
Ciências Biológicas

Manuela de Oliveira Ramalho

**Sequenciamento de um fragmento de DNA mitocondrial de
Camponotus textor (FOREL, 1899) (HYMENOPTERA,
FORMICIDAE)**

Rio Claro
2010

Manuela de Oliveira Ramalho

Sequenciamento de um fragmento de DNA mitocondrial de
Camponotus textor **(FOREL, 1899) (HYMENOPTERA,**
FORMICIDAE)

Orientador: Odair Correa Bueno

Co-orientador: Cynara Melo Rodovalho

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Biociências da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro,
para obtenção do grau de Bacharelado em
Ciências Biológicas.

Rio Claro
2010

595.796 Ramalho, Manuela de Oliveira
R165s Sequenciamento de um fragmento de DNA mitocondrial de
Camponotus textor (FOREL, 1899) (HYMENOPTERA, FORMICIDAE) /
Manuela de Oliveira Ramalho. - Rio Claro : [s.n.], 2010
50 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots., mapas

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Odair Correa Bueno
Co-Orientador: Cynara Melo Rodovalho

1. Formiga. 2. Formiga tecelã. 3. Citocromo oxidase 1. 4.
Camponotini. 5. Biologia molecular. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

Dedicatória

Dedico esse trabalho a todos os amigos e familiares que me ajudaram nos momentos difíceis.
Sem vocês este nunca teria chegado aqui.

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 pelo apoio incondicional, mesmo não entendendo muito de PCR, sempre acreditaram em mim. Aos meus familiares Tio Rê e Paty, por despertar-me o interesse por esta profissão maravilhosa, Tio Cuca, pelas correrias de última hora, Vó Nadir, que sempre fica ao meu lado, e minhas cachorrinhas Luppy e Bianca que sempre fazem festa quando eu chego!

Ao querido orientador e amigo professor Odair, que sempre me auxiliou com muita paciência e carinho.

À minha querida co-orientadora, que já foi minha professora, e atualmente é minha amigona Cynara. Sempre estava pronta pra me ajudar!

Ao CEIS e funcionários, sem o café forte de todos os dias esse trabalho não teria acontecido. Aos companheiros de trabalho, Rodrigo (que sempre me salvou), Wanderlei, Marcela, Ita, e mais muita gente..., Muito Obrigada!

Às minhas companheiras de TODAS as horas Pamela (Keka) e Juliana (July), por todas as aventuras que vivemos. Este tempo não seria tão especial sem vocês.

Aos professores da Unesp de Rio Claro que sempre tiveram muita paciência e adiaram várias provas pra não coincidirem... Obrigada por cada hora aula dada!

Aos amigos e companheiros das Repúblicas Fenda do Biquíni, Aldeia e especialmente Xurumelas (Catita, Bia, Mil, Lila e Dirce) muito obrigada por todo amparo de uma família de verdade. Amo vocês! Com certeza sou uma pessoa muito melhor depois de conhecer vocês!

Não posso deixar de agradecer em especial minha amiga Aline - Catita. Em quatro anos crescemos juntas! Não consigo imaginar Rio Claro sem você...

Aos companheiros de sala CBN 2006, os Azarados! Crescemos muito juntos, e sentirei muita falta de vocês. TQAB foi demais!

Não posso deixar de citar em especial o meu amigão Dom...na faculdade erramos, aprendemos e acima de tudo nos divertimos juntos! Amigo

para todas às horas e para todo o sempre! Na minha casa e do Parsa sempre terá um cantinho para você!

Aos amigos da Biologia (em especial o pessoal da Rep. Metazooa mais agregados) e Engenharia Ambiental da Unesp de Rio Claro por todas as cervejadas e papos cabeça, foram fundamentais nos momentos de desespero e descanso.

À Dona Ana, que sempre atendeu nossas chamadas e por isso começou a trabalhar até mais tarde pra garantir nossas festas!

Aos amigos de Campinas, Horse, Jhol, Pablo, Laurence, Tata, Joice, Maria Clara, Andhiara, Luciano, Gi, Tito, Ma, Drica, Angélica, Kats, Oda, Ângela, Maurício e Rose 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 Tóquio.. pra mim você sempre estará no meu coração (e tb na janela do Bloco B 11, rs)!

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

E finalmente ao meu grande amigo, namorado e, recentemente, noivo (futuro marido, 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! Te amo!

SEM BARRA

Enquanto a formiga
Carrega comida
Para o formigueiro,
A cigarra canta,
Canta o dia inteiro. A formiga é só trabalho.
A cigarra é só cantiga. Mas sem a cantiga
da cigarra
que distrai da fadiga,
seria uma barra
o trabalho da formiga

José Paulo Paes

"...se não puder ajudar, atrapalhe, o importante é participar!!"
Homer Simpson

"Você pode ter todo o dinheiro do mundo, mas há algo que jamais poderá
comprar: um dinossauro!"
Homer Simpson

RESUMO

A grande diversidade das formigas implica na enorme variedade de habitats de nidificação, preferências alimentares e comportamento social com divisão de trabalho, além da estruturação de seu ninho que por sua vez, podem revelar parte de sua história evolutiva. *Camponotus textor* é uma espécie tecelã, a qual constrói seu ninho a partir da seda produzida pelas suas próprias larvas, garantindo um dos mais notáveis exemplos de cooperação social. É uma formiga arborícola e de grande importância para a agricultura, já que pode nidificar no cafeeiro (*Coffea arabica*) e ser usada como agente de controle biológico impedindo o estabelecimento de outras pragas. Atualmente, existem poucos estudos abordando comportamento, fisiologia, genética, endossimbiontes e filogenia desse grupo. Segundo dados da literatura, o DNA mitocondrial tem sido utilizado em análises de filogenia devido ao ótimo número de cópias por célula, altas taxas mutacionais e pouca ou nenhuma recombinação. Sendo assim, o presente trabalho visa realizar o sequenciamento de um fragmento do DNA mitocondrial de populações distintas de *Camponotus textor* para ser utilizado como marcador molecular, tornando-se uma ferramenta para diferenciação de populações e determinação das relações filogenéticas entre outras espécies de formigas relacionadas. Foi feita a extração do DNA em TNES (Tris, NaCl, EDTA, SDS), seguida da amplificação da região COI (citocromo oxidase I) do DNA mitocondrial utilizando-se os *primers* elaborados para este trabalho e o sequenciamento foi realizado no 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As seqüências obtidas foram editadas no BioEdit, e posteriormente comparadas com o banco de dados GenBank, utilizando-se a ferramenta BLAST, e assim a construção da análise filogenética através do programa MEGA. Foi possível a separação das cinco populações em duas linhagens distantes geograficamente.

Palavras- chave: Camponotini, formiga tecelã e Citocromo Oxidase I (COI).

