Formicidae). **Entomologia Generalis**, n.5, p.363-378. 1979.

SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P.; Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America**, n.87, p. 651-701. 1994.

SMITH, M.A.; FISHER, B.L. HEBERT, P. D. N. DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar. **Philosophical Transactions of the Royal Society B.**, n.360, p.1825-1834. 2005.

STREHL, C. P.; GADAU, J. Cladistic analysis of paleo-island populations of the florida harvester ant (Hymenoptera: Formicidae) based upon divergence of mitochondrial dna sequences. **Florida Entomologist**, n.84, p. 576-581. 2004.

SWOFFORD, D.L.; PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods), version 4.0. **Sinauer Associates** 1996.

WARES, J. P.; CUNNINGHAM, C. W. Phylogeography and historical ecology of the North Atlantic intertidal. **Evolution**, n.12, p. 2455–2469. 2001.

WETTERER, J.K.; SCHULTZ, T. R.; MEIER, R. Phylogeny of fungus-growing ants (Tribe Attini) based on mtDNA sequence and morphology. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, n.9, p.42-47. 1998.

XIA, X.; XIE, Z. DAMBE: data analysis in molecular biology and evolution. **Journal of Heredity**, n.92, p. 371–373. 2001.

Artigo 2

**“Presença e distribuição dos endossimbiontes *Wolbachia*
e *Blochmannia* em colônias de *Camponotus textor* Forel, 1899
(Hymenoptera, Formicidae)”.**

Resumo:

Ocorrências de endobactérias são comuns nos artrópodes. Dentre elas, pode se destacar a *Blochmannia*, a qual foi descrita primeiramente em 1887 por Blochmann em *Camponotus ligniperdus* (anteriormente *Camponotus ligniperda*) e a *Wolbachia*, cuja primeira observação se deu no mosquito *Culex pipiens*. O presente trabalho aborda um estudo sobre o hospedeiro *Camponotus textor*, que é uma formiga-tecelã comum em matas da América Central e a do Sul. Embora seja abundante, é uma espécie pouco estudada. O objetivo deste trabalho foi investigar a presença e a frequência da ocorrência das endobactérias *Wolbachia* e *Blochmannia* nas colônias de *C. textor*. Para tal, foram utilizados os pares de primers do MLST, mais o *wsp* como um marcador adicional (para *Wolbachia*), e os primers Bloch 16S-462F e Bloch 16S-1299R (para evidenciar a *Blochmannia*) como uma forma de elucidar as possíveis formas de transferências destes endossimbiontes e como eles se comportam dentro desta mesma espécie hospedeira. Indivíduos de nove colônias foram coletados em município dos estados SP, MG e BA e armazenadas no etanol 80% até a extração de DNA com TNES. A amplificação do fragmento foi realizada com o volume total de 25 μ L, contendo DNA molde, Tampão PCR, MgCl₂, dNTP's, 2 μ L primers e Taq DNA polimerase (Invitrogen). A purificação foi feita com GFX PCR and Gel Band Purification (GE Healthcare), e o sequenciamento com o BigDye Terminator (v.3.1) da Applied Biosystems, no sequenciador automático 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As seqüências foram editadas no BioEdit, e comparadas com outras depositadas no GenBank, através da ferramenta BLAST. Como ficaram evidentes múltiplas infecções de *Blochmannia*, foi necessária a clonagem para o isolamento das cepas. Todos os indivíduos analisados apresentaram infecção por *Blochmannia*, e além desse endossimbionte também foi detectado o *Candidatus Sodalis melophagi*, porém novos estudos são necessários para compreender essa relação de simbiose. A análise de *Wolbachia* permitiu a incorporação de uma cepa inédita ao banco de dados pertencente ao supergrupo A. Em relação à forma de dispersão desses endossimbiontes através do hospedeiro, ficou claro que tanto para *Wolbachia* quanto para *Blochmannia* podem ter sido transferidas verticalmente como horizontalmente.

Palavras Chaves: Endobactérias. Camponotini. Formiga-tecelã.

" Presence and distribution of *Wolbachia* and *Blochmannia* endosymbionts in colonies of *Camponotus textor* Forel, 1899 (Hymenoptera, Formicidae)."

Abstract:

Results endobacterium are common in arthropods. Among them, we can point out the *Blochmannia*, which was first described in 1887 by Blochmann in *Camponotus ligniperdus* (*Camponotus ligniperda* previously) and *Wolbachia*, whose first observation was made in the mosquito *Culex pipiens*. This paper discusses a study on the host *Camponotus textor*, who is a weaver ant common in the forests of Central America and South. Although abundant, is a little studied species. The objective of this study was to investigate the presence and frequency of occurrence of *Wolbachia* and *Blochmannia* endobacterium in colonies of *C. textor*. For this purpose, we used the primer pairs of MLST, and additional *wsp* as a marker (for *Wolbachia*), and primers 462F and Bloch 16S-16S Bloch-1299R (to show the *Blochmannia*) as a means to elucidate the possible forms transfer of endosymbionts and how they behave within this same host species. Individuals from nine colonies were collected in the city of states SP, MG and BA and stored in 80% ethanol until DNA extraction with TNES. The fragment amplification was performed with a total volume of 25 μ L containing template DNA, PCR buffer, MgCl₂, dNTP's, 2 μ L primers and Taq DNA polymerase (Invitrogen). Purification was performed using GFX PCR and Gel Band Purification (GE Healthcare) and sequencing with the BigDye Terminator (v.3.1) from Applied Biosystems, at 3130 Genetic Analyzer automated sequencer (Applied Biosystems). Sequences were edited in BioEdit, and compared with other GenBank through BLAST tool. As became evident *Blochmannia* multiple infections, cloning was necessary for the isolation of the strains. All individuals analyzed presented *Blochmannia* infection, and beyond that was also detected the endosymbiont *Candidatus Sodalis melophagi*, but further studies are needed to understand this symbiotic relationship. *Wolbachia* analysis allowed the incorporation of a novel strain belonging to the database to supergroup A. Regarding the form of dispersion of these endosymbionts by the host, it was clear that for both *Wolbachia* as *Blochmannia* for may have been moved vertically and horizontally.

Keys Word: Endobacterium. Camponotini. Weaver-ant.

1-Introdução

Relações de simbioses entre insetos e bactérias são frequentemente encontrados nas ordens Coleoptera, Blattaria, Homoptera e Hymenoptera (BUCHNER, 1965; DASCH; WEISS; CHANG, 1984; DOUGLAS, 1989). Os microorganismos, nessas interações simbióticas, parecem estar envolvidos nos processos metabólicos, como por exemplo, disponibilizando aminoácidos essenciais e vitaminas, ou ainda auxiliando na reciclagem do nitrogênio do ácido úrico para seus hospedeiros (BAUMANN et al., 1995; COCHRAN, 1985; DOUGLAS, 1998; HEDDI et al., 1999; NOGGE, 1982), mas podem também trazer alguns prejuízos ao hospedeiro, como manipular sua reprodução (STOUTHAMER et al., 1993; WERREN, 1997; WERREN.; BALDO; CLARK, 2008).

A ocorrência de endobactérias, ou seja, bactérias intracelulares são comuns nos artrópodes, possuindo uma taxa média de infecção de 76% de insetos (JEYAPRAKASH; HOY, 2000). Dentre elas, pode se destacar a *Blochmannia*, a qual foi descrita primeiramente em 1887 por Blochmann em tecidos de ovários e intestino de *Camponotus ligniperdus* (anteriormente *Camponotus ligniperda*; BOLTON, 1996) (BLOCHMANN, 1887) e a *Wolbachia*, cujo primeiro registro foi nos tecidos reprodutivos do mosquito *Culex pipiens* (HERTIG; WOLBACH, 1924).

Existem dois tipos de interação molecular entre as bactérias simbiontes e seus hospedeiros: a primária e a secundária. A interação primária caracteriza-se por associações especializadas, descendentes de um ancestral, cujas árvores filogenéticas dos simbiontes são congruentes com a dos seus hospedeiros em períodos longos do processo evolutivo (MUNSON et al., 1991; LO et al., 2007; BAUMANN, 2005; WU et al., 2006). Também podem ocasionar alterações no genoma bacteriano e o simbiote pode estar localizado em algum órgão especializado no interior do hospedeiro. Um bom exemplo para formigas é a *Blochmannia* (GIL et al., 2004; DEGNAN; LAZARUS; WERNEGREN, 2005), a qual é considerada uma Gama- Proteobactéria, com estreitas relações filogenéticas com *Escherichia coli* (GOMEZ – VALERO et al., 2004).

A bactéria *Blochmannia* foi identificada pela primeira vez em *Camponotus* (BLOCHMAN, 1882), ocorrendo no interior de uma célula especializada denominada de bacteriócito. Acredita-se que a bactéria

desempenhe um papel nutricional para o hospedeiro ao fornecer alguns aminoácidos essenciais (FELDHAAR et al., 2007) e isto se dá mais intensamente no início da vida (WOLSCHIN et al., 2004; GIL, 2003; DEGNAN; LAZARUS; WERNEGREEN, 2005). Contudo, o papel nutricional da *Blochmannia* não é o único aspecto a se destacar da interação com o seu hospedeiro, pois ela possui genes necessários para contribuir para o metabolismo de nitrogênio, enxofre, e de lipídeos (GIL et al., 2003; DEGNAN; LAZARUS; WERNEGREEN, 2005; WILLIAMS; WERNEGREEN, 2010).

Apesar da redução do seu genoma, a *Blochmannia* mantém os genes para funções celulares básicas como a biossíntese de nove aminoácidos essenciais (exceto Arginina), além de cofatores e enzimas de urease, as quais permitem que o simbiote recicle o nitrogênio da ureia (FELDHAAR et al., 2007; DE SOUZA et al., 2009; FAN et al., 2012).

Estudos compararam o perfil de transcrição de *Blochmannia floridanus* em diferentes estágios de desenvolvimento do seu hospedeiro (*Camponotus floridanus*), usando as técnicas de genoma completo e PCR Quantitativa “Real time” (STOLL; FELDHAAR; GROSS, 2009; ZIENTZ et al., 2006). Esses estudos confirmaram que ocorre variação no transcriptoma nas diferentes fases do desenvolvimento do hospedeiro. Os genes (chamados simbióticos) que codificam proteínas envolvidas no metabolismo básico possuem expressão elevada nas primeiras fases larvais (STOLL; FELDHAAR; GROSS, 2009; ZIENTZ et al., 2006).

Outras características da biologia da *Blochmannia* sugerem que também pode ocorrer a transmissão horizontal entre os hospedeiros. Os bacteriócitos que possuem a *Blochmannia* encontram-se entre as células epiteliais do intestino médio de formigas (BUCHNER, 1965; SCHRODER et al., 1996; SAUER et al., 2000, 2002). E essa proximidade com intestino médio pode conferir às bactérias maiores oportunidades para serem transferidas horizontalmente entre espécies (por exemplo, por meio de secreções corporais) (DEGNAN et al., 2004).

A interação secundária normalmente é facultativa, podendo ser benéfica ou não, ou seja, desde patógenos até mesmo a própria *Wolbachia*.

SHOEMAKER, KELLER e ROSS (2003) acreditam que ela seja um dos principais simbiosomas de insetos, uma vez que estimativas sugerem que milhões de espécies podem estar infectadas. As formigas, por sua vez, tiveram enorme expansão durante sua evolução, propiciando interação com diversos táxons, portanto, elas podem ter adquirido *Wolbachia* através de diversas formas de parasitoides (DEDEINE et al., 2005).

Observada pela primeira vez no mosquito *Culex pipiens*, a cepa de *Wolbachia* foi então designada como *Wolbachia pipiens*, (HERTIG, 1924). Entretanto, devido à variação genética ainda não interpretada completamente nas diferentes ordens de insetos onde ocorrem, os autores têm optado por não adotarem essa nomenclatura, referindo-se a esta apenas como *Wolbachia* e quando necessário completar com o táxon do inseto (WERREN; BALDO; CLARK, 2008).

As diferentes cepas de *Wolbachia* são classificadas de acordo com a análise filogenética dos genes 16S rDNA, *wsp* e *ftsZ*, definindo supergrupos A, B, C, D, E, e F, sendo A e B cepas encontradas em artrópodes, C e D em nematóides, e E e F em Collembola, artrópodes e nematóides (FENN; BLAXTER, 2004), G em aranhas (ROWLEY; RAVEN; MCGRAW, 2004) e H em cupins (BORDENSTEIN; ROSENGAUS, 2005).

Wolbachia é uma endobactéria Gram negativa da classe Alpha Proteobacteria, ordem Rickettsiales, não cultivável fora da célula do hospedeiro, portanto, de difícil estudo. Com o avanço dos métodos moleculares, principalmente com o uso da PCR (Reação de Polimerização em Cadeia), tornou-se possível análises aprofundadas dessa bactéria.

Para confirmação inicial da *Wolbachia* foi previamente desenvolvido um par de primer a partir do gene de uma proteína de superfície, o *wsp* (ZHOU; ROUSSET; O'NEILL, 1998), mas devido à taxa elevada de recombinação (BALDO; LO; WERREN, 2005; WERREN et al., 2001) e forte seleção de diversificação (BALDO et al., 2002; JIGGINS; HURST; YANG, 2002), atualmente tornou-se inadequado a utilização desse gene marcador sozinho. A abordagem de “*multigene typing*” tem sido muito utilizada para cepas de *Wolbachia*, conhecido também como MLST- *Multilocus Sequence Typing*

(PARASKEVOPOULOS et al., 2006). Essa ferramenta tem fornecido hipóteses sobre o movimento global desta bactéria dentro das comunidades de insetos. Os novos genes analisados no MLST são *ftsZ*, *coxA*, *fbpA*, *gatB* e *hcpA*. E como um marcador molecular adicional, o *wsp* tem sido utilizado após as análises com MLST (BALDO et al., 2006a).

A técnica descrita por Baldo et al. (2006a) tem sido uma importante ferramenta para a caracterização das cepas, mas ainda não soluciona todas as questões: o uso de primers específicos de supergrupos e seu sequenciamento direto são impraticáveis em indivíduos que abrigam mais de uma cepa do mesmo supergrupo devido à leitura ambígua das sequências (RAYCHOUDHURY et al., 2009). Mesmo a clonagem para a separação dos alelos não resolveria o problema para a atribuição das “sequence type” (ST), a qual é equivalente a um haplótipo, limitando assim a aplicação dos genes MLST para indivíduos que abrigam não mais do que uma cepa por supergrupo A e B (RAYCHOUDHURY et al., 2009; BALDO et al., 2006a).

Outras metodologias para resolver essa questão estão sendo abordadas, como por exemplo: a separação artificialmente das cepas por transinfecção (ZABALOU et al., 2004; MERÇOT; POINSOT, 1998), tratamento com antibiótico (DEDEINE et al., 2001; KOUKOU et al., 2006), cultura de células (O'NEILL et al., 1997), ou ainda a recente abordagem de Análise de Intersecção de Alelo (AIA) (ARTHOFER et al., 2011). Contudo o presente trabalho optou, a princípio, em dar continuidade com as análises que apresentaram infecção simples ou ainda infecção dupla, se ocorresse uma cepa pertencente ao supergrupo A e outra ao supergrupo B, como descrito no protocolo no site <http://pubmlst.org/wolbachia/>.

A transmissão de *Wolbachia* quando ocorre verticalmente pode acarretar diversos efeitos em seus hospedeiros, como: partenogênese, morte dos machos, feminização, adaptação local, especiação e incompatibilidade citoplasmática (IC) (STOUTHAMER; BREEUWER; HURST, 1999) além de auxiliar na nutrição de percevejos com suplementação de vitamina B (HOSOKAWA et al., 2010) . A IC tem sido relacionada com alterações na

sincronia das divisões endomitóticas dos núcleos masculino e feminino, resultando na inviabilidade do embrião (TRAM ; SULLIVAN, 2002).