SUMÁRIO

	Página
1- INTRODUÇÃO	8
2- OBJETIVOS	10
3- REVISÃO DA LITERATURA.....	11
3.1 AS FORMIGAS TECELÃS	11
3.2 - BIOLOGIA DA TECELÃ – <i>Camponotus textor</i>	13
3.3- CLASSIFICAÇÃO.....	14
3.4- DNA MITOCONDRIAL	15
3.5- FILOGENIA DE FORMICINAE BASEADA EM DADOS MORFOLÓGICOS	17
4- MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1 - COLETA, IDENTIFICAÇÃO E CONSERVAÇÃO DOS EXEMPLARES	19
4.2- EXTRAÇÃO DE DNA	19
4.3- DESENHO DOS PRIMERS	20
4.4- ANÁLISE DO DNA MITOCONDRIAL	20
4.5- PURIFICAÇÃO DE PRODUTOS POR PCR	21
4.6- REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DE DNA E PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS	21
4.7-SEQUENCIAMENTO.....	22
4.8-BIOINFORMÁTICA.....	22
4.9 – ANÁLISES FILOGENÉTICAS.....	23
5 - RESULTADOS	25
5.1-EXTRAÇÃO	25
5.2- AMPLIFICAÇÕES (REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA - PCR).....	25
5.3 – PURIFICAÇÕES	26
5.4 - SEQUENCIAMENTO.....	27
5.5 – ANÁLISES FILOGENÉTICAS.....	28
6 - DISCUSSÃO	33
7- CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	36
8- CONCLUSÕES	37
9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
ANEXOS	45

1- INTRODUÇÃO

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 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 é oriunda das variedades de nidificação, preferências alimentares e comportamento social com divisão de trabalho (WILSON, 1987; HÖLLDOLBLER; WILSON, 1990).

A interação das formigas com as plantas pode dar-se 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, e esta forma de construção é um dos mais notáveis exemplos de cooperação social em animais (HÖLLDOLBLER E WILSON, 1977).

Esse comportamento é observado em 15 espécies em 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 presente trabalho aborda a espécie *Camponotus textor*, a qual é uma formiga tecelã comum em matas da América Central e a do Sul. Embora seja abundante, não há estudos suficientes sobre esta espécie no Brasil. Em geral, os estudos existentes sobre *C. textor* descrevem superficialmente o comportamento de tecelagem e a construção de ninhos (SCHREMMER, 1979).

Há na literatura poucos 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 arábica*), e não permitir o estabelecimento de outra praga (PHILPOTT, 2005).

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). Seu uso para estudos filogenéticos deve-se ao fato do DNA mitocondrial não possuir mecanismos de reparo de mutações como o que ocorre com o DNA nuclear, as mutações podem ser acumuladas se selecionadas favoravelmente e apresenta herança materna, que é a propriedade mais importante (WATSON et al., 1993; AVISE, 1994).

O genoma mitocondrial de várias espécies de insetos tem sido seqüenciado, 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 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 a sequência mais conservada em termos de evolução de aminoácidos. Esta última tem sido extensamente estudada e há propostas de utilizá-la como um DNA barcoding (código de barras de DNA) na diferenciação e identificação de espécies de animais (HERBERT et al., 2003; RATNASINGHAM; HEBER, 2007; SMITH et al., 2005).

2- OBJETIVOS

Diante da abundância e da ampla distribuição da espécie *Camponotus textor* no território brasileiro, os objetivos do presente trabalho foram caracterizar cinco populações de *Camponotus textor* provenientes de localidades diferentes através de análises de seqüências do DNA mitocondrial, especificamente da sequência gênica referente à citocromo oxidase I, verificar o grau de parentesco dessas populações e realizar inferências filogenéticas.

3- REVISÃO DA LITERATURA

3.1 As formigas tecelãs

Foi adotada neste trabalho a definição de tecelã àquelas formigas as quais usam predominantemente a seda produzida pelas larvas para a construção do próprio ninho, excluindo assim os casos em que as formigas obtêm seda de fora (como de aranhas) ou quando a seda é produzido pelas operárias, como no gênero *Melissotarsus*, cujos adultos produzem seda (FISHER; ROBERTSON, 1999). Assim definida, a tecelagem é restrito a Formicinae (HÖLLDOLBLER; WILSON, 1990)

Existem três gêneros de formigas que exibem o comportamento de tecelagem nas regiões paleotropicalis e australianas: *Oecophylla*, *Polyrhachis* e *Camponotus*, e dois gêneros nas regiões neotropicais: *Dendromyrmex* e *Camponotus* (*Myrmobrachys*). Acredita-se que o mais alto nível de especialização do comportamento de tecelagem seja alcançado pela *Oecophylla* devido à grande cooperação entre as operárias, seguindo pelas *Polyrhachis* e *Camponotus* com nível intermediário, e *Dendromyrmex* com o nível mais rudimentar (HÖLLDOLBLER; WILSON, 1990).

A espécie tecelã mais conhecida é a *Oecophylla longinoda* da África, (que possui o gene citocromo oxidase I (COI) depositado no Genbank), cujas operárias selecionam as folhas mais adequadas para a construção do ninho, formando uma bolsa de folhas e formigas. Em seguida, as larvas no estágio pré pupa são recrutadas para o local e dão início à produção de seda.

Os detalhes de comportamento de tecelagem variam significativamente entre os gêneros, e tem sido sugerido que a tecelagem evoluiu separadamente quatro vezes (HÖLLDOLBLER; WILSON, 1990).

A tribo Camponotini contém a maioria das formigas tecelãs conhecidas, exceto o gênero *Oecophylla* (tribo Oecophyllini). À medida que a tribo Camponotini forma um clado extremamente robusto e monofilético (100% de apoio bootstrap; Figura 1), parece ser razoável presumir que a tecelagem teve pelo menos duas origens distintas: uma na tribo Oecophyllini e pelo menos uma vez na tribo Camponotini (JOHNSON et al., 2003).

Também é provável que tenha havido múltiplas origens em ambos os gêneros *Camponotus* e *Polyrhachis*, não sendo assim monofiléticos (BECKENBACH et al., 2005).

Ainda segundo Johnson et al. (2003) os resultados moleculares suportam a idéia que houve origens distintas do comportamento de tecelagem entre os gêneros *Camponotus*, *Polyrhachis* e *Dendromyrmex*. Isto é consistente com análises morfológicas das glândulas de fiação das larvas (HÖLLDOLBLER; WILSON, 1983), que sugerem que a tecelagem do ninho nas formigas evoluiu separadamente em cada um dos quatro gêneros (Figura 1).

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). A formiga *Camponotus textor* é uma espécie tecelã que foi analisada neste trabalho por ser pouco estudada. Representantes desta espécie são comuns nos cerrados brasileiros e podem beneficiar as plantas através da predação dos herbívoros (DEL-CLARO et al., 1996).

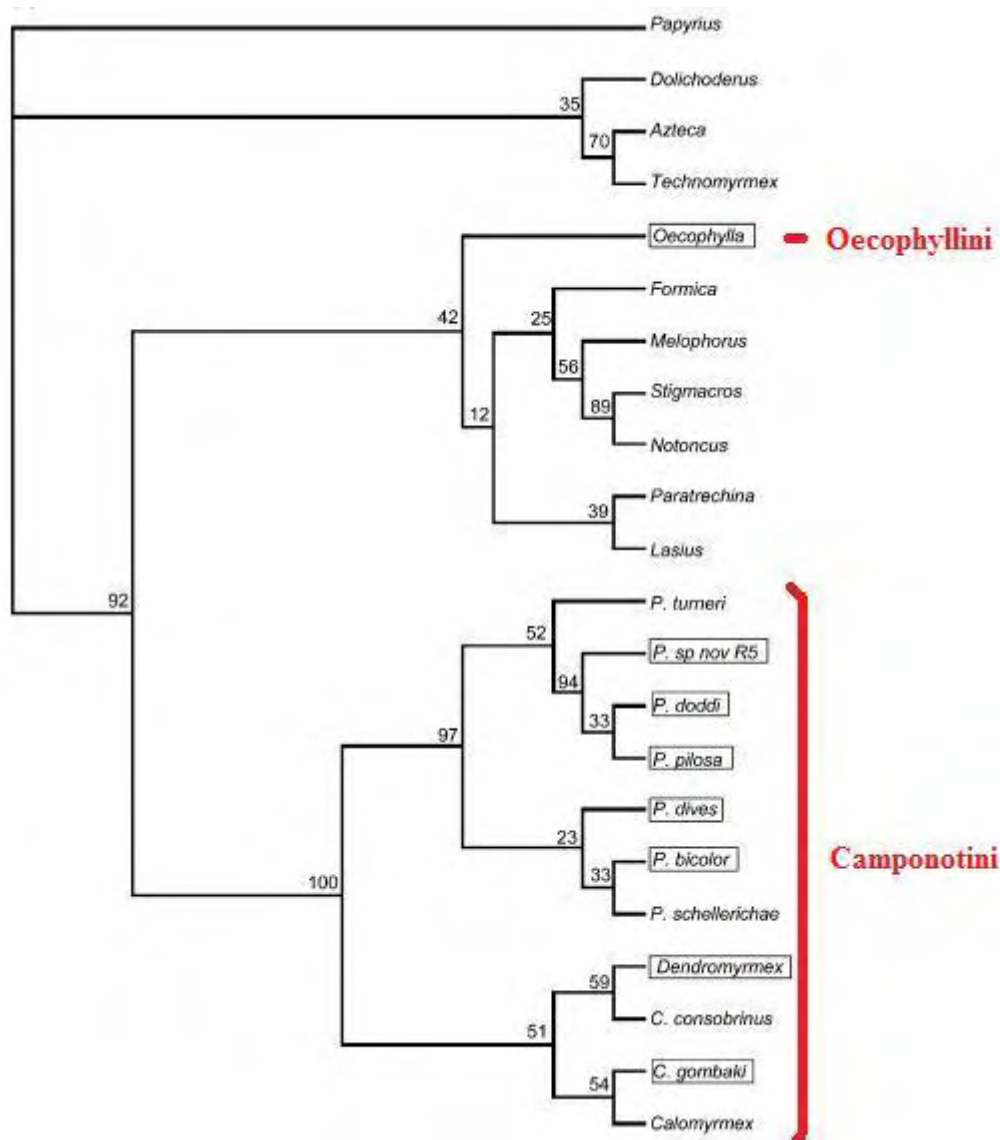


Figura 1: Árvore filogenética proposta por JOHNSON, et al. (2003) baseada em dados moleculares (DNA nucleolar), evidenciando que a tribo Camponotini é monofilética.

3.2 - Biologia da tecelã – *Camponotus textor*

Santos e Del-Claro em 2009 abordaram vários aspectos do 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 de seda do que as demais formigas tecelãs. O fato de ser poligínicas e possuir abundância no número de operárias indica que o ninho pode se fragmentar em ninhos satélites como defesa, 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. Neste 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, as fotos revelaram que a espécie em questão é polimórfica, diferente do que foi proposto por Wheeler em 1915 (ZARA et al., 2010).

Sobre o comportamento de tecelagem, sabe-se que assim como em *Oecophylla*, a operária de *C. textor* transporta entre as mandíbulas a larva até o substrato para que ela produza a seda que constituirá o ninho, que de uma maneira geral é ovóide de cor bege tendendo para o marrom, com folhas e galhos aderidos à parede (Figura 13).

Camponotus textor forrageia principalmente na vegetação da árvore hospedeira e até naquelas próximas. Alguns indivíduos foram encontrados também forrageando no solo, próximo ao ninho. A maior atividade da colônia foi observada entre 10 e 13 horas, com decaimento ao anoitecer, deixando a noite para a confecção de seu ninho. A alimentação é baseada em néctar extrafloral, secreções de lagarta de borboleta, exudato de homópteros, secreções de frutos, predação de vários insetos (como Diptera, Hymenoptera, Coleoptera, Lepidoptera, e Neuroptera), aracnídeos, e carniça de animais. Os inimigos naturais são as aranhas (Salticidae) e outras formigas pequenas como dos gêneros *Monomorium* e *Pheidole* (SANTOS, 2002).

Estudar este grupo 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 da broca (*Hypothenemus hampei* - Coleoptera) (PHILPOTT, 2005).

3.3- Classificação

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 *C. textor ruficylpeus* descrita por Emery em 1920, também com distribuição no Brasil.

Bolton (1995) cita como nomes válidos *Camponotus senex textor* e Bolton (2006) 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 (prelo) cita que *Camponotus senex* vem sendo identificada erroneamente baseada em caracteres morfológicos e sugere a distribuição representada na Figura 2. 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*.

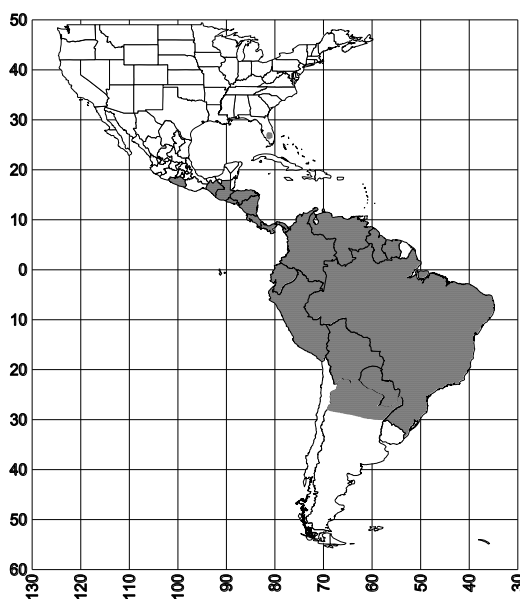


Figura 2: Mapa de distribuição de *Camponotus senex* elaborado por Mackay (no prelo).

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*.

3.4- DNA Mitocondrial

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 et al., 1987).

De acordo com Lewin (2007) observações de características genéticas que não se enquadram nos padrões mendelianos de segregação são evidências da presença de genes extranucleares. Tais observações são do início do século passado, período da redescoberta das leis de Mendel. Esses padrões diferenciados se devem à presença de um genoma mitocondrial e de cloroplastos, herdados de maneira independente em relação aos genes nucleares, conforme constatado posteriormente. 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 diminutas 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 ausência de um 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 introns 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).