A IC pode causar a inviabilidade dos embriões a partir de cruzamentos unidirecional e bidirecional. O cruzamento de macho infectado e fêmea não infectada não gera descendente, entretanto a situação inversa permite o desenvolvimento da prole. Quando ocorrem cepas distintas em um indivíduo o cruzamento também não pode não gerar prole, mas fêmeas com mais de uma cepa possuem uma maior vantagem, pois conseguem cruzar e gerar descendente mais facilmente (BARR, 1980; ROUSSET; RAYMOND, 1991).

As alterações reprodutivas induzidas nos hospedeiros podem trazer vantagem para a bactéria, pois o aumento de indivíduos infectados garantirá a transmissão da *Wolbachia* para as gerações futuras (CASPARI; WATSON, 1959; FINE, 1978; TURELLI, 1994; WERREN; O' NEILL, 1997).

O rápido aumento de *Wolbachia* dentro de uma população hospedeira pode ser promovido pela IC, e pode gerar isolamento reprodutivo, que posteriormente, pode levar à especiação (FENN; BLAXTER, 2004).

A *Wolbachia* pode interferir nos processos biológicos, ecológicos e evolutivos do hospedeiro e por isso tem atraído muitos interesses com o objetivo de desenvolver novas estratégias para controle de insetos pragas e vetores de doenças (KAMBRIS et al., 2009; BOURTZIS, 2008). A indução de IC por *Wolbachia* (naturalmente ou em laboratório) tem sido sugerida como uma ferramenta para abolir pragas agrícolas e vetores de doenças (STOUTHAMER; BREEUWER; HURST, 1999, XI; KHOO; DOBSON, 2005; BOURTZIS, 2008; ZABALOU et al., 2009; APOSTOLAKI et al., 2011).

Contudo, a ampla taxa de hospedeiros infectados não pode ser explicada apenas pela transmissão vertical, levando à hipótese de que ocorra transferência horizontal também, embora os mecanismos deste processo ainda não estejam totalmente esclarecidos (WERREN et al., 1995).

Estudos que utilizaram os genes do *wsp* e do *ftsZ* para análise de *Wolbachia*, tem encontrado incongruências entre as filogenia de hospedeiros e do endossimbionte, fazendo com que os pesquisadores assumissem que a

transmissão horizontal de *Wolbachia* entre diferentes espécies de hospedeiros pode ter ocorrido diversas vezes (BOUCHON; RIGAUD; JUCHAULT, 1998; CORDAUX; MICHEL-SALZAT; BOUCHON, 2001; KITTAYAPONG et al., 2003; SCHILTHUIZEN; STOUTHAMER, 1997; WERREN; WINDSOR; GUO, 1995; ZHOU; ROUSSET; O'NEILL, 1998; MARTINS; SOUZA; BUENO, 2012). Com uma metodologia mais atual (MLST), estudos realizados com aranhas e formigas revelaram a mesma topologia, confirmando que a filogenia da *Wolbachia* e do hospedeiro apresentou-se incongruente (BALDO et al., 2008; FROST et al., 2010); ou seja, cepas iguais ou ainda relacionadas tem sido encontradas em diferentes espécies de hospedeiros que compartilham o mesmo nicho ecológico ou ainda possuem interações hospedeiro-parasita ou presa-predador (KITTAYAPONG et al., 2003; STAHLHUT et al., 2010). Todavia, há também alguns casos em que as filogenias de *Wolbachia* e hospedeiro baseadas em genes MLST concordaram, sugerindo que a transferência vertical de um ancestral comum também pode ocorrer (JAENIKE et al., 2010; KAWASAKI et al., 2010). Watanabe et al. (2012) através dessas análises em insetos do gênero *Orius* também encontrou evidências tanto de transferência vertical como horizontal.

O presente trabalho aborda um estudo sobre o hospedeiro *Camponotus textor* que é uma formiga tecelã comum em matas da América Central e a do Sul. Embora sejam abundantes, existem poucos estudos sobre esta espécie no Brasil. Em geral, os estudos existentes sobre *C. textor* descrevem o comportamento de tecelagem e a construção de ninhos (SCHREMMER, 1979)

Santos e Del-Claro em 2009 abordaram o comportamento e ecologia dessa formiga evidenciando que *C. textor*, assim como outras tecelãs, utiliza grande parte do tempo na construção e manutenção de seus ninhos; porém, realiza maior investimento na produção do que as demais formigas tecelãs. O fato de serem poligínicas e possuir abundância no número de operárias indica que o ninho pode se fragmentar em ninhos satélites, minimizando a taxa de mortalidade causada por fatores bióticos e abióticos (SANTOS; DEL-CLARO, 2009).

Estudos recentes revelaram que as larvas produzem seda apenas no último instar. Esta seda é utilizada tanto para a construção do ninho, como do próprio casulo da pupa. Nesse último evento, a larva não se alimenta mais de dieta sólida, indicando que a necessidade energética para a metamorfose já foi estocada. Com auxílio do microscópio eletrônico de varredura foi possível uma melhor visualização de características morfológicas, desta maneira, foi evidenciado que a espécie em questão é polimórfica, diferente do que foi proposto por Wheeler em 1915 (ZARA; BUTION; CAETANO, 2010).

Com exceção desses estudos, não há na literatura dados consistentes sobre hábitos alimentares, biologia e ecologia comportamental deste grupo. Portanto o objetivo deste trabalho foi investigar a presença e a frequência da ocorrência das endobactérias *Wolbachia* e *Blochmannia* nas colônias de *C. textor*, utilizando os pares de primers do MLST (incluindo os seguintes genes *ftsZ*, *gatB*, *coxA*, *hcpA* e *fbpA*), mais o *wsp* como um marcador adicional (para *Wolbachia*), e os primers Bloch 16S-462F e Bloch 16S-1299R (para evidenciar a *Blochmannia*). O intuito é elucidar as possíveis formas de transferências destes endossimbiontes e como eles se comportam dentro desta mesma espécie hospedeira.

2-Material e métodos

2.1 - Coletas e identificação

Operárias de *Camponotus textor* (Forel, 1899) foram coletadas de nove colônias de diferentes localidades do Brasil (Tabela 1 e Figura 1). O material foi preservado em etanol 80% e mantido a -20° C até a extração do DNA. Os espécimes foram identificados pelo Dr. Jaques Delabie e depositados em sua coleção no Laboratório de Mirmecologia - Convênio UESC/CEPLAC Centro de Pesquisas do Cacau – CEPEC- CEPLAC (Voucher #5692).

Cidades	Coordenadas
Rio Claro (SP)	22° 23' 42.3" S

	47° 32' 33.4" O
São João da Boa Vista (SP)	21° 58' 10" S 26° 47' 56" O
Santa Rita do Passa Quatro (SP)	21° 42' 3,52" S 47° 29' 22.35" O
Araraquara I (SP)	21° 43' 29.04" S 48° 1' 7.49" O
Araraquara II (SP)	21° 48' 47.38" S 48° 12' 7.11" O
Ribeirão Preto (SP)	21° 12' 42" S 47° 48' 24" O
Uberlândia I (MG)	18° 53' 9.7" S 48°15' 39" O
Uberlândia II (MG)	18° 53' 0,64" S 48° 15' 34,35" O
Ilhéus (BA)	14° 18' 45" S 39° 53° 13" O

Tabela 1- Locais de coleta de *C. textor* para a realização deste trabalho e sua respectiva coordenada geográfica.

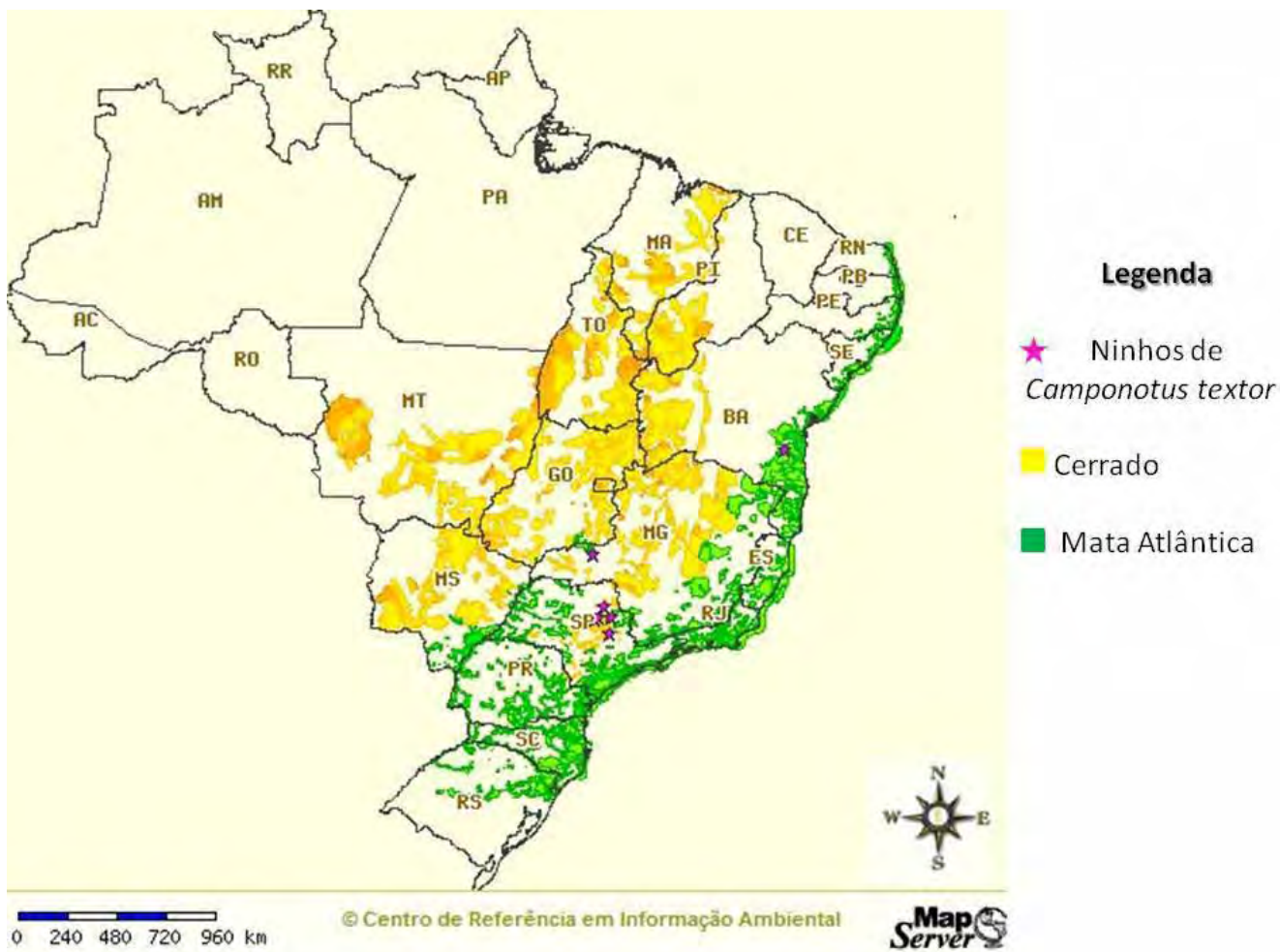


Figura 1- Localidades de coleta das colônias estudadas. A Tabela 1 detalha os locais. Mapa: speciesMapper, 2009.

2.2- Extração do DNA total, Amplificação e Sequenciamento

O DNA foi extraído individualmente de oito operárias de cada colônia e preservadas em etanol 80% conforme descrito em FROST et al. (2010). Os tecidos dissociados foram incubados em uma solução de lise celular (100 mM Tris, pH 9.1, 100 mM NaCl, 200 mM sacarose, 50mM EDTA, 0,5% SDS) à 55°C por 3 horas; subsequentemente, resíduos proteicos foram precipitados com NaCl 5M e centrifugados a 16,000 g por 5 minutos; o sobrenadante que contém o DNA foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL contendo 600 µL de isopropanol 100% e então misturados por inversão e centrifugados a 16,000 g por 5 minutos. Após remoção do sobrenadante, foram adicionados 600 µL de etanol 70% ao tubo e invertidos gentilmente. O material foi então centrifugado a 16,000 g por 3 minutos. O etanol foi removido e o pelete contendo DNA foi

seco por 10 minutos na DNA 120 SpeedVac® da Thermo Savant. O DNA foi ressuspendido em 30 µL de TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH-8).

Para a amplificação do fragmento foi usado o kit da Invitrogen. O volume da reação de PCR foi de 25 µl, contendo 2 µl DNA molde, 5 µl Tampão, 2,5 µl MgCl₂, 1 µl dNTP's, e 0,13 µl Taq DNA polimerase, e água Mili-Q. Todos os ciclos de PCR para identificação da *Wolbachia* foram 94 ° C durante 2 min, 37 ciclos de 94 ° C por 30 seg, temperatura de anelamento por 45 seg (54°C para hcpA, gatB, ftsZ e coxA e 59°C para fbpA e wsp), 72 ° C durante 1,5 min, terminando com 10 min a 72 ° C. Os ciclos de PCR para a identificação da *Blochmannia* foram 94°C durante 2 min, 30 ciclos de 95°C por 20 seg, 60°C por 50 seg e 72°C por 1,5 min, finalizando com 72°C por 5 min.

2.2.1 - Primers para identificação de *Wolbachia*

Primeiramente dois pares de primers foram utilizados para verificar a presença de *Wolbachia* nos indivíduos e a porcentagem de infecção dentro de cada colônia. Um deles foi o controle: EF1α-532F (5' AGGCAAATGTCTTATTGAAG - 3') e EF1α-610R (5' - GCGGGTGCGAAGGTAACAAC - 3') (SHOEMAKER et al., 2000) que amplifica um fragmento de 400 pb do gene nuclear EF1α (fator de alongação). O outro par é aquele que amplifica um fragmento variável de um gene que codifica uma proteína de superfície da bactéria, com cerca de 600 pb, denominado *wsp81F* (5' - TGGTCCATTAAGTGATGAAGAAAC - 3') e *wsp691R* (5' - AAAAATTAACGCTACTCCA - 3') (BRAIG et al., 1998; ZHOU; ROUSSET; O'NEILL, 1998).

Entretanto, Baldo, Lo, e Werren (2005) e Werren et al. (2001) evidenciaram recombinação deste gene o tornando inadequado para uma caracterização confiável da cepa se usado isoladamente. Adicionalmente, houve também a detecção de recombinação entre genes de *Wolbachia* (BALDO et al., 2006b) sugerindo que uma abordagem de caracterização de um único locus pode não revelar a verdade. Uma metodologia multigênica- *Multilocus Sequence Typing* (MLST) foi utilizada após a confirmação da infecção com o *wsp* para caracterização de cepas de *Wolbachia*, a qual utiliza

cinco genes: *gatB*, *coxA*, *hcpA*, *fbpA* e *ftsZ*. Estes genes têm uma única cópia dentro o genoma da *Wolbachia* e são estáveis, por isso não são tão propensos à recombinação. Além disso, eles estão espalhados por todo o genoma da *Wolbachia* o que significa que um evento de recombinação é improvável (BALDO et al., 2006a).

2.2.2 - Primers para identificação de *Blochmannia*

Para a detecção de *Blochmannia* foram utilizados os primers Bloch16S-462F 5-AAACCCTGATGCAGCTATACCGTGTGTG- 3',e Bloch16S- 1299R 5'-CCATTGTAGCACGTTTGTAGCCCTACTCA-3' (WERNEGREN et al., 2009) que foram desenvolvidos através de sequências 16S já depositadas no GenBank.

A purificação do produto da PCR foi realizada através do kit GFX PCR and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare), seguindo o protocolo do fabricante. As amostras foram quantificadas em NanoDrop 2000 Thermo Scientific – Uniscience e a reação de sequenciamento foi realizada fazendo uso do kit de reagentes denominado BigDye Terminator (v.3.1) da Applied Biosystems, de acordo com as recomendações do fabricante. Todos os amplicons foram sequenciados em ambas as direções. A leitura das sequências foi feita pelo sequenciador automático 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

2.3 - Análises das sequências –MLST *Wolbachia*

As sequências geradas através dos primers *wsp* foram editadas e cortadas no software *Bioedit Sequence Alignment Editor Copyright 1997-2011* (HALL,1999) e alinhadas com a ferramenta ClustalW (HIGGINS; BLEASBY; FUCHS, 1992) para a confirmação da infecção de *Wolbachia* simples ou múltipla de cada colônia.