3.5- Filogenia de Formicinae baseada em dados morfológicos

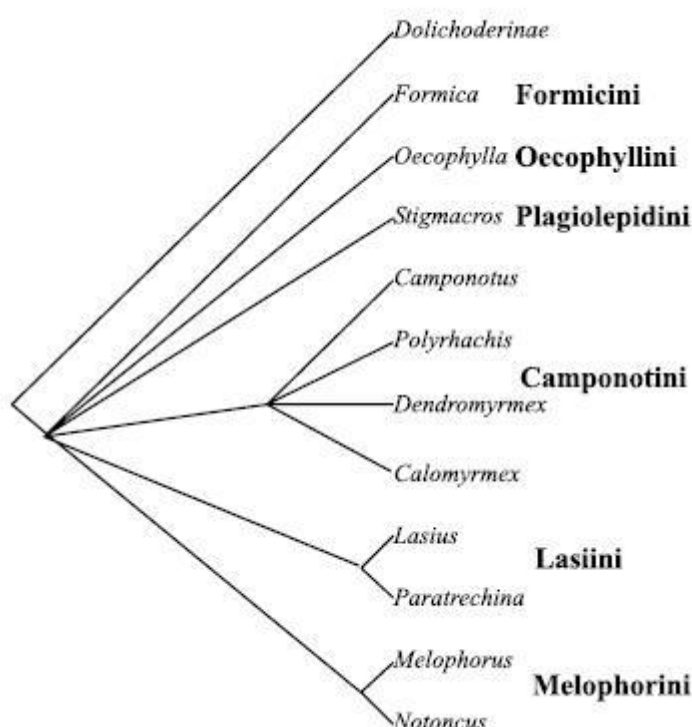


Figura 3: Árvore filogenética de Formicinae baseada em caracteres morfológicos, proposta por Bolton (1994), extraída de Johnson et al. (2003).

A família Formicidae inclui vários gêneros em que o comportamento de construção de ninhos com tecelagem tem sido observado (*Oecophylla*, *Polyrhachis*, *Camponotus* e *Dendromyrmex*).

Analisando a árvore filogenética de Formicinae (Figura 3), os gêneros *Camponotus*, *Polyrhachis*, *Dendromyrmex* e *Calomyrmex* constituem a tribo Camponotini, e esta não apresenta um representante tecelão apenas no gênero *Calomyrmex*.

Já o outro gênero que possui este comportamento de construção de ninhos com tecelagem é o *Oecophylla* da tribo Oecophyllini.

Ambas as tribos não estão estritamente relacionadas analisando as características morfológicas (Figura 3), mas acredita-se que ocorreu uma convergência adaptativa entre Camponotini e Oecophyllini do comportamento de tecelagem.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Coleta, identificação e conservação dos exemplares

Os exemplares utilizados no presente trabalho foram coletados no estado de São Paulo, nas cidades de São João da Boa Vista, Santa Rita do Passa Quatro, Limeira e Rio Claro (Tabela 1).

Operárias foram mantidas em álcool 80% sob congelamento até o momento de processamento para evitar a degradação do DNA.

Tabela 1: Localização das 5 populações de *Camponotus textor* utilizadas neste trabalho.

<i>Camponotus textor</i>	Cidade/ Estado	Coordenadas
População 1	Rio Claro/ SP	S 22° 23' 42,3" W 47° 32' 33,4"
População 2	Limeira/ SP	S 22° 33' 52" W 47° 24' 01"
População 3	Santa Rita do Passa Quatro/ SP	S 21° 42' 03,52" W 47° 29' 22,35"
População 4	São João da Boa Vista/ SP	S 21° 58' 10" W 46° 47' 56"
População 5	São João da Boa Vista/ SP	S 21° 58' 10" W 46° 47' 56"

4.2- Extração de DNA

As formigas foram trituradas, utilizando-se 50 µl de solução TNES (250 mM Tris pH 7.5, 2 M NaCl, 100 mM EDTA, 2.5% SDS) em tubos de 1,5 ml. Após trituração mais 500 µl de TNES foram colocados. A solução foi então agitada em *vortex*. O material foi incubado em banho térmico a 55°C pelo período de 3 horas. Foi adicionado 200 µl de solução de precipitação de proteína (NaCl 5 M) e após agitação em *vortex* os materiais foram centrifugados por 6 minutos a 15.000 G. Os sobrenadantes formados foram então transferidos para tubos novos, adicionando-se 600 µl de isopropanol 100%, sob agitação suave. A solução foi então centrifugada por 5 minutos a

15.000 G. O sobrenadante foi descartado. Após adição de 600 µl de etanol 70% o material foi centrifugado a 15.000 G por 6 minutos (MARANHÃO; MORAES, 2003). As amostras foram então centrifugadas a vácuo por 10 minutos e hidratadas com 30 µl de TE (10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA pH 8)

A confirmação da extração foi feita em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio ou sybr®, que se intercala entre as bases do DNA, e o uso de radiação ultravioleta permitem a visualização de bandas (NASCIMENTO et al., 1999; SOUZA, 2003).

4.3- Desenho dos Primers

A fim de detectar-se a presença de DNA nas amostras de DNA do gênero *Camponotus* foi feito o desenho de primers específicos (Camp F e Camp R) a partir de sequências de outras *Camponotus*, garantindo a especificidade do produto. Para tanto as seqüências foram recuperadas do GenBank e alinhadas utilizando-se o programa BioEdit 7.0.5 (HALL, 1999). A qualidade dos *primers* foi testada pelo programa GeneRunner 1.00 (<http://www.generunner.net/>).

Desta maneira, o primer específico de *Camponotus* foi desenvolvido: Camp F- ATCTCCYGATATAGCYTACC e Camp R- GCYCGWGTATCAATATCTA, sendo o Y correspondente as bases C e T, e W correspondente as bases A e T.

4.4- Análise do DNA Mitocondrial

Após a descrição da técnica da reação de polimerização em cadeia (PCR) pelo bioquímico Kary Mullis (1985), foi iniciada uma revolução na Biologia Molecular (SIMON et al., 1994). Esta técnica aumentou a eficiência de detecção de polimorfismos do DNA ou RNA, diminuiu o tempo de execução dos experimentos, aumentou a velocidade dos processos de seqüenciamento e facilitou a seleção de regiões de genes específicos (MATIOLI; PASSOS-BUENO, 2001) Com esta técnica, necessita-se de pouco material biológico, facilitando assim o estudo de indivíduos pequenos (PÄÄBO, 1990).

No presente trabalho foi utilizado o Kit Pure Taq Ready-To-Go-PCR Beads (GE Healthcare). Para o DNA de formigas foi utilizado 2 μ de Beat, o primer específico para *Camponotus* que foi desenvolvido, com 1 μ DNA da amostra, e foi colocado no termociclador. A técnica consiste de ciclos repetitivos; cada ciclo está dividido abaixo:

1º passo (94-96°C) - Desnaturação do DNA a alta temperatura, devido ao rompimento das pontes de hidrogênio que unem as duas fitas.