Uma vez confirmada à infecção simples, iniciou-se a abordagem MLST de *Wolbachia* de acordo com recomendações do protocolo de infecção simples disponível no site <http://pubmlst.org/wolbachia/>. As análises foram realizadas sempre em triplicata (três indivíduos por colônia). As colônias que apresentaram duplas infecções seguiram de acordo com o protocolo diferencial

também já descrito mesmo site, para verificar se estas cepas seriam uma do supergrupo A e outra do supergrupo B, o que possibilitaria o uso do MLST para dupla infecção. As colônias que apresentaram mais de uma cepa por supergrupo foram, a princípio, excluídas deste trabalho.

Os alelos de cada gene foram separadamente comparados com os depositados no site para a confirmação posterior da ST (*Sequence Type*) na análise concatenada.

As sequências geradas pelos primers *wsp* foram adicionalmente comparadas com as demais depositadas no banco de dados *wsp-Wolbachia* (http://pubmlst.org/perl/mlstdbnet/agdbnet.pl?file=wo_wsp.xml).

2.3.1 -Bioinformática MLST-*Wolbachia*

Com o PAUP 4.0 (SWOFFORD, 1996) foi realizada a análise de máxima parcimônia (Busca Heurística, 2000 réplicas- bootstrap), com o objetivo de verificar a filogenia das diferentes “STs” de formigas já depositadas no banco de dados assim como compará-las com a ST encontrada neste trabalho.

Com o programa Network 4.5.10, obteve-se a análise da rede de haplótipos usando o método *median-joining*. (BANDELT; FORSTER; RÖHL, 1999).

Número e posição de substituições sinônimas e não sinônimas, inserções e deleções, assim como as transições e transversões foram identificadas através do programa DAMBE (XIA; XIE, 2001).

2.4 -Análises das sequências –*Blochmannia*

As sequências geradas foram editadas e cortadas no software *Bioedit Sequence Alignment Editor Copyright 1997-2011* (HALL, 1999) e alinhadas com a ferramenta ClustalW (HIGGINS; BLEASB; FUCHS, 1992). Verificaram-se múltiplas infecções no eletroferograma, sendo necessária a técnica de clonagem para o isolamento de cada sequência.

2.4.1 -Clonagem – *Blochmannia*

A presença de ruídos no eletroferograma da sequência exigiu a clonagem gênica dessas amostras. Para tal procedimento foi utilizado um kit comercial para clonagem de produtos da purificação da PCR da Promega

denominado pGEM- T Vector Sytem I. Foram utilizados os produtos diretos da purificação da PCR, que eram então inseridos no vetor de clonagem seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante do kit.

As reações de miniprep foram feitas de acordo com Zhou et al. (1990), e as reações de sequenciamento foram preparadas conforme descrição anterior.

2.4.2- Bioinformática- *Blochmannia*

Com o PAUP 4.0 (SWOFFORD, 1996) foi realizada a análise de máxima parcimônia interespecífica (Busca Heurística, 2000 réplicas- bootstrap) da cepa que apareceu com maior frequência na clonagem, com o objetivo de testar a co-evolução filogenética do COI do hospedeiro e do endossimbionte encontrado, conforme já descrito diversas vezes na literatura (MUNSON et al., 1991; LO et al., 2007; BAUMANN, 2005; WU et al., 2006).

Com o programa Network 4510, obteve-se a análise da rede de haplótipos usando o método *median-joining*. (BANDELT; FORSTER; RÖHL, 1999).

Número e posição de substituições sinônimas e não sinônimas, inserções e deleções, assim como as transições e transversões foram identificadas através do programa DAMBE para análises dentro da mesma espécie (intraespecífica) (XIA; XIE, 2001).

3-Resultados

3.1 - *Wolbachia*

Todas as colônias analisadas apresentaram indivíduos infectados com *Wolbachia* de acordo com os primers *wsp*, variando apenas a porcentagem de infecção dentro da colônia (Ver Figura 2). Pela análise do eletroferograma foi possível a verificação da infecção simples e da infecção dupla. As únicas colônias que obtiveram a infecção simples foram a de Santa Rita do Passa Quatro (SP) e a de São João da Boa Vista (SP) nas quais se aplicaram a metodologia já descrita para o MLST de infecção simples. Para as outras colônias, posteriormente à análise do MLST para dupla infecção, verificamos que havia mais de uma cepa do supergrupo A, impossibilitando a análise por esse método à priori.

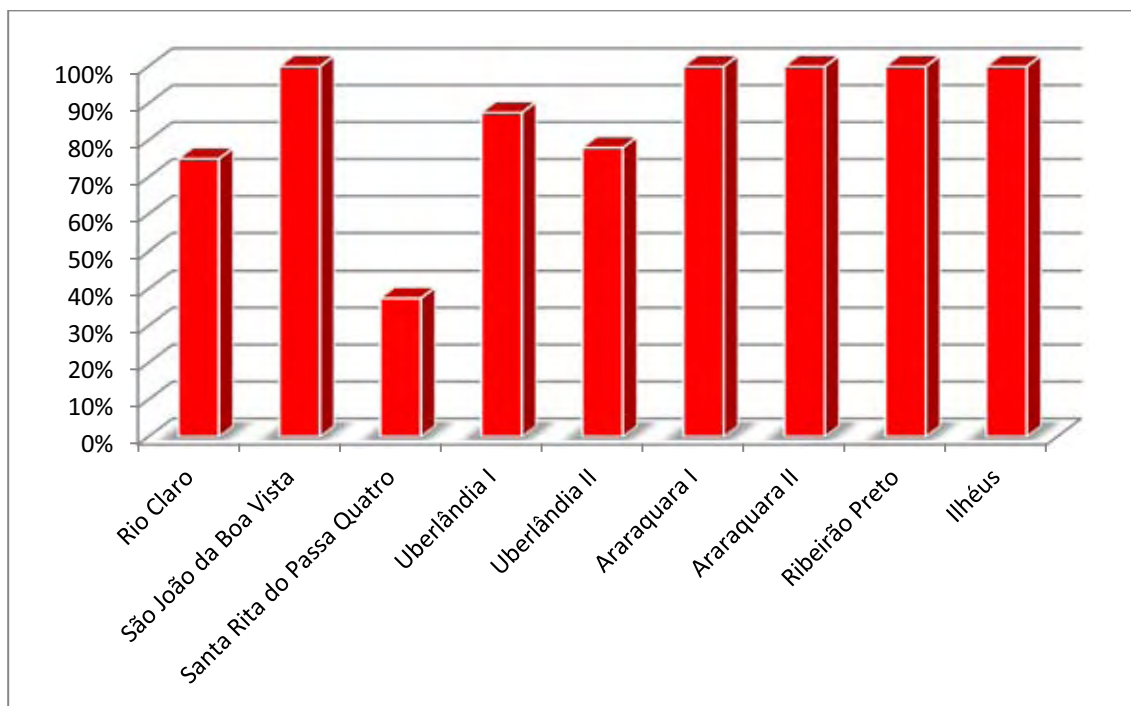


Figura 2- Porcentagem de infecção de *Wolbachia* das colônias analisadas neste trabalho. Note que todas as colônias apresentaram a infecção, variando apenas a quantidade.

3.1.1- Identificação - *Wolbachia*

Após o sequenciamento de todos os genes do MLST das colônias que apresentaram a infecção simples (em triplicata para verificar se havia variação), foi necessária a comparação com as sequências já depositadas no banco de dados de MLST de *Wolbachia*.

Todos os alelos foram identificados para posteriormente designar a ST equivalente das sequências concatenadas. Não houve nenhuma variação dentro da espécie (mesmos alelos para Santa Rita do Passa Quatro (SP) e São de João da Boa Vista (Figura 3). Entretanto, houve a incorporação de um alelo ao banco de dados – o *coxA* alelo 185, o que resultou em um inédito ST (ST 347) também obtido neste trabalho.

As sequências geradas pelo *wsp* foram incluídas como análise adicional, a qual permitiu também a identificação das regiões hipervariáveis (HVR1 – alelo 37; HVR2 – alelo 38; HVR3 – alelo 41 e HVR4 – alelo 37). Não houve nenhuma variação entre as colônias analisadas, garantindo 100% de similaridade com o alelo 58 - *wsp* (Figura 3).

Full information on strain Ctex_A					
id	558				
strain	Ctex_A				
supergroup	A				
host infection status	single infection				
host common name	weaver ant				
host genus	Camponotus				
host species	Camponotus textor				
host family	Formicidae				
host order	Hymenoptera				
host class	Insecta				
host phylum	Arthropoda				
host phenotype	other				
lab strain provider	Manuela de Oliveira Ramalho Universidade Estadual Paulista, Unesp Rio Claro				
country	Brazil				
state or province	SP				
locality	Rio Claro				
host determined by	Manuela de Oliveira Ramalho Universidade Estadual Paulista, Unesp Rio Claro				
collected by	Manuela de Oliveira Ramalho Universidade Estadual Paulista, Unesp Rio Claro				
sender	Manuela de Oliveira Ramalho Universidade Estadual Paulista, Unesp Rio Claro				
curator	Amanda Avery	University of Rochester, Dept. of Biology	amanda.r.avery@rochester.edu		
date entered	2012-12-13				
datestamp	2012-12-13				
wsp	58 [link to pubmlst.org]				
HVR1	37	TKVDGITNATGKENDSPLKASFIAGGGAFGYKM [link to pubmlst.org]			
HVR2	38	DDIRVDVEGLYSLSKDTTIINTSETNVADCLTAFSGLVNVYYDIAIE [link to pubmlst.org]			
HVR3	41	DMPITPYVGVGVGAAYISNPSKVDVAVKQDRGFGFAYQAKAGVSYDVTPEIK [link to pubmlst.org]			
HVR4	37	LYAGARYFGSYGASFDKAVKDDAAIKKV [link to pubmlst.org]			
allelic profile	gatB	coxA	hcpA	ftsZ	fbpA
	3	185	210	37	46
ST	347				

Figura 3- Informações obtidas do banco de dados de *Wolbachia* sobre as sequências inéditas identificadas neste trabalho. Note que possui informações sobre alelos do gene *wsp* e do MLST encontrados em *Camponotus textor*.

Para obtenção de um panorama geral, todas as sequências disponíveis de formigas já depositadas no banco de dados MLST-*Wolbachia* foram incluídas nas análises posteriores (Ver Tabela 2 com informações das sequências obtidas do banco de dados).

Haplótipos	ID	Gênero Hospedeiro	Espécie do Hospedeiro	Supergrupo	ST
H_1	113	<i>Anoplolepis</i>	<i>gracillipes</i>	A	52
H_1	119	<i>Lophomyrmex</i>	-	A	52
H_2	125	<i>Pheidole</i>	<i>sauberi</i>	A	19
H_2	115	<i>Leptomyrmex</i>	-	A	19
H_2	146	<i>Ocymyrmex</i>	<i>picardi</i>	A	19
H_2	147	<i>Ocymyrmex</i>	<i>picardi</i>	A	19
H_2	124	<i>Pheidole</i>	<i>plagiara</i>	A	19
H_2	111	<i>Technomyrmex</i>	<i>albipes</i>	A	19
H_3	121	<i>Pheidole</i>	<i>vallicola</i>	A	58
H_4	114	<i>Notoncus</i>	-	A	53
H_5	134	<i>Odontomachus</i>	<i>clarus</i>	A	111
H_6	139	<i>Pheidole</i>	<i>vistana</i>	A	116
H_7	108	<i>Metapone</i>	<i>madagascaria</i>	A	48
H_8	116	<i>Myrmecorhynchus</i>	-	A	54
H_9	141	<i>Pheidole</i>	-	A	118

H_10	105	<i>Stenammas</i>	<i>snellingi</i>	A	45
H_11	110	<i>Polyergus</i>	<i>breviceps</i>	A	50
H_12	106	<i>Azteca</i>	-	A	46
H_13	135	<i>Ochetellus</i>	<i>glaber</i>	A	112
H_14	129	<i>Dorymyrmex</i>	<i>elegans</i>	A	63
H_15	138	<i>Pheidole</i>	<i>micula</i>	A	115
H_16	103	<i>Formica</i>	<i>occulta</i>	A	43
H_17	122	<i>Rhytidoponera</i>	<i>metallica</i>	A	59
H_18	104	<i>Pseudomyrmex</i>	<i>apache</i>	A	44
H_19	137	<i>Pheidole</i>	<i>coloradensis</i>	A	114
H_20	144	<i>Crematogaster</i>	-	A	121
H_21	112	<i>Polyrhachis</i>	<i>vindex</i>	A	51
H_22	120	<i>Camponotus</i>	<i>leonardi</i>	A	57
H_23	109	<i>Myrmica</i>	-	A	49
H_24	143	<i>Aenictus</i>	-	A	120
H_25	4	<i>Camponotus</i>	<i>pennsylvanicus</i>	A	33
H_26	107	<i>Wasmannia</i>	-	A	47
H_27	140	<i>Pheidole</i>	<i>obtusospinosa</i>	A	117
H_28	117	<i>Pheidole</i>	<i>minutula</i>	A	55
H_29	2	<i>Solenopsis</i>	<i>invicta</i>	A	29
H_30	127	<i>Pheidole</i>	-	A	61
H_31	558	<i>Camponotus</i>	<i>textor</i>	A	347
H_32	201	<i>Eurema</i>	<i>mandarina</i>	B	40
H_33	314	<i>Macrosteles</i>	<i>fascifrons</i>	B	216
H_34	194	<i>Colias</i>	<i>elate poliographus</i>	B	141
H_35	313	-	-	B	215
H_36	220	<i>Eurema</i>	<i>hecabe</i>	B	41
H_37	154	-	-	B	129
H_38	37	<i>Brugia</i>	<i>malayi</i>	D	35
H_39	43	<i>Opisthophthalmus</i>	<i>capensis</i>	F	62

Tabela 2- Sequências de *Wolbachia* e suas informações depositadas no banco de dados que foram incluídas nas análises. No detalhe, a cepa de *Wolbachia* encontrada em *Camponotus textor*, identificada neste trabalho.

3.1.2 – *Wolbachia* - Máxima Parcimônia

A análise de máxima parcimônia (MP) incluiu sequências concatenadas pertencentes aos Supergrupos A e B para a comparação com a ST 347 identificada neste trabalho (Busca Heurística, 2000 réplicas- bootstrap). A ST 347 ficou mais relacionada com outras STs pertencentes ao supergrupo A, caracterizando assim a nova cepa (Ver Figura 4). Os valores apresentados nas ramificações da figura representam o bootstrap. A árvore foi enraizada com as sequências pertencentes aos Supergrupos D e F depositados no banco de dados MLST- *Wolbachia*. Os clados dos Supergrupos A e B ficaram separados sob um valor de bootstrap de 100, conforme esperado.

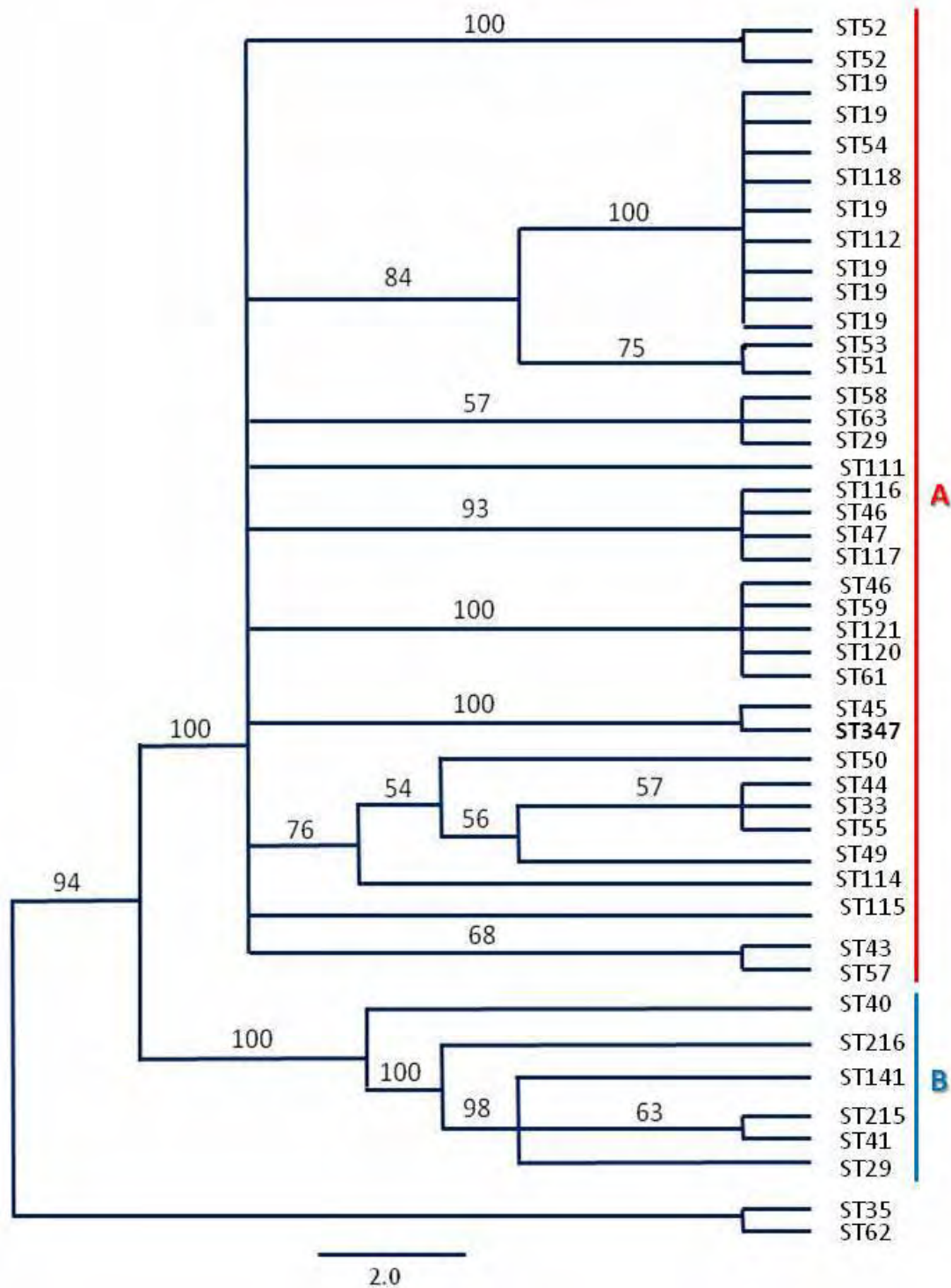


Figura 4- Análise de Máxima Parcimônia das sequências já depositadas no Banco de dados MLST-*Wolbachia* (Busca Heurística, 2000 réplicas- bootstrap). Note que a ST 347 ficou mais relacionada com o clado do supergrupo A, caracterizando assim a cepa.

3.1.3 – Rede de Haplótipos – *Wolbachia*

Foram acrescentadas na rede de haplótipos (Figura 5) as sequências pertencentes aos Supergrupos A, B, D e F para a comparação com a ST 347 identificada neste trabalho (Ver Tabela 2 com informações destas sequências e seus haplótipos). Foi possível a identificação de 39 haplótipos separados de acordo com o Supergrupo.

Os haplótipos representados em azul pertencem ao Supergrupo B, e os haplótipos em amarelo, incluindo o ST 347 (H_31) encontrado neste trabalho, pertencem ao Supergrupo A. Os haplótipos em verde e o rosa pertencem aos Supergrupos F e D, respectivamente.

Sequências que obtêm a mesma ST ficaram no mesmo haplótipo apesar de terem sido identificadas em organismos diferentes (Tabela 2).

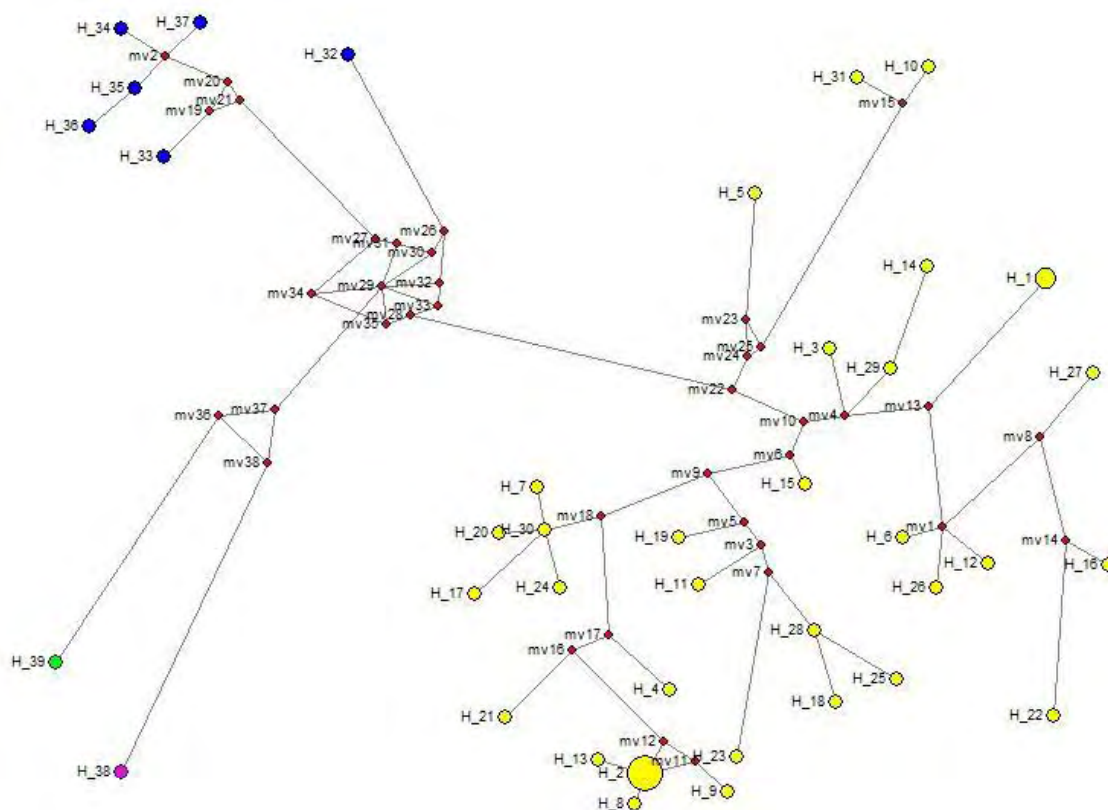


Figura 5- Rede de Haplótipos de *Wolbachia*. Note que os haplótipos ficaram separados de acordo com o Supergrupo pertencente: Azuis pertencem ao supergrupo B, Amarelos ao Supergrupo A, incluindo o ST347 (H_31), Verde o Supergrupo F e rosa o supergrupo D.

3.1.4 - Sinal Filogenético – *Wolbachia*

Após o alinhamento no ClustalW e a edição manual, as sequências foram submetidas ao Dambe (XIA; XIE, 2001) para a verificação da quantidade de transição e transversão. Os resultados indicaram um forte sinal filogenético, com transições excedendo as transversões (Figura 6). O eixo x indica a divergência entre as sequências. A linha azul representa transições e a linha verde representa transversões. O gráfico mostra um sinal filogenético satisfatório onde as transições aparecem com mais frequência do que transversões.

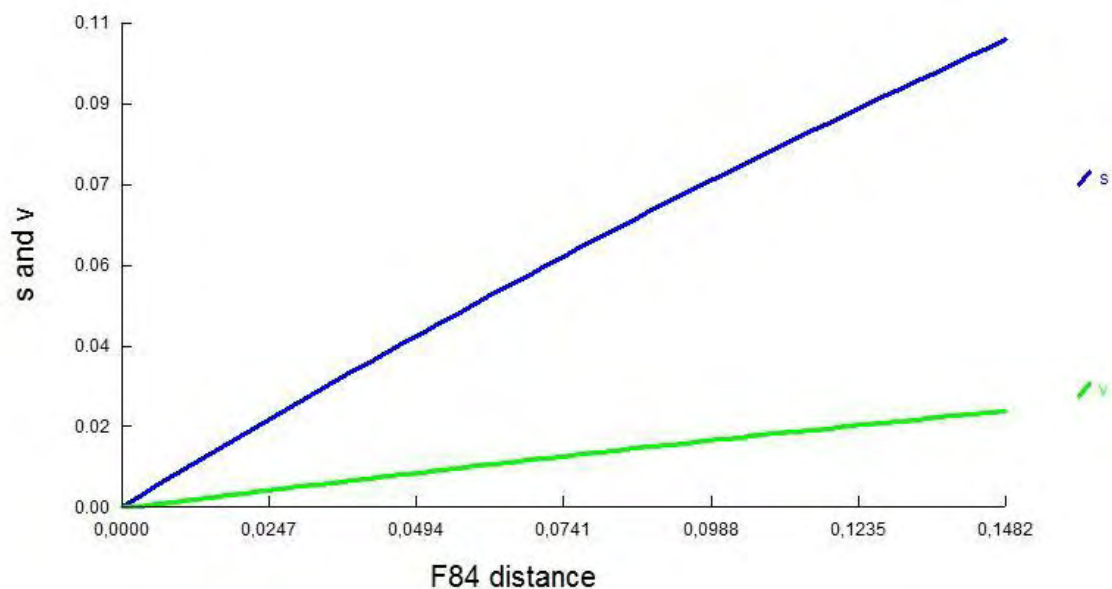


Figura 6- A análise do sinal filogenético de sequências estudadas neste trabalho. O eixo x indica a divergência entre as sequências. A linha azul representa transições e a linha verde representa transversões. O gráfico mostra um sinal filogenético satisfatório onde as transições aparecem com mais frequência do que transversões.

3.2 -*Blochmannia*

Foram analisadas tanto operárias de *C. textor* que continham infecção por *Wolbachia* como as que não continham, para verificar se haveria modificação em algum parâmetro na infecção por *Blochmannia*. Todos os oito indivíduos de cada colônia (Tabela 1) apresentaram *Blochmannia*. Entretanto, foi possível verificar pela quantificação do NanoDrop 2000 Thermo Scientific -

Uniscience, que os espécimes que também possuíam *Wolbachia*, apresentavam uma menor quantidade de *Blochmannia* em comparação com os espécimes não infectadas. Por exemplo, indivíduos infectados com *Wolbachia*, obtiveram em média 11,30 ng/ μ L de DNA de *Blochmannia*; enquanto que espécimes sem a infecção da *Wolbachia* apresentaram em média 52,25 ng/ μ L de DNA de *Blochmannia*. Mais estudos são necessários para a confirmação desta interferência.

Como o eletroferograma apresentou múltiplas infecções foi necessária a técnica de clonagem para o isolamento de cada sequência. Após todo o procedimento, obteve-se 47 clones os quais contém amostrados dois ou três indivíduos das colônias de Rio Claro (SP), Ilhéus (BA), São João da Boa Vista (SP), e Santa Rita do Passa Quatro (SP). Apesar das outras colônias apresentarem 100% da infecção, não foi possível a clonagem no tempo hábil deste trabalho, pois obtivemos problemas com as células competentes. De qualquer forma, posteriormente, a análise será finalizada e incluída aos dados aqui apresentados.

3.2.1- Identificação -*Blochmannia*

As sequências dos clones geradas foram editadas no software *Bioedit Sequence Alignment Editor Copyright 1997-2011* (HALL, 1999) e alinhadas na ferramenta *ClustalW* (HIGGINS; BLEASBY; FUCHS, 1992). Finalizada a edição, as sequências foram submetidas à ferramenta *Blast* do NCBI para a comparação com as demais já depositadas no GenBank. Todas as sequências, com exceção de uma, apresentaram E Value 0,0 e 98% de similaridade com *Candidatus Blochmannia ulcerosus*, *Candidatus Blochmannia laevigatus* e *Candidatis Blochmannia herculeanus*. A sequência que se revelou exceção apresentou se com E Value 0,0 e 97% de similaridade com *Candidatus Sodalis melophagi*. Confirmando a presença de mais um endossimbionte encontrado nesta parte do trabalho.

3.2.2- Rede de Haplótipos Intraespecíficos

A rede de haplótipos (Figura 7) revelou um resultado inesperado, foram encontrados 23 haplótipos diferentes (incluindo o *Candidatus Sodalis*

melophagi - H_7), os quais não são congruentes com a localização geográfica. Foi encontrada mais de uma cepa por organismo, e esta é compartilhada por colônias distantes geograficamente (Ver tabela 3 de haplótipos e também Figura 8, que separa os haplótipos em cada indivíduo sequenciado).

Localização da Colônia	Organismo	Clone	Haplótipo
Ilhéus (BA)	1	1	H_1
Ilhéus (BA)	1	4	H_1
Ilhéus (BA)	1	6	H_1
Ilhéus (BA)	1	7	H_1
Santa Rita do Passa Quatro (SP)	1	2	H_1
Santa Rita do Passa Quatro (SP)	1	4	H_1
Santa Rita do Passa Quatro (SP)	2	2	H_1
Santa Rita do Passa Quatro (SP)	2	3	H_1
São João da Boa Vista (SP)	1	1	H_1
São João da Boa Vista (SP)	1	3	H_1
São João da Boa Vista (SP)	1	5	H_1
São João da Boa Vista (SP)	3	1	H_1
São João da Boa Vista (SP)	3	2	H_1
São João da Boa Vista (SP)	2	3	H_1
São João da Boa Vista (SP)	2	6	H_1
Rio Claro (SP)	1	1	H_1
Rio Claro (SP)	1	2	H_1
Ilhéus (BA)	1	2	H_2
Ilhéus (BA)	1	3	H_3
Santa Rita do Passa Quatro (SP)	1	1	H_4
Santa Rita do Passa Quatro (SP)	1	3	H_5
Santa Rita do Passa Quatro (SP)	1	5	H_6
Santa Rita do Passa Quatro (SP)	2	1	H_7
Santa Rita do Passa Quatro (SP)	3	1	H_8
Santa Rita do Passa Quatro (SP)	3	2	H_8
Santa Rita do Passa Quatro (SP)	3	6	H_8
Santa Rita do Passa Quatro (SP)	3	7	H_8
Ilhéus (BA)	2	2	H_8
Ilhéus (BA)	2	3	H_8
Ilhéus (BA)	2	4	H_8
Rio Claro (SP)	2	2	H_8
Santa Rita do Passa Quatro (SP)	3	3	H_9
Santa Rita do Passa Quatro (SP)	3	4	H_10
Santa Rita do Passa Quatro (SP)	3	5	H_11
Ilhéus (BA)	2	1	H_12
São João da Boa Vista (SP)	1	2	H_13
São João da Boa Vista (SP)	1	4	H_14
São João da Boa Vista (SP)	3	3	H_15
São João da Boa Vista (SP)	3	4	H_16
São João da Boa Vista (SP)	3	5	H_17
São João da Boa Vista (SP)	3	6	H_18

Continuação...

São João da Boa Vista (SP)	2	1	H_19
São João da Boa Vista (SP)	2	2	H_20
São João da Boa Vista (SP)	2	4	H_21
São João da Boa Vista (SP)	2	5	H_22
Rio Claro (SP)	2	1	H_23

Tabela 3- Haplótipos de *Blochmannia* obtidos por meio da clonagem de indivíduos de *Camponotus textor* com suas respectivas localidades.