2º passo (30-60°C) - Anelamento dos primers em posições específicas (essa temperatura é definida em função da sequência nucleotídica dos primers).

3º passo (72-75°C) - Extensão da sequência a ser amplificada pela ação da DNA polimerase (AUSUBEL et al., 2003; WEAVER, 2001).

A Taq é fundamental para que ocorra o anelamento; esta é um tipo de polimerase e é termoestável. Para uma boa atividade da Taq é necessário que seu co-fator esteja presente, isto é, no caso, o Magnésio.

4.5- Purificação de produtos por PCR

Foi utilizado o kit GFX PCR e Gel Band Purification Kit (GE Healthcare), seguindo as recomendações do fabricante. O resultado da purificação foi analisado em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo.

4.6- Reação de Sequenciamento de DNA e purificação dos produtos

Foi necessário o Kit DYEnamic ET Cycle Sequencing Kit (GE Healthcare), o qual possui o Save Money e o Premix, além do primer. Uma peculiaridade deste procedimento é que no seqüenciador usa-se um primer apenas, pois também foi utilizado uma fita como molde. Portanto, a reação acontece duas vezes, uma vez para cada Primer F e R. A reação, então, foi submetida ao termociclador. Posteriormente, foi adicionado tampão de acetato de sódio/ EDTA, sendo este capaz de reduzir a quantidade de terminadores não incorporados que precipitam com DNA, eliminando manchas que distorcem os dados do Sequenciamento. Foi necessário usar o etanol para a precipitação do DNA.

4.7-Sequenciamento

O sequenciamento do ácido desoxiribonucleico (DNA) foi descrito primeiramente por Sanger et al. em 1977 e é considerado um dos feitos científicos mais importantes da ciência.

Pelo método de Sanger, uma fita simples de DNA que será sequenciada, é hibridizada com um primer de desoxinucleotídeos marcado na ponta 5'. As misturas de reação são preparadas onde os primers utilizados serão elongados por uma DNA polimerase. Cada mistura contém os quatro desoxinucleosídeos trifosfato normais mais um dos quatro didesoxinucleosídeos trifosfato em uma razão de aproximadamente 1/100. Uma vez que um didesoxinucleotídeo não tem ponta 3'-OH, não é possível haver elongação a partir do nucleotídeo adicionado, parando a reação.

Desta forma, cada mistura de reação produzirá cadeias prematuramente terminadas de acordo com toda ocorrência de um didesoxinucleotídeo adicionado. Cada mistura é então separada em um gel de sequenciamento por eletroforese para se detectar cada um dos nucleotídeos presentes na sequência de DNA lida (DARNELL et al., 1990).

A leitura das seqüências foi feita pelo seqüenciador automático 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) em gel de poliacrilamida que possui poder de resolução maior do que o da agarose.

4.8-Bioinformática

Um banco gênico (GenBank) foi criado na internet para armazenar seqüências e torná-las acessíveis para qualquer pesquisador e existem atualmente, aproximadamente 106.533.156.756 bases em 108.431.692 registros de seqüência no GenBank em divisões tradicionais e 148.165.117.763 bases de 48.443.067 registros de seqüência na divisão de WGS (*Whole Genome Shotgun*) a partir de agosto de 2009. Com as seqüências do fragmento alvo em mãos, a manipulação destas deve ser realizada em programas específicos como o Bioedit ou o Clustalw (SCHNEIDER, 2003) e as mesmas podem ser alinhadas de modo a minimizar as diferenças entre elas. As análises estatísticas podem ser efetuadas com

programas apropriados, como o pacote Mega (KUMAR et al., 1993) com as análises de *Neighbor-joining* e Máxima Parcimônia.

4.9 – Análises Filogenéticas

Os métodos atuais para construção de árvores filogenéticas podem ser baseados em matrizes de distância ou em análises de estados de caráter. No primeiro grupo, a matriz de caracteres é transformada em uma matriz de distância, e estão os métodos de UPGMA (agrupamento de pares não ponderados baseado na média aritmética), Quadrados Mínimos (LS, *least squares*), Evolução Mínimos (ME, *minimum evolution*) e Agrupamento de Vizinhos (NJ, *neighbor-joining*).

No segundo grupo, estão os Métodos de Máxima Parcimônia (MP, *maximum parsimony*), da Máxima Verossimilhança (ML, *maximum likelihood*) e Inferência Bayesiana (IB, *Bayesian Inference*) (SCHNEIDER, 2003).

No presente trabalho foram utilizados dois métodos, o de máxima parcimônia, o qual foi necessário a escolha de algumas sequências gênicas relacionadas ao citocromo oxidase I de espécies de formigas relacionadas depositadas no GeneBank, as quais foram utilizadas como grupo externo (Tabela 2), e também o método de *Neighbor-joining*, para a comparação de similaridade das sequências de *C. textor* obtidas.

O método de máxima parcimônia é baseado na suposição de que a árvore mais provável é aquela que requer o menor número de mudanças para explicar toda a variação observada na matriz de caracteres. O método se baseia no princípio da homologia, ou seja, se dois táxons compartilham uma característica é porque ela foi herdada do último ancestral comum a ambos (SWOFFORD et al., 1996; SCHNEIDER, 2003).

O método de *neighbor-joining* (NJ) foi elaborado por Saitou e Nei em 1987, e estima uma árvore a partir da distância D da matriz. Este método é muito utilizado para comparações de semelhança.

Tabela 2: Espécies de formigas, cujas sequências gênicas relacionadas ao citocromo oxidase I foram utilizadas para compor o grupo externo da árvore de máxima parcimônia.

Espécies	Códigos	Autores
<i>Camponotus quadrinotatus</i>	AB019414.1	Sameshima,S. and Hasegawa,E. (1998)
<i>Camponotus floridanus</i>	AY334397.1	Degnan,P.H., Lazarus,A.B., Brock,C.D. and Wernegreen,J.J. (2003)
<i>Camponotus castaneus</i>	AY334393.1	Degnan,P.H., Lazarus,A.B., Brock,C.D. and Wernegreen,J.J.(2003)
<i>Camponotus americanus</i>	AY334395.1	Degnan,P.H., Lazarus,A.B., Brock,C.D. and Wernegreen,J.J. (2003)
<i>Oecophylla longinoda</i>	AF398150.1	Brady,S.G., Gadau,J. and Ward,P.S. (2001)
<i>Polyrhachis vindex</i>	DQ353364.1	Moreau,C.S., Bell,C.D., Vila,R., Archibald,S.B. and Pierce,N.E. (2006)
<i>Dendromyrmex cf. traili</i>	AF398180.1	Brady,S.G., Gadau,J. and Ward,P.S.(2001)
<i>Pachycondyla nigríta</i>	GQ264596.1	Yashiro,T., Matsuura,K., Guenard,B., Terayama,M. and Dunn,R.R (2009)

5 - RESULTADOS

5.1-Extração

Foram realizadas extração de DNA das cinco populações distintas. Os resultados das reações de extração foram verificados em gel de agarose 1%, como ilustrado na Figura 4.