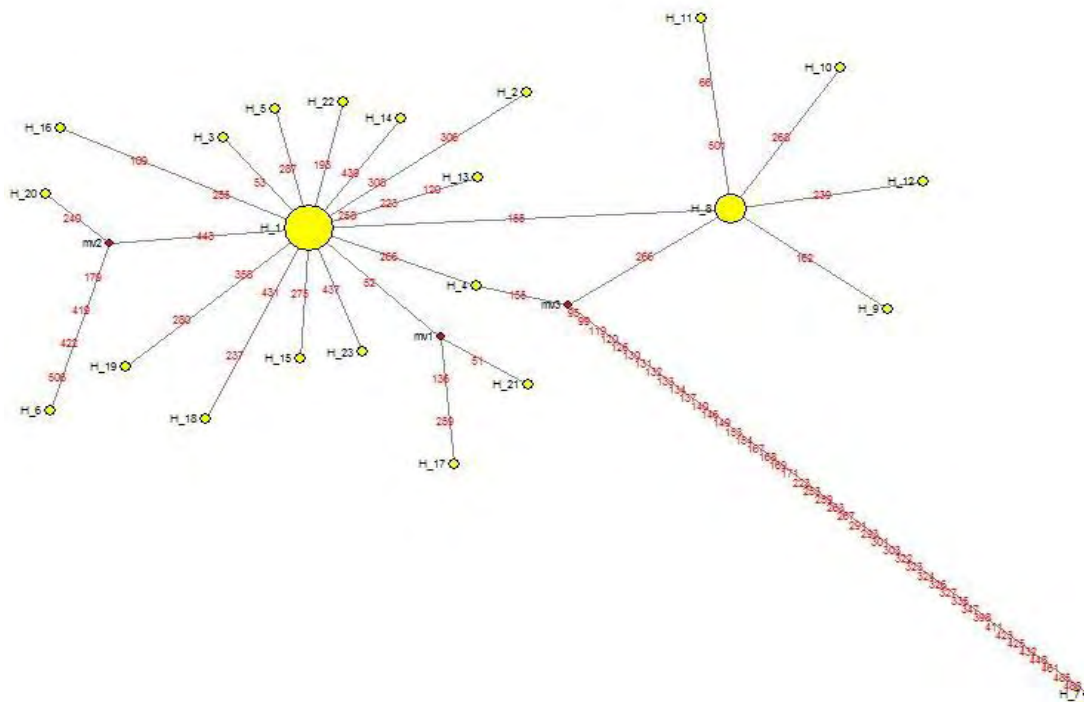


Figura 7- Rede de haplótipos gerada através da clonagem de indivíduos de *Camponotus textor* para evidenciar *Blochmannia*. Note que o haplótipo 7 (H_7) é o mais distante do montante, confirmando a caracterização do endossimbionte *Sodalis*.

Na Figura 8 é possível notar a divisão de haplótipos por cada indivíduo sequenciado. Observa-se que o haplótipo 1 (H_1) apareceu com maior frequência, seguido do haplótipo 8 (H_8).

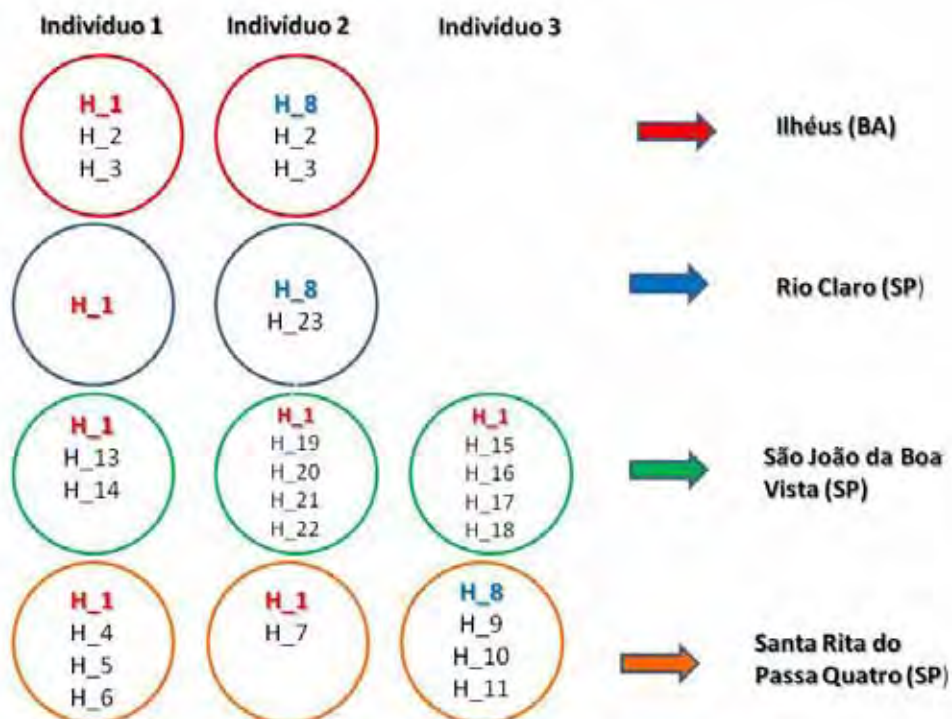


Figura 8- Esquema representativo de haplótipos gerados através da clonagem de *Camponotus textor* para evidenciar *Blochmannia* separados por cada indivíduo analisado.

A sequência mais frequente (Haplótipo 1) foi utilizada para dar continuidade à análise interespecífica comparando com outras sequências de *Blochmannia* encontradas no banco de dados (Tabela 4).

Espécie	Especificação da Sequência	Código de Acesso
<i>Camponotus laevigatus</i>	COI	AY334384.1
<i>Camponotus laevigatus</i>	<i>Blochmannia</i>	AY334370.1
<i>Camponotus americanus</i>	COI	AY334395.1
<i>Camponotus americanus</i>	<i>Blochmannia</i>	AY334379.1
<i>Camponotus castaneus</i>	COI	AY334393.1
<i>Camponotus castaneus</i>	<i>Blochmannia</i>	AY334377.1
<i>Camponotus festinatus</i>	COI	AY334386.1
<i>Camponotus festinatus</i>	<i>Blochmannia</i>	AY196851.1
<i>Camponotus herculeanus</i>	COI	AY280591.1
<i>Camponotus herculeanus</i>	<i>Blochmannia</i>	X92550.1
<i>Camponotus noveboracensis</i>	COI	AY334394.1
<i>Camponotus noveboracensis</i>	<i>Blochmannia</i>	AY334378.1

<i>Camponotus ocreatus</i>	COI	AY334387.1
<i>Camponotus ocreatus</i>	<i>Blochmannia</i>	AY334372.1
<i>Camponotus pennsylvanicus</i>	COI	AY334391.1
<i>Camponotus pennsylvanicus</i>	<i>Blochmannia</i>	AY196850.1
<i>Camponotus ulcerosus</i>	COI	AY334390.1
<i>Camponotus ulcerosus</i>	<i>Blochmannia</i>	AY334375.1
<i>Camponotus vafer</i>	COI	AY334383.2
<i>Camponotus vafer</i>	<i>Blochmannia</i>	CP002189.2

Tabela 4- Sequências de Citocromo Oxidase I (COI) e *Blochmannia* encontradas em *Camponotus* e obtidas do GenBank com seus respectivos códigos de acesso.

3.2.3- Máxima Parcimônia interespecífica comparando Citocromo Oxidase subunidade 1 (COI) e *Blochmannia*

A sequência que apareceu com mais frequência neste trabalho foi comparada com outras sequências de *Blochmannia* depositadas no GenBank que também possuíam a sequência do COI já estabelecidas para testar a análise de coevolução filogenética do hospedeiro e do endossimbionte encontrado. Curiosamente a sequência de *Blochmannia* encontrada em *Camponotus textor* apresentou-se com uma maior variação no início em comparação com as outras no GenBank. Para uma confirmação e excluir possíveis erros, o eletroferograma foi novamente analisado e apresentou-se bem definido (Figura 9), validando o polimorfismo da nova sequência encontrada neste trabalho.

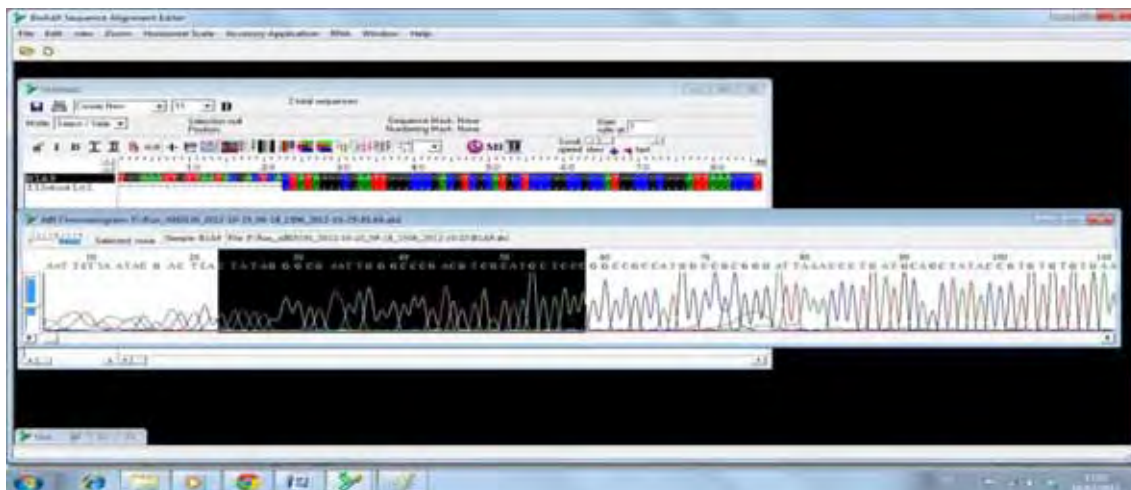


Figura 9- Eletroferograma da sequência de *Blochmannia* encontrada em *Camponotus textor* que apareceu com maior frequência neste trabalho. Note que os picos dos nucleotídeos estão bem definidos, confirmando o polimorfismo da nova sequência quando comparada com outras já depositadas no GenBank.

Os valores apresentados nas ramificações da análise de Máxima Parcimônia (MP) (Figura 10) representam o bootstrap. As árvores de MP (Busca Heurística, 2000 réplicas- bootstrap) do COI de espécies de *Camponotus* e a da *Blochmannia* correspondente apresentaram-se espelhadas, conforme era esperado. Não foi necessária a utilização de sequências para enraizar.

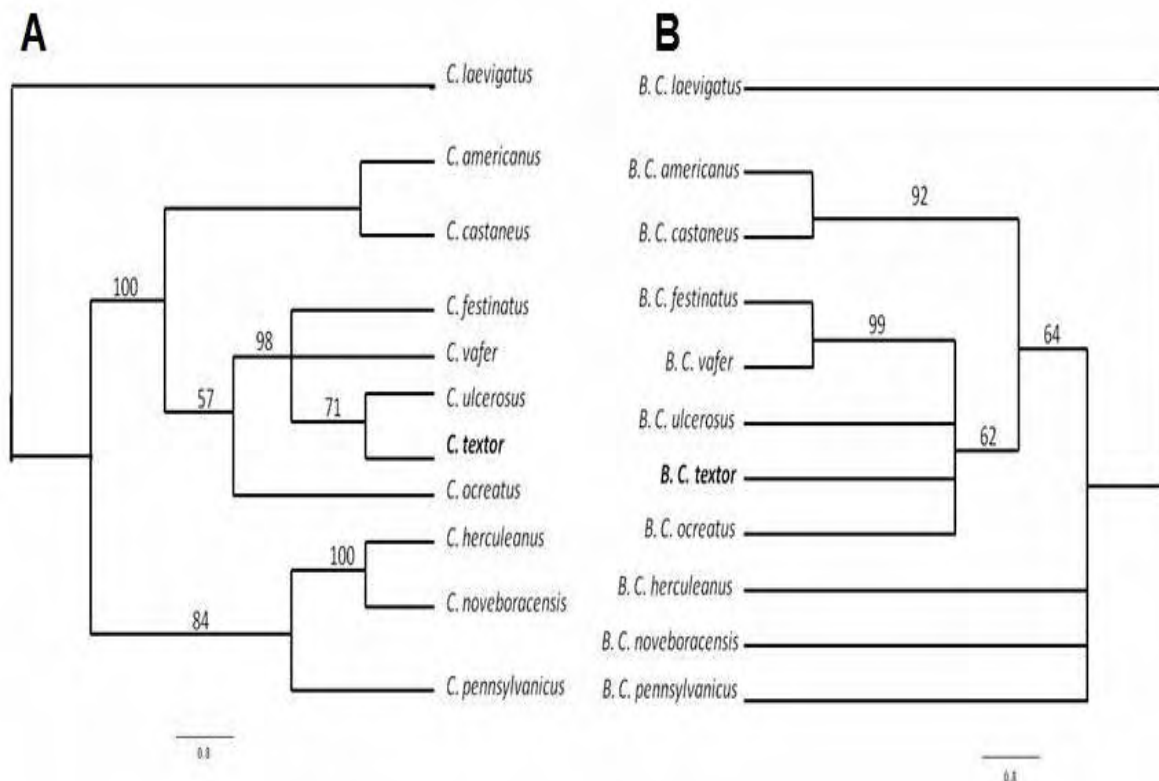


Figura 10- Árvores de Máxima Parcimônia (MP) espelhadas de COI de *Camponotus* e suas cepas de *Blochmannia* equivalente (Busca Heurística, 2000 réplicas- bootstrap). **A.** MP de COI de *Camponotus*. **B.** MP de *Blochmannia* encontradas nas espécies de *Camponotus* com o COI estabelecido.

3.2.3 - Sinal Filogenético Intraespecífico

Após o alinhamento no ClustalW e a edição manual, as sequências de *Blochmannia* foram submetidas ao Dambe (XIA; XIE, 2001) para a verificação da quantidade transição e transversão. Os resultados indicaram um forte sinal filogenético, com transições excedendo as transversões (Figura 11).

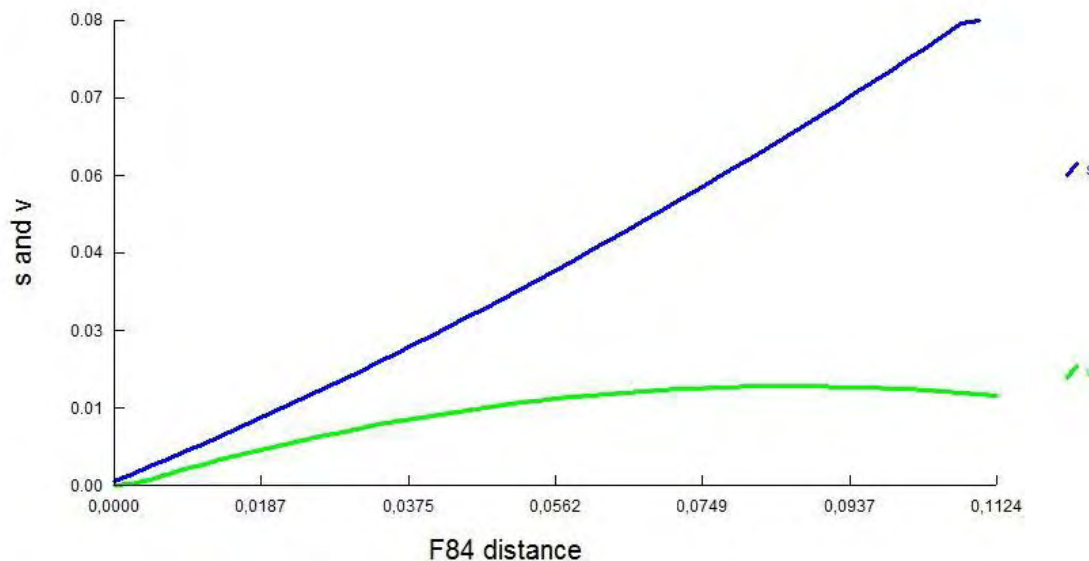


Figura 11- A análise do sinal filogenético de sequências de *Blochmannia* estudadas neste trabalho. O eixo x indica a divergência entre as sequências. A linha azul representa transições e a linha verde representa transversões. O gráfico mostra um sinal filogenético satisfatório onde as transições aparecem com mais frequência do que transversões.

4- Discussão

4.1- *Wolbachia*

Ficou evidente a ocorrência de alto índice de infecção de *Wolbachia* nas colônias de *Camponotus textor* quando comparadas com o trabalho de Martins, Souza e Bueno (2012) que obtiveram a porcentagem de 51% de colônias de *Solenopsis* infectadas (Figura 2). Isto evidencia que a bactéria pode ter se fixado na população ou está próxima de ser fixada, como sugerida por Wenseleers, Sundström e Billen (2002), para *Formica truncorum*. E apesar deste alto índice de infecção, não houve variação da ST e nem do gene *wsp* encontrados nas diferentes colônias.

De acordo com Watanabe et al. (2012) existem três possíveis explicações para a presença de cepas similares de *Wolbachia* em espécies relacionadas: transmissão vertical por um ancestral comum (JAENIKE et al., 2010), transmissão horizontal (BALDO; WERREN, 2007), e a hibridização introgressiva entre os hospedeiros (JIGGINS, 2003; RAYCHOUDHURY et al., 2009).

A enorme diversidade de haplótipos mitocondriais (RAMALHO et al., não publicado) observada indica que a hibridização introgressiva pode ser descartada, uma vez que se a *Wolbachia* tivesse sido transferida dessa forma, haveria compartilhamento dos haplótipos mitocondriais entre as colônias dos hospedeiros como sugerido por Watanabe et al. (2012) .

Desta forma, excluindo a hibridização introgressiva, a distribuição de *Wolbachia* observada poderia ser devido: A) a *Wolbachia* foi adquirida por transmissão vertical de um ancestral comum e vem sendo conservada mesmo com a separação geográfica das colônias, ou B) transmissão horizontal induzida pelas interações hospedeiro-parasitóide, ou predador-presa (WATANABE et al., 2012).

Essa hipótese também encontra apoio nos resultados obtidos por Salunke et al. (2012) utilizando MLST para analisar *Wolbachia* em borboletas. Segundo esses autores, a única explicação plausível para a distribuição e transferência do endossimbionte seria, inicialmente, a ocorrência de infecção no ancestral, portanto antes da diferenciação das populações, garantindo a conservação das cepas (mesmo com múltiplas infecções) e pela transferência horizontal, já que as espécies são relacionadas, devem interagir com os mesmos predadores, ou presas presentes em ambientes similares.

Filogeneticamente, diversas cepas de *Wolbachia* têm sido reportadas de diferentes formigas hospedeiras pela metodologia MLST, e a grande maioria pertencente ao Supergrupo A, assim como a nova cepa encontrada neste trabalho (ST 347), a qual foi caracterizada através da análise de máxima parcimônia. Em relação ainda à distribuição dos supergrupos (A, B, D, e F) na rede de haplótipos gerada e na filogenia (MP) reconstruída, nota-se uma completa separação dos supergrupos.

Cepas de *Wolbachia* que infectam populações nativas e invasoras de formigas argentinas (*Linepithema humile*) pertencem a duas linhagens especializadas em infectar formigas do Novo Mundo (TSUTSUI et al., 2003).

Através do MLST também foi possível validar que existe uma similaridade das variantes encontradas na família Formicidae, indicando que há uma diferença entre cepas encontradas em formigas e outros insetos e

também há diferença nas variantes encontradas no Novo Mundo e Velho Mundo (RUSSEL et al., 2009).

O haplótipo 31 e o haplótipo 10, (equivalentes a ST 347 identificada neste trabalho e ST 45, respectivamente) apresentaram-se mais relacionados tanto na rede como na árvore filogenética, apesar de ainda distantes de todo o montante das cepas pertencentes ao supergrupo A. A cepa do ST 45 é referente à *Wolbachia* identificada na formiga hospedeira *Stenamma snellingi* com distribuição na costa Oeste dos EUA. Até o presente momento, nenhuma outra cepa de *Wolbachia* em formigas da América do Sul foi caracterizada pelo método MLST, e este fato poderia justificar a distância genética da ST 31 com as demais. Com o avanço de estudos de *Wolbachia* da América do Sul através do MLST, será possível verificar se há diferenças entre as cepas do Novo Mundo pertencentes à América do Norte, Central e América do Sul. E também reavaliar a relação de proximidade das duas STs em questão.

Localidades geográficas diferentes apresentaram a mesma cepa de *Wolbachia*, fato que também foi relatado com populações naturais da mosca tsé-tsé de diferentes locais da África que abrigam cepas de *Wolbachia* relacionadas, sugerindo que a origem geográfica dos hospedeiros não influenciou significativamente divergência das cepas (DOUDOUNIS et al., 2012). Resultados semelhantes foram encontrados em trabalhos envolvendo Diptera associado com cogumelos (STAHLHUT et al., 2010) e também em aranha da espécie *Hylyphantes graminicola* (YUN et al., 2010).

Por outro lado, há um estudo com MLST relacionando mais de 100 gêneros de formigas e borboletas da família Lycaenidae (RUSSEL et al., 2009), e outro com *wsp* envolvendo vespas (HAINE; COOK, 2005) Apesar de metodologias diferentes, os resultados indicam a mesma topologia, nos quais ambos possuem uma considerável associação entre a geografia e a similaridade da cepa.

Novos estudos envolvendo *Camponotus textor* e *Wolbachia* serão necessários para a confirmação da teoria da origem geográfica não influenciando a divergência da cepa. A utilização de outras metodologias que incluíssem as duplas infecções encontradas neste trabalho poderiam trazer informações inéditas que auxiliariam na elucidação da questão.

4.2 - *Blochmannia*

Existem diversos estudos que demonstram que a *Blochmannia* desempenha um papel nutricional para o hospedeiro, fornecendo alguns aminoácidos essenciais (FELDHAAR et al., 2007) e isto se dá mais intensamente nas fases iniciais do desenvolvimento (WOLSCHIN et al., 2004; GIL et al., 2003; DEGNAN; LAZARUS; WERNEGREEN, 2005). O papel nutricional da *Blochmannia* não é o único aspecto a se destacar da interação com o seu hospedeiro, pois ela possui genes necessários para contribuir para o metabolismo de nitrogênio, enxofre, e de lipídeos (GIL et al., 2003; DEGNAN; LAZARUS; WERNEGREEN, 2005; WILLIAMS; WERNEGREEN, 2010).

Estudos com formigas pertencentes ao gênero *Camponotus* são frequentemente relacionado com o endossimbionte obrigatório *Blochmannia*; contudo essas formigas também podem abrigar outras espécies de microorganismos (BOURTZIS; MILLER, 2003; HAYNES et al., 2003) que podem trazer benefícios individuais ou ainda para a colônia toda. Feldhar et al. (2007) isolou um pequeno número de *Serratia marcescens* no intestino de *Camponotus floridanus* e He et al. (2011) encontraram algumas bactérias no intestino de *Camponotus japonicus* baseados em análises com 16S rRNAs: *Candidatus Serratia* simbiótica (conhecida como endossimbionte secundário em afídeos); *Fructobacillus fructosus*; e a bactéria não cultivável, Burkholderiales; além da dominante *Blochmannia*. Ainda em *Camponotus japonicus*, foi encontrada outra bactéria adicional distribuída no papo, intestino médio e intestino posterior sendo classificada como *Pseudomonas* sp. (LI et al., 2012).

No trabalho presente, foi encontrada *Blochmannia* em todos os espécimes de *Camponotus textor* analisados após a clonagem e sequenciamento, obtendo similaridade com *Candidatus Blochmannia ulcerosus* (Cód. de acesso AY334375.1) (USA), *Candidatus Blochmannia laevigatus* (Cód. de acesso AY334370.1) (USA) e *Candidatus Blochmannia herculeanus* (Cód. de acesso AJ250715.1) (USA) já depositadas no GenBank. Contudo, outro microorganismo que ocorreu em conjunto com a *Blochmannia* foi

identificado como *Candidatus Sodalis melophagi* (Cód. de acesso JN872637.1) (República Checa).

O gênero *Sodalis* pertence ao grupo de bactérias que realizam vários tipos de simbiose, variando de facultativos para obrigatórios (SNYDER et al., 2011; HEDDI et al., 1998). Tem sido encontrado em diversos insetos hospedeiros incluindo moscas tsé-tsé (DALE; MAUDLIN, 1999) formigas (SAMESHIMA et al., 1999), afídeos (BURKE et al., 2009), percevejos (KAIWA et al., 2010; KAIWA et al., 2011), besouros (GRÜNWARD et al., 2010), além de relacionar-se filogeneticamente com simbioses secundários de psílídeos, e cochonilhas (THAO et al., 2000; THAO et al., 2002).

O gênero foi primeiramente descrito como *Sodalis glossiniduis*, simbiote da mosca tsé-tsé. Seu papel no hospedeiro ainda não está claro, mas há uma possível influência na longevidade e na resistência ao *Trypanosoma* (DALE; WELBURN, 2001). Tem sido empregue em diversas pesquisas com papel no sistema de secreção (DALE et al., 2001), aquisição de Ferro (RUNYEN-JANECKY et al., 2010), além das pesquisas sobre sua função como endossimbiote. Mais estudos serão necessários para investigar a função do *Sodalis* e a distribuição na espécie *Camponotus textor* além da sua interação com a bactéria *Blochmannia*.

Ao analisar a rede de haplótipos intraespecífica obtida da clonagem de todas as sequências de *Blochmannia* encontradas em *C. textor* ficou claro que não houve relação entre a localização geográfica e a similaridade da cepa encontrada, ou seja, ocorreram cepas compartilhadas em regiões geográficas distintas.

Acredita-se que endossimbiontes intracelulares que residem em bacteriócitos sejam transmitidos verticalmente (BUCHNER, 1965). O fato de a bactéria estar localizada no interior de um órgão especializado em associação com tecidos reprodutivos femininos sugere que a especiação do hospedeiro e dos endossimbiontes estejam interligadas (SCHRÖDER et al., 1996; SAUER et al., 2002).

A coespeciação de associações entre insetos e bactérias tem sido documentada diversas vezes na literatura, como por exemplo, em afídeos, mosca tsé-tsé, baratas e seus respectivos simbiossiontes (BAUMANN et al., 1995; AKSOY, 1995; BANDI et al., 1995). E em formigas também essa associação tem apresentado um alto grau de congruência das árvores filogenéticas, o que indica que bactéria e hospedeiro têm diversificado em paralelo e apoia a transmissão materna (vertical) (SAUER et al., 2000).

Apesar dessa congruência entre as árvores filogenéticas de hospedeiro e bactéria, sua distribuição geográfica pode ser refletida apenas parcialmente (SAUER et al., 2000), indicando que as longas migrações de formiga aconteceram no passado e que no geral, nenhuma transmissão horizontal de simbiossiontes tenha ocorrido desde então apesar da sobreposição geográfica de diversas outras espécies de formigas. Degnan et al. (2004) argumentaram que essa congruência filogenética caracteriza a falta de transferência horizontal e contrasta com a recombinação recorrente entre cepas de bactérias de vida livre (DUKHUIZEN; GREEN, 1991; OCHMAN; LAWRENCE; GROISMAN, 2000).

Diversos autores tem descrito que as árvores filogenéticas dos simbiossiontes são congruentes com a dos seus hospedeiros em períodos longos no tempo evolutivo, relação esta que caracterizaria a interação molecular primária entre o simbiossionte e o hospedeiro (MUNSON et al., 1991; LO et al., 2007; BAUMANN, 2005; WU et al., 2006), e o atual trabalho corroborou esta teoria quando obteve árvores filogenéticas do gene mitocondrial parcial COI dos hospedeiros e dos seus endossimbiossiontes *Blochmannia* espelhadas.

Análises das árvores filogenéticas interespecíficas de COI de *Camponotus textor* e de *Blochmannia*, utilizando a cepa mais frequente, evidenciam a teoria da transmissão vertical do endossimbiossionte, mas se for considerada a análise intraespecífica, com a diversidade de haplótipos de *Blochmannia* encontrados em *Camponotus textor* após a clonagem, torna possível também a aquisição de cepas obtidas horizontalmente, como já foi descrito por Degnan et al. (2004). Novos estudos, com um maior número

amostral, serão necessários para comprovar essa teoria de transferência horizontal.

Alguns indivíduos de *Camponotus textor* conseguem abrigar mais de cinco cepas de *Blochmannia*, o que pode ser justificado pelo alto índice de infecção desses endossimbiontes nas colônias analisadas, indicando que as espécies de formiga do gênero *Camponotus* apresentam a bactéria fixada na população, assim como ocorreu com a formiga *Formica truncorum* e o endossimbionte *Wolbachia* (WENSELEERS; SUNDSTRÖM; BILLEN, 2002).

5- Conclusões

A alta incidência de *Wolbachia* em formigas, já observada em trabalhos anteriores, também foi encontrada na espécie *Camponotus textor*. Isso pode ser devido às condições favoráveis de invasão e manutenção da infecção em hospedeiros sociais haplodiplóides quando comparada com insetos hospedeiros solitários.

Variantes de cepas de *Wolbachia* vêm sendo caracterizadas em diferentes formigas hospedeiras com a técnica de MLST, e a maioria é pertencente ao supergrupo A, assim como a nova cepa encontrada neste trabalho.

A distribuição de *Wolbachia* observada em indivíduos de *Camponotus textor* pode ter ocorrido tanto pela transmissão vertical de um ancestral comum, quanto pela transmissão horizontal induzida pelas interações hospedeiro-parasitoide e predador-presa, ou ainda pelos dois eventos atuando em conjunto. A utilização de outras metodologias que incluíssem as duplas infecções de *Wolbachia* encontradas neste trabalho poderiam trazer informações inéditas que auxiliariam na elucidação da questão.

Estudos com formigas pertencentes ao gênero *Camponotus* são frequentemente relacionados com o endossimbionte *Blochmannia*; contudo essas formigas também podem abrigar outras espécies de microorganismos, como foi o caso do *Candidatus Sodalis melophagi* encontrado neste trabalho. Novos estudos serão necessários para elucidar o papel desse simbiote nessa formiga e a sua função.

Análises das árvores filogenéticas interespecíficas de COI de *Camponotus textor* e de *Blochmannia*, evidenciam a teoria da transmissão vertical do endossimbionte. Contudo se for considerada a análise intraespecífica, com a diversidade de haplótipos de *Blochmannia* encontrados no hospedeiro após a clonagem, sugere também a aquisição de cepas obtidas horizontalmente.

Referências Bibliográficas

AKSOY, S. Molecular analysis of the endosymbionts of tsetse flies : 16S rDNA locus and over expression of a chaperonin. **Insect Molecular Biology**, v.4, p. 23-29. 1995.

APOSTOLAKI A, SARIDAKI A, LIVADARAS I, SAVAKIS C, BOURTZIS K: Transinfection of the olive fruit fly with a Wolbachia CI inducing strain: a promising symbiont-based population control strategy? **Journal of Applied Entomology**, v. 135, n. 7, p. 546-553. 2011.

ARTHOFER, W.; RIEGLER, M.; SCHULER, H.; SCHNEIDER, D.; MODER, K.; MILLER, W. J.; STAUFFER, C. Allele Intersection Analysis: A Novel Tool for Multi Locus Sequence Assignment in Multiply Infected Hosts. **PLoS ONE**, v. 6, n.7, e22198. 2011.

BALDO L.; DUNNING –HOTOPP, J.C.; JOLLEY, K. A.; BORDENSTEIN, S.R.; BIBER, A.A., CHOUDHURY, R. R.; HAYASHI, C.; MAIDEN, M. C. J.; TETTELIN, H.; WERREN, J. H. Multilocus Sequence Typing System for the Endosymbiont Wolbachia. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p. 7098–7110. 2006a.