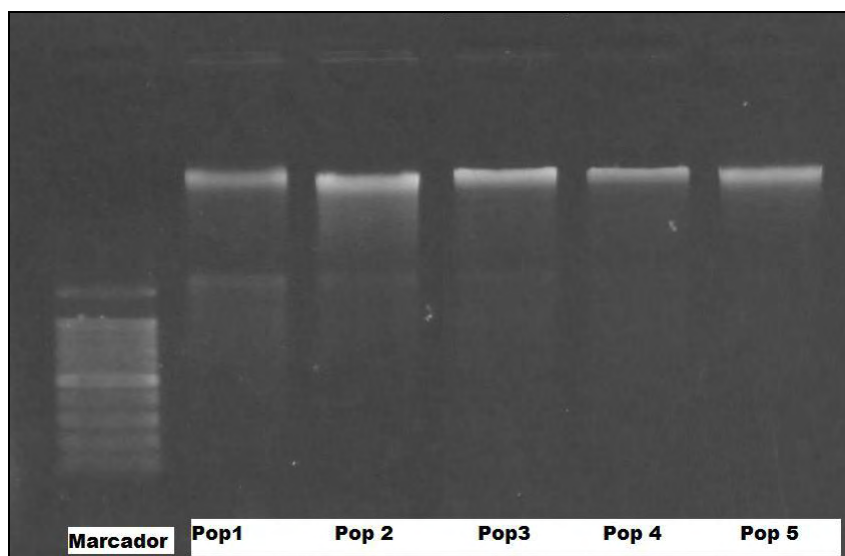


Figura 4: Fotografia do gel de agarose contendo as bandas obtidas das extrações do DNA mitocondrial de todas as populações de *Camponotus textor* estudadas, no presente trabalho.

5.2- Amplificações (Reação de polimerização em cadeia - PCR)

Utilizando-se os *primers* Camp-F e Camp-R foram realizadas amplificações de DNA do fragmento alvo para todas as populações coletadas. Os rendimentos foram significativos em todas as amostras amplificadas, sendo obtido o fragmento alvo esperado, em média com 650 pb.

Os resultados das polimerizações em cadeia foram verificados em gel de agarose 1%, conforme mostra a Figura 5.

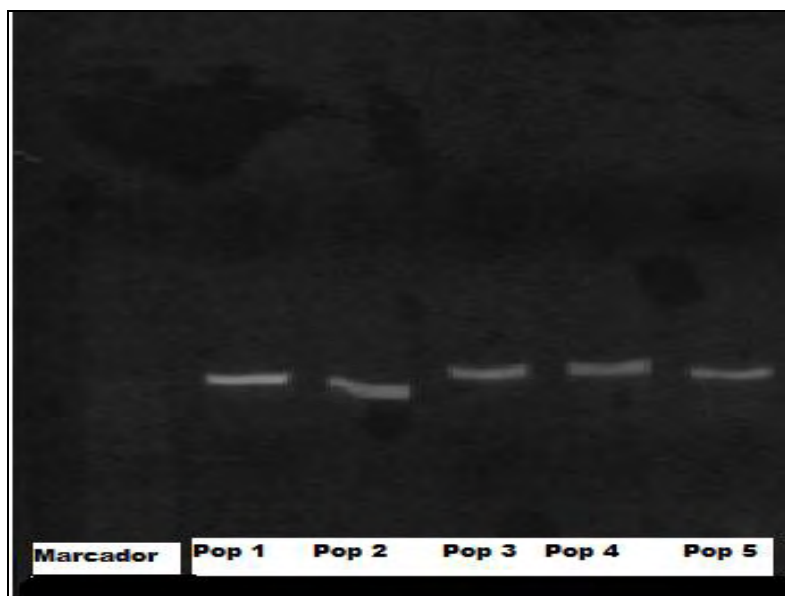


Figura 5: Fotografia do gel de agarose contendo a amplificação do fragmento de DNA mitocondrial relacionado a citocromo oxidase I de todas as populações de *Camponotus textor* estudadas.

5.3 – Purificações

As amostras amplificadas foram purificadas antes da reação de seqüenciamento. As purificações foram acompanhadas em gel de agarose 1%, como mostrado na Figura 6.

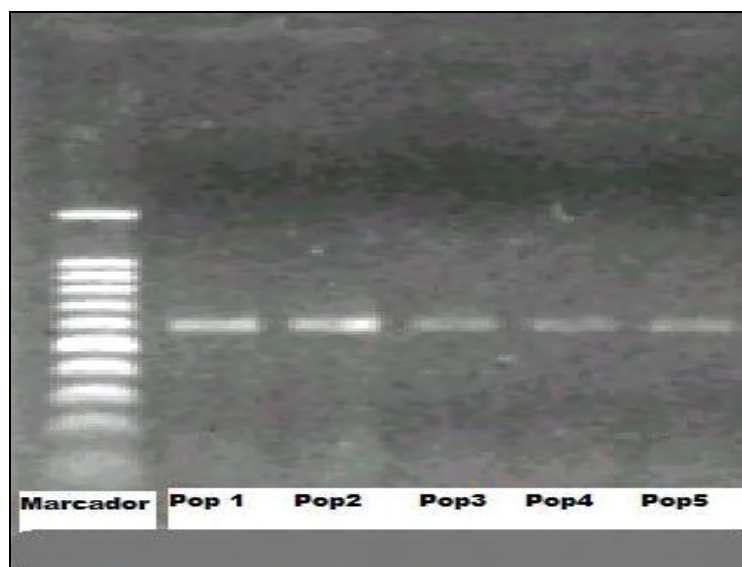


Figura 6: Fotografia do gel de agarose contendo as amostras purificadas do fragmento de DNA mitocondrial relacionado a citocromo oxidase I de todas as populações de *Camponotus textor* estudadas.

5.4 - Sequenciamento

As cinco amostras amplificadas e purificadas foram seqüenciadas e submetidas à análise de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) no NCBI (National Center for Biotechnology Information) para a conformação e foi obtido sempre o mesmo resultado (Figuras 7 e 8).

Sequences producing significant alignments:							
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AB019414.1	Camponotus quadrinotatus mitochondrial gene for cytochrome oxid	586	586	99%	5e-164	84%	
DQ353344.1	Procrystocerus batesi voucher CS0387 cytochrome oxidase subunit	534	534	99%	2e-148	82%	
AY334397.1	Camponotus floridanus cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, p	512	512	85%	9e-142	84%	
AY334393.1	Camponotus castaneus cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, r	508	508	84%	1e-140	84%	
AY334395.1	Camponotus americanus cytochrome oxidase subunit I (COI) gene,	497	497	84%	3e-137	84%	
GQ255132.1	Myrmica cf. nearctica GJ-2010 voucher GJ490 cytochrome oxidase :	462	462	98%	9e-127	80%	
EF518314.1	Pheidole bicarinata voucher RA0197 cytochrome oxidase subunit I (	462	462	98%	9e-127	80%	
EF203269.1	Crematogaster sp. K SPQ-2007 isolate SPQ.197 cytochrome oxidas	462	462	98%	9e-127	80%	
EF203264.1	Crematogaster sp. Cms SPQ-2007 isolate SPQ.C cytochrome oxida	457	457	98%	4e-125	80%	
DQ353351.1	Opisthopsis sp. CSM-2006 cytochrome oxidase subunit I (COI) gen	457	457	94%	4e-125	81%	
AY443836.2	Crematogaster sp. G SPQ-2003 isolate SPQ.160 cytochrome oxidas	451	451	98%	2e-123	80%	
GQ255190.1	Myrmica tahoensis voucher RS219-02 cytochrome oxidase subunit I	446	446	98%	9e-122	80%	
GQ255136.1	Myrmica discontinua voucher GJ491 cytochrome oxidase subunit I (	440	440	98%	4e-120	80%	
EF518353.1	Pheidole hoplitica voucher RA0528 cytochrome oxidase subunit I (c	440	440	97%	4e-120	80%	
EF203263.1	Crematogaster sp. Cms SPQ-2007 isolate SPQ.260 cytochrome oxi	440	440	98%	4e-120	80%	
GQ255205.1	Myrmica n. sp. M350 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, par	438	438	98%	2e-119	80%	
EF518352.1	Pheidole harlequina voucher RA0569 cytochrome oxidase subunit I	435	435	98%	2e-118	80%	
EF518347.1	Pheidole fissiceps voucher RA0113 cytochrome oxidase subunit I (c	435	435	99%	2e-118	79%	
EF203265.1	Crematogaster sp. L SPQ-2007 isolate SPQ.255 cytochrome oxidasi	433	433	99%	7e-118	80%	
AY443781.2	Crematogaster sp. G SPQ-2003 isolate SPQ.098 cytochrome oxidas	433	433	98%	7e-118	79%	
AY443900.2	Crematogaster sp. D SPQ-2003 isolate SPQ.403 cytochrome oxidas	431	431	97%	3e-117	80%	
FJ824437.1	Myrmica lobicornis voucher RS98-01 cytochrome oxidase subunit I	429	429	98%	9e-117	80%	
EF518420.1	Pheidole sp. b RA0516 cytochrome oxidase subunit I (coxI) gene, p	425	425	99%	1e-115	79%	
EF634196.1	Camponotus cylindricus s.l. AB cytochrome oxidase subunit I-like (t	425	425	93%	1e-115	80%	

Figura 7: Informações geradas no NCBI com a ferramenta BLAST, mostrando dados comparativos entre as sequências obtidas do gene mitocondrial relacionado à citocromo oxidase I das diferentes populações de *Camponotus textor* e aquelas de espécies relacionadas.

Na Figura 7 observar-se a proximidade de 84% de Identidade com COI de *Camponotus quadrinotatus*, com o e-value baixo de 5e-164. Nesta mesma figura ainda foram observadas a proximidade com outros COI de *Camponotus* como é o caso de *C. floridanus* (84% de identidade e e-value de 9e-142), *C. castaneus* (84% de identidade e e-value de 1e-140), e *C. americanus* (84% de identidade e e-value de 3e-137). Outras espécies de formigas apareceram na lista de proximidades, mas não com um valor de identidade tão alto e com e-value baixos como aqueles citados acima.

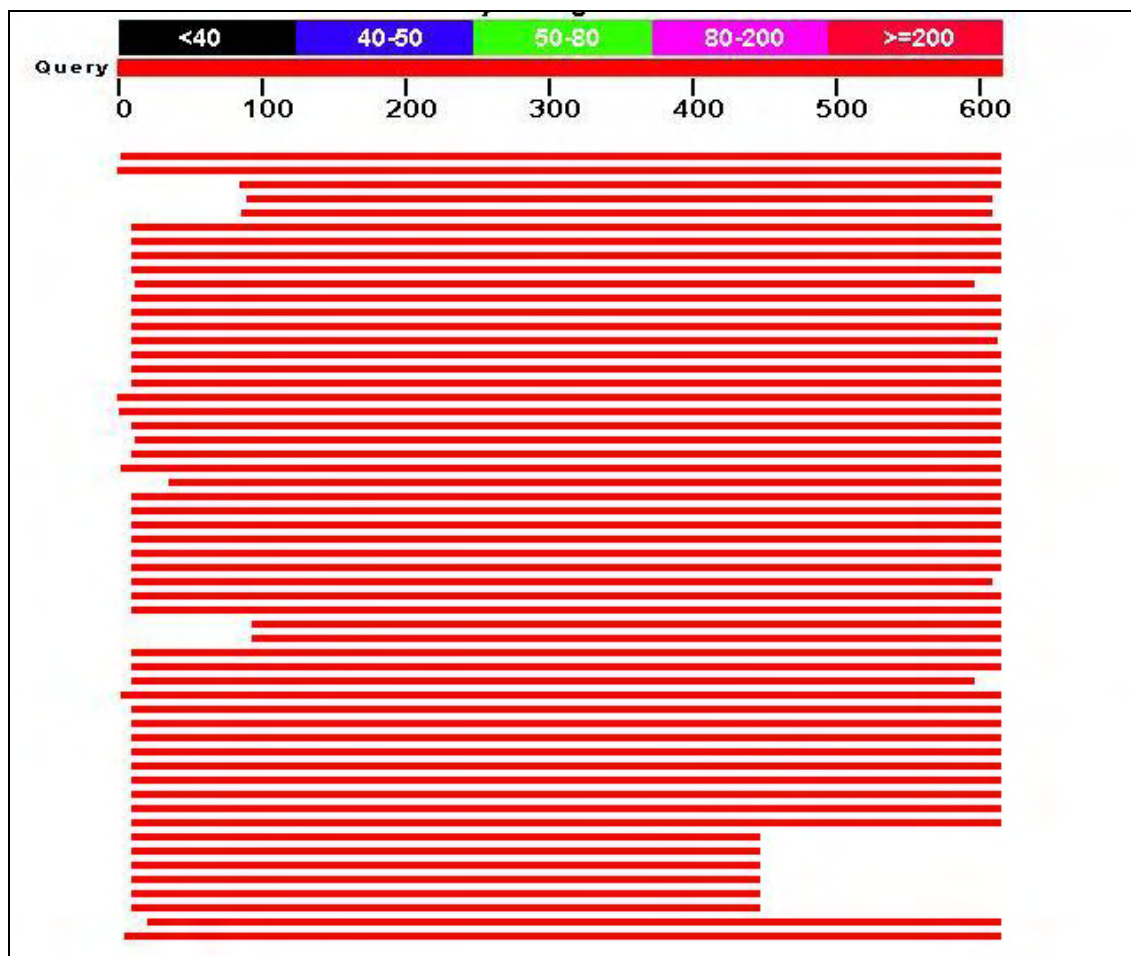


Figura 8: Gráfico gerado no NCBI com a ferramenta BLAST mostrando a confiabilidade dos resultados obtidos nas diferentes populações de *Camponotus textor*, quando comparados com aquelas de espécies relacionadas, varrendo uma vasta região do gene mitocondrial relacionado a citocromo oxidase I.