BALDO, L.; NADIA, A.; AYOUB, N.A.; HAYASHI, C.Y.; RUSSELL, J.A.; STAHLHUT, J. K.; WERREN, J. H. Insight into the routes of Wolbachia invasion: high levels of horizontal transfer in the spider genus *Agelenopsis* revealed by Wolbachia strain and mitochondrial DNA diversity. **Molecular Ecology**, n.17, p.557–569. 2008.

BALDO, L.; WERREN, J.H. Revisiting supergroup typing based on WSP: spurious lineages and discordance with MLST. **Current Microbiology**, n.55, p.81–87. 2007.

BALDO, L.; LO, N.; WERREN, J. H. Mosaic nature of *wsp* (*Wolbachia* surface protein). **Journal of Bacteriology**, n. 187, p.5406–5418. 2005.

BALDO, L.; BORDENSTEIN, S.; WERNEGREN, J. J.; WERREN, J. H. Widespread recombination throughout Wolbachia genomes. **Molecular Biology And Evolution**, n. 23, p.437-449. 2006b.

BALDO, L.; BARTOS, J. D.; WERREN, J. H.; BAZZOCCHI, C.; CASIRAGHI, M.; PANELLI, S. Different rates of nucleotide substitutions in *Wolbachia* endosymbionts of arthropods and nematodes: arms race or host shifts. **Parasitologia**. v.44, p.179–187. 2002.

BANDELT, H.J. FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for 288 inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology And Evolution**, n. 16, p. 37–48. 1999.

BANDI, C.; SIRONI, M.; DAMIANI, G.; MAGRASSI, L.; NALEPA, C. A.; LAUDANI, U.; SACCHI, L. The establishment of intracellular symbiosis in an ancestor of cockroaches and termites. **Proceedings Of The Royal Society Of London Series B-Biological Sciences**, n. 259, p.293±299. 1995.

BARR, A.R. Cytoplasmic incompatibility in natural populations of mosquito, *Culex pipiens*. **Nature**, v. 283, p. 71–72, 1980.

BAUMANN, P. Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of pant sap-sucking insects. **Annual Review of Microbiology**, v. 59, p. 155-189. 2005.

BAUMANN, P., BAUMANN, L., LAI, C.-Y., ROUHBAKHSH, D., MORAN, N. A. & CLARK, M. A. Genetics, physiology and evolutionary relationships of the genus *Buchnera*: intracellular symbionts of aphids, **Annual Review Of Microbiology**, v.49, p.55±94. 1995.

BLOCHMAN, F. Über das vorkommen von bakterienähnlichen gebilden in den gewebe und eiern verschiedener insekten. **Zentbl Bakteriol**, v.11, p. 234-240. 1882.

BOLTON, B. **A New General Catalogue of the Ants of the World**. Cambridge, MA: Harvard University Press. 1996.

BORDENSTEIN, S.; ROSENGAUS, R. B. Discovery of a novel *Wolbachia* supergroup in isopteran. **Current Microbiology**, v.51, p. 393- 398. 2005.

BOUCHON, D.; RIGAUD, T, JUCHAULT P. Evidence for widespread *Wolbachia* infection in isopod crustaceans: molecular identification and host feminization. **Proceedings Of The Royal Society Of London Series B-Biological Sciences**, n. 265, p.1081–1090. 1998.

BOURTZIS, K.; MILLER, T.A. **Insect symbiosis**. CRC Press, Boca Raton. 2003.

BOURTZIS, K. *Wolbachia* –based technologies for insect pest population control. **Advances in Experimental medicine and Biology**, n.627, p.104-113, 2008.

BRAIG, H. R.; ZHOU, W.; DOBSON, S.; O'NEILL, S. L. Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia*. **The Journal of Bacteriology**. v. 180, p. 2373-2378. 1998.

BUCHNER, P. **Endosymbiosis of animals with plant microorganisms**. Interscience, New York. 1965.

BURKE, G.R.; NORMARK, B.B.; FAVRET, C; MORAN, N.A. Evolution and diversity of facultative symbionts from the aphid subfamily Lachninae. **Applied and Environmental Microbiology**, n.75, p. 5328–5335. 2009.

CASPARI, E.; WATSON, G. S. On the evolutionary importance of cytoplasmic sterility in mosquitoes. **Evolution**. v. 13, p. 568–570, 1959.

- COCHRAN, D. G. Nitrogen excretion in cockroaches. **Annual Review Of Entomology**, n.30, p.29±49.1985.
- CORDAUX, R.; MICHEL-SALZAT, A.; BOUCHON, D. *Wolbachia* infection in crustaceans: novel hosts and potential routes for horizontal transmission. **Evolutionary Biology**, n.14, p.237–243. 2001.
- DALE, C.; MAUDLIN, I. *Sodalis* gen. nov. and *Sodalis glossinidius* sp. nov., a microaerophilic secondary endosymbiont of the tsetse fly *Glossina morsitans morsitans*. **International Journal Of Systematic Bacteriology**, n.49, p. 267–275. 1999.
- DALE, C.; WELBURN SC. The endosymbionts of tsetse flies: manipulating host-parasite interactions. **International Journal for Parasitology**, n. 31, p. 628–631. 2001.
- DALE, C.; YOUNG, S. A.; HAYDON, D. T.; WELBURN, S. C. The insect endosymbiont *Sodalis glossinidius* utilizes a type III secretion system for cell invasion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n.98, p.1883-1888. 2001.
- DASCH, G. A.; WEISS, E.; CHANG, K. P. **Endosymbiosis of insects**. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, v.1, p. 811±833. 1984.
- DE SOUZA, D. J.; BEZIER, A.; DEPOIX, D.; DREZEN, J. M.; LENOIR, A. *Blochmannia* endosymbionts improve colony growth and immune defence in the ant *Camponotus fellah*. **BMC Microbiology**, n.9, p.29. 2009.
- DEDEINE, F.; VAVRE, F.; FLEURY, F.; LOPPIN, B.; HOCHBERG, M. E.; BOULÉTREAU, M. Removing symbiotic *Wolbachia* bacteria specifically inhibits oogenesis in a parasitic wasp. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n. 98, p.6247–6252. 2001.
- DEGNAN, P.H.; LAZARUS, A.B.; WERNEGREN, J. J. Genome sequence of *Blochmannia pennsylvanicus* indicates parallel evolutionary trends among bacterial mutualists of insects. **Genome Research**, n.15, p.1023–1033. 2005.
- DEGNAN, P. H.; LAZARUS, A. D.; BROCK, C. D. WERNEGREN, J. J. Host–Symbiont Stability and Fast Evolutionary Rates in an Ant–Bacterium Association: Cospeciation of *Camponotus* Species and Their Endosymbionts, *Candidatus Blochmannia*. **Systematic Biology**, v.53, p.95-110, 2004.
- DOUDOUMIS, V., TSIAMIS, G., WAMWIRI, F., BRELSFOARD, C., ALAM, U., AKSOY, E.; DALAPERAS, S.; ABD-ALLA, A.; OUMA, J.; TAKAC, P.; AKSOY, S.; BOURTZIS, K. (2012). Detection and characterization of *Wolbachia* infections in laboratory and natural populations of different species of tsetse flies (genus *Glossina*). **BMC Microbiology**, 12(Suppl 1), S3. 2012.

DOUGLAS, A. E. Mycetocyte symbiosis in insects. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, n. 64, v. 409±434. 1989.

DOUGLAS, A. E. Nutritional interactions in insect microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria, **Annual Review of Entomology**, n.43, p.17±37. 1998.

DYKHUIZEN, D. E.; GREEN, L. Recombination in *Escherichia coli* and the definition of biological species. **Bacteriological Reviews**, n.173, p.7257– 7268. 1991.

FAN, Y.; THOMPSON, J.W.; DUBOIS, L. G.; MOSELEY, M. A.; WERNEGREEN, J. J. Proteomic Analysis of an Unculturable Bacterial Endosymbiont (*Blochmannia*) Reveals High Abundance of Chaperonins and Biosynthetic Enzymes. **Journal of Proteome Research**. 2012.

FELDHAAR, H.; STRAKA, J.; KRISCHKE, M.; BERTHOLD, K.; STOLL, S.; MUELLER, M. J.; GROSS, R. Nutritional upgrading for omnivorous carpenter ants by the endosymbiont *Blochmannia*. **BMC Biology**, v.5, n.48. 2007.

FENN, K.; BLAXTER, M. Are filarial nematode *Wolbachia* obligate mutualist symbionts? **Trends In Ecology & Evolution**. v. 19, p. 163–166, 2004.

FINE, P. E. M. Vectors and vertical transmission: an epidemiological perspective. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 30, p. 10–18, 1978.

FROST, C.L.; FERNA, H.; NDEZ-MARI, N.; SMITH, N. J. E.; HUGHES, O. H. Multiple gains and losses of *Wolbachia* symbionts across a tribe of fungus-growing ants. **Molecular Ecology**, n.19, p.4077–4085. 2010.

GIL, R.; SILVA, F.J.; ZIENTZ, E.; DELMOTTE, F.; GONZALEZ-CANDELAS, F.; LATORRE, A.; RAUSELL, C.; KAMERBEEK, J.; GADAU, J.; HÖLLDOBLER, B.; VANHAM, R.C. H. J.; GROSS, R.; MOYA, A. The genome sequence of *Blochmannia floridanus*: comparative analysis of reduced genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n.100, p.9388–9393. 2003.

GIL, R.; SILVA, F.J.; PERETO, J.; MOYA, A. Determination of the core of a minimal bacterial gene set. **Microbiol. Molecular Biology Reports**, v.68, p.518–537. 2004.

GOMEZ-VALERO, L.; SORIANO-NAVARRO, M; PEREZ-BROCAL, V.; HEDDI, A.; MOYA, A.; GARCIA-VERDUGO, J. M.; LATORRE, A. Coexistence of *Wolbachia* with *Buchnera aphidicola* and a Secondary symbiont in the aphid *cinara cedri*. **Journal of Bacteriology**, v.186, p.6626-6633. 2004

GRÜNWARD, S.; PILHOFER, M; HÖLL, W. Microbial associations in gut systems of wood- and bark-inhabiting longhorned beetles (Coleoptera: Cerambycidae). **Systematic And Applied Microbiology**, n.33, p.25–34. 2010.

HAINES, E. R.; COOK, J. M. Convergent incidences of *Wolbachia* infection in Fig wasp communities from two continents. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v, 272, n.1561, p.421-429. 2005.

HAAL, T. A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/nt. **Nucleic Acids Symposium Series**, n.41, p.95-98. 1999.

HAYNES, S.; DARBY, A.C.; DANIELL, T.J.; WEBSTER, G.; VANVEEN, F.J.F.; GODFRAY, H.C. J.; PROSSER, J.I.; DOUGLAS, A. E. Diversity of bacteria associated with natural aphid populations. **Applied and Environmental Microbiology** n.69, p.7216–7223. 2003.

HE, H.; CHEN, Y. Y.; ZHANG, Y. L.; WEI, C. Bacteria associated with gut lumen of *Camponotus japonicus* Mayr. **Environmental Entomology**, n. 40, p.1405–1409. 2011.

HEDDI, A.; CHARLES, H.; KHATCHADOURIAN, C.; BONNOT, G.; NARDON, P. Molecular characterization of the principal symbiotic bacteria of the weevil *Sitophilus oryzae*: a peculiar G+C content of an endocytobiotic DNA. **Journal of Molecular Evolution**, n.47, p.52-61, 1998.

HEDDI, A.; GRENIER, A. M.; KHATCHADOURIAN, C.; CHARLES, H.; NARDON, P. Four intracellular genomes direct weevil biology: nuclear, mitochondrial, principal endosymbiont, and *Wolbachia*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n. 96, p. 6814±6819. 1999.

HERTIG, M.; WOLBACH, S. Studies on Rickettsia- like microorganisms in insects. **Journal of Research**, n.44, p.329-374. 1924.

HIGGINS, D.G.; BLEASBY, A.J.; FUCHS, R. Clustal V: improved software for multiple sequence alignment. **Computer Applications In The Biosciences**, n. 8, p.189–191. 1992.

HOSOKAWA, T.; KOGA, R.; KIKUCHI, Y.; MENG, X.; FUKATSU, T. *Wolbachia* as a bacteriocyte-associated nutritional mutualist. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 2, p. 769-774. 2010.

JAENIKE, J.; STAHLHUT, J. K.; BOELIO, L. M.; UNCKLESS, R. L. Association between *Wolbachia* and *Spiroplasma* within *Drosophila neotestacea*: an emerging symbiotic mutualism? **Molecular Ecology**, n.19, p.414–425. 2010.

JEYAPRAKASH, A.; HOY, M. A. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: *wsp* sequences found in 76% of sixty-tree arthropods. **Insect Molecular Biology**, v. 9, p. 393-405. 2000.

JIGGINS, F. M. Male-killing *Wolbachia* and mitochondrial DNA: selective sweeps, hybrid introgression and parasite population dynamics. **Genetics**, n.164, p.5–12. 2003.

- JIGGINS, F. M.; HURST, G. D.; YANG, Z. Host-symbiont conflicts: positive selection on an outer membrane protein of parasitic but not mutualistic *Rickettsiaceae*. **Molecular Biology and Evolution**, v.19, p.1341–1349. 2002.
- KAIWA, N.; HOSOKAWA, T.; KIKUCHI, Y.; NIKOH, N.; MENG, X. Y.; KIMURA, N.; ITO, M.; FUKATSU, T.; Primary gut symbiont and secondary, *Sodalis*-allied symbiont of the *Scutellerid stinkbug Cantao ocellatus*. **Applied And Environmental Microbiology**, n.76, p. 3486–3494. 2010.
- KAIWA, N.; HOSOKAWA, T.; KIKUCHI, Y.; NIKON, N., MENG, X.; KIMURA, N.; ITO, M.; FUKATSU, T. Bacterial Symbionts of the giant jewel stinkbug *Eucorysses grandis* (Hemiptera: Scutelleridae). *Zoological Science*, n. 28, p.169-174. 2011.
- KAMBRIS, Z.; COOK, P.E.; PHUC, H.K.; SINKINS, S.P. Immune activation by lifespan-shortening *Wolbachia* and reduced filarial competence in mosquitoes. **Science**, v.326, n.5949, p.134-136. 2009.
- KAWASAKI, Y.; ITO, M.; MIURA, K.; KAJIMURA, H. Superinfection of five *Wolbachia* in the alnus ambrosia beetle, *Xylosandrus germanus* (Blanford) (Coleoptera: Curculionidae). **Bulletin of Entomological Research**, n.100, p.231-239. 2010.
- KITTAYAPONG, P.; JAMNONGLUK, W.; THIPAKSORN, A.; MILNE, J.R.; SINDHUSAKE, C. *Wolbachia* infection complexity among insects in the tropical rice-field community. **MOLECULAR ECOLOGY**, n.12, p.1049–1060. 2003.
- KOUKOU, K.; PAVLIKAKI, H.; KILIAS, G.; WERREN, J.H.; BOURTZIS, K.; ALAHOTIS, S. N. Influence of antibiotic treatment and *Wolbachia* curing on sexual isolation among *Drosophila melanogaster* cage populations. **Evolution**, n. 60, p.87–96. 2006.
- LI, X.; NAN, X.; WEI, C.; HE, H. The Gut Bacteria Associated with *Camponotus japonicus* Mayr with Culture-Dependent and DGGE Methods. **Current Microbiology**, p.1-7. 2012.
- LO, N.; PARASKEVOPOULOS, C.; BOURTZIS, K.; O'NEILL, S. L.; WERREN, J. H.; BORDENSTEIN, S. R.; BANDI, C. Taxonomic status of the intracellular bacterium *Wolbachia pipientis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 654- 657. 2007.
- MARTINS C.; SOUZA, R. F.; BUENO, O. C. Presence and distribution of the endosymbiont *Wolbachia* among *Solenopsis* spp. (Hymenoptera: Formicidae) from Brazil and its evolutionary history. **Journal of Invertebrate Pathology**, n. 109, p. 287–296. 2010.
- MERÇOT, H.; POINSOT, D. *Wolbachia* Transmission in a Naturally bi-infected *Drosophila simulans* strain from New-Caledonia. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, n.86, p.97-103. 1998.

MUNSON, M. A.; BAUMANN, P.; CLARK, M. A., BAUMANN, L.; MORAN, N. A.; VOEGTLIN, D. J.; CAMPBELL, B. C. Evidence for the establishment of aphid-eubacterium endosymbiosis in an ancestor of four aphid families. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 6321- 6324. 1991.

NOGGE, G. Significance of symbionts for the maintenance of an optimal nutritional state for successful reproduction in hematophagous arthropods, **Parasitology**, n. 82, p.299±304. 1982.

O'NEILL, S. L.; PETTIGREW, M. M.; SINKINS, S. P.; BRAIG, H. R.; ANDREADIS, T.G.; TESH, R. B. In vitro cultivation of *Wolbachia* in an *Aedes albopictus* cell line. **INSECT MOLECULAR BIOLOGY**, n.6, p. 33–39. 1997.

OCHMAN, H.; LAWRENCE, J. G.; GROISMAN, E. A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. **Nature**, n.405, p.299– 304. 2000.

PARASKEVOPOULOS, C.; BORDENSTEIN, S. R. ; WERNEGREEN, J. J. ; WERREN, J. H.; BOURTZIS, K. Towards a *Wolbachia* multilocus sequence typing system: discrimination of *Wolbachia* strains present in *Drosophila* species. **Current Microbiology**, v.53, n. 5, p. 388–395. 2006.

RAMALHO, M.O.; MARTINS,C.; MARTINS, V.G.; BUENO, O.C. Molecular characterization of partial mitochondrial genes COI and COII of *Camponotus textor* Forel, 1899 (Hymenoptera, Formicidae). (Não publicado)

RAYCHOUDHURY, R.; BALDO, L.; OLIVEIRA, D. C. S. G.; WERREN, J. H. Modes of acquisition of *Wolbachia*: horizontal transfer, hybrid introgression, and codivergence in the *Nasonia* species complex. **Evolution**, n.63, p.165–183. 2009.

ROUSSET, F.; RAYMOND; M. Cytoplasmic incompatibility in insets: why sterilize females? **Trends In Ecology & Evolution**, v. 6, p. 54 -57, 1991.

ROWLEY, S.M.; RAVEN, R. J.; MCGRAW, E. A. *Wolbachia pipiens* in Australian spiders. **Current Microbiology**, v. 49, p. 208-214. 2004.

RUNYEN-JANECKY, L. J.; BROWN, A. N.; OTT, B.; TUJUBA, H. G.; RIO, R. V. Regulation of high-affinity iron acquisition homologues in the tsetse fly symbiont *Sodalis glossinidius*. **Journal of Bacteriology**, n.192, p.3780–3787. 2010.

RUSSEL, J. A.; GOLDMAN-HUERTAS, B.; MOREAU, C. S.; BALDO, L.; STAHLHUT, J. K.; WERREN, J. H. PIERCE, E. N. Specialization and geographic isolation among *Wolbachia* symbionts from ants and lycaenid butterflies. **Evolution**. v. 63, p. 624-640, 2009.

SALUNKE, B. K.; SALUNKHE R.C.; DHOTRE, D.P.; WALUJKAR, S.A.; KHANDAGALE, A. B.; CHAUDHARI, R.; CHANDODE, R.K.; GHATE, H. V.; PATOLE, M. S.; WERREN, J.H.; SHOUCHEA, Y. S. Determination of

Wolbachia Diversity in Butterflies from Western Ghats, India, by a Multigene Approach. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 12, p.4458-4467. 2012.

SAMESHIMA, S.; HASEGAWA, E.; KITADE, O.; MINAKA, N.; MATSUMOTO, T. Phylogenetic comparison of endosymbionts with their host ants based on molecular evidence. **Zoological Science**, n.16, p.993–1000. 1999.

SANTOS, J. C.; DEL-CLARO, K. Ecology and behaviour of the weaver ant *Camponotus (Myrmobrachys) senex*. **Journal of Natural History**, v. 43, p. 1423 – 1435. 2009.

SAUER, C.; DUDACZEK, D.; HÖLLDOBLER, B.; GROSS, R. Tissue localization of the endosymbiotic bacterium "*Candidatus Blochmannia floridanus*" in adults and larvae of the carpenter ant *Camponotus floridanus*. **APPLIED ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, n. 68, p.4187–4193. 2002

SAUER, C.; STACKEBRANDT, E.; GADAU, J.; HÖLLDOBLER, B.; GROSS, R. Systematic relationships and cospeciation of bacterial endosymbionts and their carpenter ant host species: proposal of the new taxon *candidatus blochmannia* gen. nov. int. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, n.50, p. 1877- 1886. 2000.

SCHILTHUIZEN, M.; STOUTHAMER, R. Horizontal transmission of parthenogenesis-inducing microbes in trichogramma wasps. **Proceedings of the Royal Society B: Biological**, n. 264, p. 361-366. 1997.

SCHRÖDER, D.; DEPPISCH, H.; OBERMAYER, M.; KROHNE, G.; STACKEBRANDT, E.; HÖLLDOBLER, B.; GOEBEL, W.; GROSS, R. Intracellular endosymbiotic bacteria of *Camponotus* species (carpenter ants): Systematics, evolution and ultrastructural characterization. **Molecular Microbiology**, n.21, p.479–489. 1996.

SHOEMAKER, D. D.; KELLER G.; ROSS, K. G. Effects of *Wolbachia* on mtDNA variation in two fire ant species. **Molecular Ecology**. v. 12, p. 1757–1771, 2003.

SHOEMAKER, D. D.; ROSS, K. G.; KELLER, L.; VARGO, E. L.; WERREN, J. H. *Wolbachia* infections in native and introduced populations of the fire ants (*Solenopsis* spp.). **Insect Molecular Biology**. v. 9, p. 661-673. 2000.

SHREMMER, F. Die Nahezu unbekannte neotropische weberameise *Camponotus (myrmobrachys) senex* (Hymenoptera: Formicidae). **Entomologia Generalis**, v.5, n.4, p.363-378. 1979.

SNYDER, A. K.; MCMILLEN, C. M.; WALLENHORST, P.; RIO, R. V. The phylogeny of Sodalis-like symbionts as reconstructed using surface-encoding loci. **FEMS Microbiology Letters**, n. 317, p.143–151. 2011.

STAHLHUT, J. K.; DESJARDINS, C. A.; CLARK, M. E.; BALDO, L.; RUSSELL, J. A.; WERREN, J.H.; JAENIKE, J. The mushroom habitat as an ecological

arena for global exchange of *Wolbachia*. **Molecular Ecology**, v.19, n.9, p.1940-1952. 2010.

STOLL, S.; FELDHAAR, H.; GROSS, R. Transcriptional profiling of the endosymbiont *Blochmannia floridanus* during different developmental stages of its holometabolous ant host. **Environmental Microbiology**, v.11, n.4, p. 877–88. 2009.

STOUTHAMER, R.; BREEUWER, J. A.; LUCK, R. F.; WERREN, J. H. Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis. **Nature**, n.361, p.66–68. 1993.

STOUTHAMER, R.; BREEUWER, J. A. J.; HURST, G. D. D. *Wolbachia pipientis*: Microbial manipulator of arthropod reproduction. **Annual Review Microbiology**, n. 53, p. 71-102. 1999.

SWOFFORD, D. L.; **PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods), version 4.0**. Sinauer Associates. 1996.

HOSOKAWA, T.; KOGA, R.; KIKUCHI, Y.; MENG, X.; FUKATSU, T. *Wolbachia* as a bacteriocyte-associated nutritional mutualist. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 2, p.769–774. 2010.

THAO, M. L.; CLARK, M.A.; BAUMANN, L.; BRENNAN, E. B.; MORAN, N. A.; BAUMANN, P. Secondary endosymbionts of psyllids have been acquired multiple times. **CURRENT Microbiology**, n.41, p.300–304. 2000.

THAO, M. L.; GULLAN, P. J.; BAUMANN, P. Secondary (C Proteobacteria) endosymbionts infect the primary (b- proteobacteria) endosymbionts of mealybugs multiple times and coevolve with their hosts. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 68, p. 3190- 3197. 2002.

TRAM, U.; SULLIVAN, W. Role of delayed nuclear envelope breakdown and mitosis in *Wolbachia* induced cytoplasmic incompatibility. **Science**, v. 296, p. 1124 –1126, 2002.

TSUTSUI, N.D.; KAUPPINEN, S.N.; OYAFUSO, A.F.; GROSBERG, R.K. The distribution and evolutionary history of *Wolbachia* infection in native and introduced populations of the invasive argentine ant *Linepithema humile*. **Molecular Ecology**, v. 12, p.3057-3068, 2003.

TURELLI, M. Evolution of incompatibility-inducing microbes and their hosts. **Evolution**, v. 48, p. 1500–1513, 1994.

WATANABE, M.; TAGAMI, Y.; MIURA, K.; KAGEYAMA, D.; STOUTHAMER, R. Distribution Patterns of *Wolbachia* Endosymbionts in the Closely Related Flower Bugs of the Genus *Orius*: Implications for Coevolution and Horizontal Transfer. **MICROBIAL ECOLOGY**, n. 64, p.537–545. 2012.

WENSELEERS, T.; SUNDSTRÖM, L.; BILLEN, J. Deleterious *Wolbachia* in the ant *Formica truncorum*. **Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Science**, v. 269, p. 623-629. 2002.

WERNEGREN, J.J.; KAUPPINEN, S. N.; BRADY, S. G.; WARD, P. S. One nutritional symbiosis begat another: Phylogenetic evidence that the ant tribe Camponotini acquired *Blochmannia* by tending sap-feeding insects. **BMC Evolutionary Biology**, v. 9, n.292. 2009.

WERREN, J. H.; BALDO, L.; CLARK, M. E. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. **Nature Reviews Microbiology**, n.6, p.741–751. 2008.

WERREN, J.H.; WINDSOR, D.; GUO, L.R. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. **Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Science**, n. 262, p.197–204. 1995.

WERREN, J. H. Biology of *Wolbachia*. **Annual Review Entomology**, n.42, p.587– 609. 1997.

WERREN, J. H.; BARTOS, J. D. Recombination in *Wolbachia*. **CURRENT BIOLOGY**, n. 11, p.431–435. 2001.

WERREN, J. H; O'NEILL, S. L. The evolution of heritable symbionts. P.1–41 in O'NEILL, S. L.; HOFFMANN, A. A.; WERREN, J. H. eds. *Influential passengers*. **Oxford University Press**, New York, 1997.

WILLIAMS, L.E.; WERNEGREN, J. J. Unprecedented loss of ammonia assimilation capability in a urease-encoding bacterial mutualist. **BMC Genomics**, n. 11, p.687. 2010.

WOLSCHIN, F.; HÖLLDOBLER, B.; GROSS, R.; ZIENTZ, E. Replication of the endosymbiotic bacterium *Blochmannia floridanus* is correlated with the developmental and reproductive stages of its ant host. **Applied Environmental Microbiology**, v. 70, n.7, p. 4096-4102. 2004.

WU, D.; DAUGHERTY, S.C.; VAN AKEN, S.E.; PAI, G.H.; WATKINS, K.L.; KHOURI, H.; TALLON, L.J.; ZABORSKY, J.M.; DUNBAR, H.E.; TRAN, P.L., Metabolic complementarity and genomics of the dual symbiosis of sharpshooters. **PLoS Biology**, v.4. 2006.

XIA, X.; XIE, Z. DAMBE: data analysis in molecular biology and evolution. **Journal of Heredity**, n.92, p.371–373. 2001.

XI, Z.; KHOO, C.C.; DOBSON, S. L. *Wolbachia* establishment and invasion in an *Aedes aegypti* laboratory population. **Science**, v.310, n.5746, p.326-328. 2005.

YUN, Y.; LEI, C.; PENG, Y.; LIU, F.; CHEN, J.; CHEN, L. *Wolbachia* strains typing in different geographic population spider, *Hylyphantes graminicola* (Linyphiidae). *Current Biology*, v.62, n.1, p.139-145. 2010.

ZABALOU, S.; APOSTOLAKI, A.; LIVADARAS, I.; FRANZ, G.; ROBINSON, A. S.; SAVAKIS, C.; BOURTZIS, K. Incompatible insect technique: incompatible males from a *Ceratitis capitata* genetic sexing strain. **Entomologia Experimentalis Et Applicata**, v.132, n.3, p.232-240. 2009.

ZABALOU, S.; RIEGLER, M.; THEODORAKOPOULOU, M.; STAUFFER, C.; SAVAKIS, C.; BOURTZIS, K. *Wolbachia*-induced cytoplasmatic incompatibility as a means for insect pest population control. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** , n.10, p.15042–15045. 2004.

ZARA, F. J.; BULTION, M. L. ; CAETANO, F. H. Post-Embrionic Development of Larvae on the Weaver Ant *Camponotus textor* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 55, n. 2, p. 557- 578. 2010.

ZHOU, W.; ROUSSET, F.; O'NEILL, S. L. Phylogeny and PCR based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. **Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Science** , n.265, p.509–515. 1998.

ZHOU, C.; YANG, Y.; JONG, A. Y. Mini-prep in ten minutes. **BioTechniques**, v. 8, n.2, p. 172-173. 1990.

ZIENTZ, E.; BEYAERT, I.; GROSS, R.; FELDHAAR, H. Relevance of the endosymbiosis of *Blochmannia f lorida* and carpenter ants at different stages of the life cycle of the host. **Applied Environmental Microbiology**, v.72, n.9, p.6027–33. 2006.

Considerações gerais

A caracterização molecular parcial de genes mitocondriais de *Camponotus textor* forneceu novas informações para a realização de novos estudos sobre a biologia geral da formiga-tecelã do Brasil, principalmente com a caracterização do COI, conhecido também como DNA Barcode.

Pelo estudo do DNA mitocondrial o qual é herdado maternamente ficou evidente que colônias mais distantes geograficamente também possuem maior divergência genética, caracterizando um padrão de colonização antiga. Foi evidenciada também uma ampla diversidade de haplótipos mitocondriais, e isto pode ser explicado pela possível redução do fluxo gênico entre as colônias decorrentes de uma baixa capacidade de dispersão das rainhas, da ação antrópica, e também da presença de múltiplas cepas de *Wolbachia* as quais podem gerar incompatibilidade citoplasmática.

Existe a possibilidade dos altos índices de infecção por *Wolbachia* encontrada nas colônias analisadas agirem como um catalisador de processos evolutivos de especiação, devido à característica do endossimbionte de causar incompatibilidade citoplasmática entre populações infectadas com cepas divergentes.

Com a técnica de MLST muitas cepas de *Wolbachia* têm sido caracterizadas em formigas, e a grande maioria é pertencente ao supergrupo A, assim como a cepa inédita identificada neste trabalho.

Quanto à distribuição de *Wolbachia* observada em indivíduos de *Camponotus textor*, acredita-se que possa ter ocorrido tanto pela transmissão vertical quanto pela transmissão horizontal agindo em conjunto.

A congruência das árvores filogenéticas interespecíficas de COI de *Camponotus textor* e da *Blochmannia* evidencia a teoria da transmissão vertical do endossimbionte. Entretanto, se for considerada a análise intraespecífica, com a diversidade de haplótipos de *Blochmannia* encontrados no hospedeiro, torna-se possível também à aquisição de cepas obtidas horizontalmente. Novos estudos, com maior número amostral, serão necessários para comprovar essa teoria de transferência horizontal.

A formiga-tecelã também pode abrigar outras espécies de microorganismos que não só a *Blochmannia* e a *Wolbachia*, como foi o caso do *Candidatus Sodalis melophagi*, cujo papel é totalmente desconhecido.

De uma maneira geral, os resultados apresentados corroboram citações da literatura e adicionam novas informações sobre a filogenia das formigas-tecelãs do Brasil, assim como da presença e distribuição do endossimbionte *Wolbachia* e *Blochmannia* nessas colônias e sua história evolutiva.