5.5 – Análises Filogenéticas

As sequências foram analisadas no Bioedit e submetidas ao alinhamento de ClustalW. Posteriormente, foram encaminhadas ao MEGA (KUMAR et al., 1993), que gerou a árvore *Neighbor-joining*, com o objetivo de comparar por similaridade as sequências obtidas do gene citocromo oxidase I de *C. textor* (Figura 9).



Figura 9: Árvore filogenética gerada pelo método *Neighbor-joining*, usado para comparação entre as sequências do gene mitocondrial citocromo oxidase I obtidas de representantes das diferentes populações de *Camponotus textor* analisadas neste trabalho.

De acordo com esta árvore, é nítida a separação em dois clados: um que agrupa as populações 1 e 2 (mesmo sem um valor de bootstrap superior a 75) e outro que inclui as populações 3, 4 e 5 sob o valor de 90 de bootstrap.

As mesmas sequências de *C. textor* foram submetidas ao método de máxima parcimônia (Figura 10). Para isto, foi necessária a escolha de sequências como grupo externo depositadas no banco de dados (Tabela 2). Foi escolhida uma sequência de *Oecophylla longinoda*, uma vez que esta também é uma tecelã, outras espécies de *Camponotus*, as quais apresentaram equivalência de 84% com a sequência obtida neste trabalho, sequência de *Dendromyrmex* e *Polyrhachis* que constituem outros gêneros de Camponotini que também possuem representantes tecelãs, e por fim, uma sequência de *Pachycondyla* que possui características plesiomórficas.

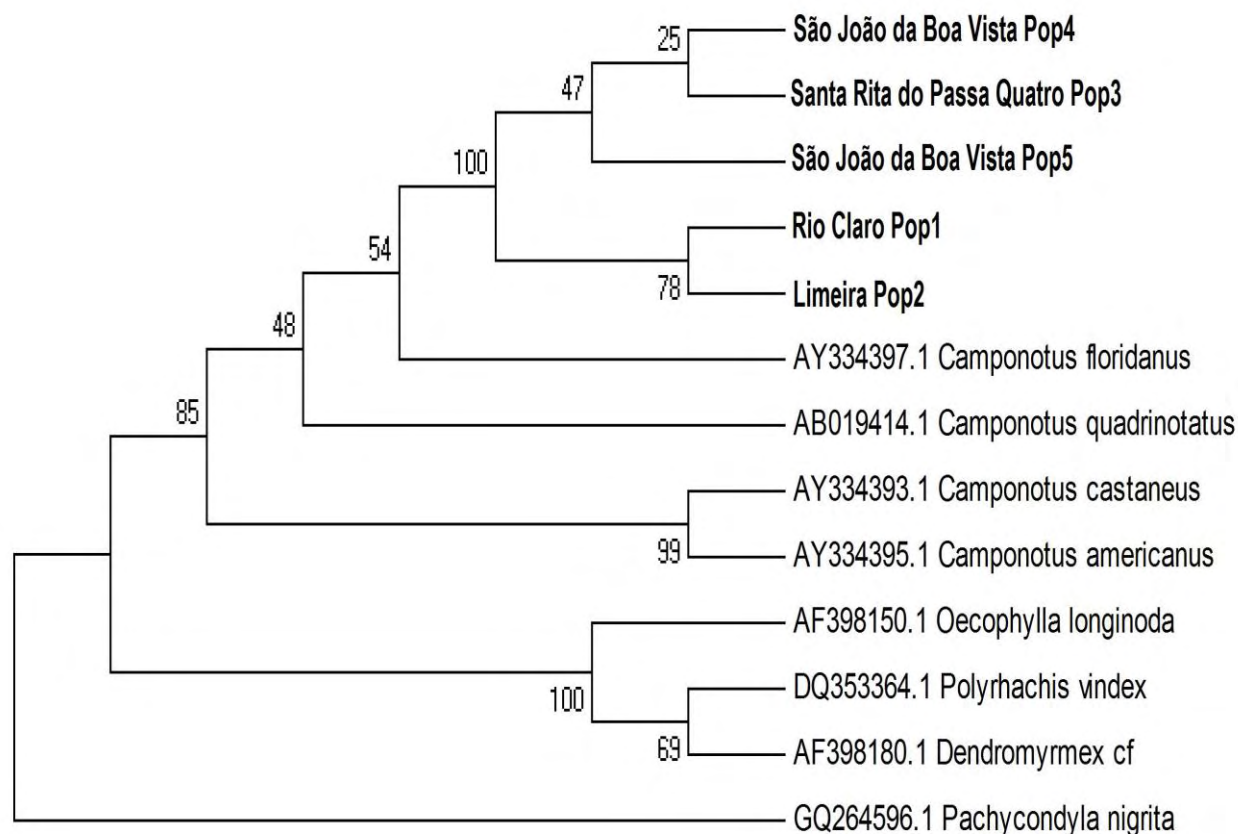


Figura 10: Árvore filogenética de máxima parcimônia com valores de bootstrap, com replicata de 5000, elaborada com base nos dados obtidos no sequenciamento do gene mitocondrial relacionado à citocromo oxidase I de representantes de *Camponotus textor* provenientes de diferentes populações de espécies relacionadas.

Os seguintes resultados para as análises das sequências de *Camponotus textor* podem ser destacados:

Populações 1 e 2 mostraram-se mais relacionadas entre si do que as outras populações, com um valor de bootstrap de 78.

As outras populações de *C. textor* não apresentaram um valor de bootstrap superior a 75, portanto não podem ser separadas dentre as sequências da mesma espécie.

Todo o clado de *Camponotus textor* obteve um bootstrap de 100, evidenciando que as sequências de todas as populações estão fortemente relacionadas.

Analisando as sequências obtidas em banco de dados, *C. quadrinotatus* e *C. floridanus* apresentam-se mais relacionadas a todas as populações de *C. textor*, embora o valor de bootstrap seja inferior a 75.

Embora *C. castaneus* e *C. americanus* estejam fortemente relacionadas com valor de bootstrap de 99, elas estão mais afastadas de *C. textor* com o valor de bootstrap de 85.

Todo clado do gênero *Camponotus* apresentou-se monofilético com o bootstrap de 85, enquanto que o clado da tribo Camponotini aparece como polifilético.

Os resultados encontrados de *Camponotus textor* nessas análises demonstram a ocorrência de uma maior relação entre as sequências das populações 1 e 2, oriundas respectivamente de Rio Claro e Limeira, do que a população 3 de Santa Rita do Passa Quatro e as populações 4 e 5 de São João da Boa Vista.

A árvore obtida pela ferramenta *Compute Condensed tree* foi muito semelhante, porém evidenciou as sequências com politomia (Figura 11).

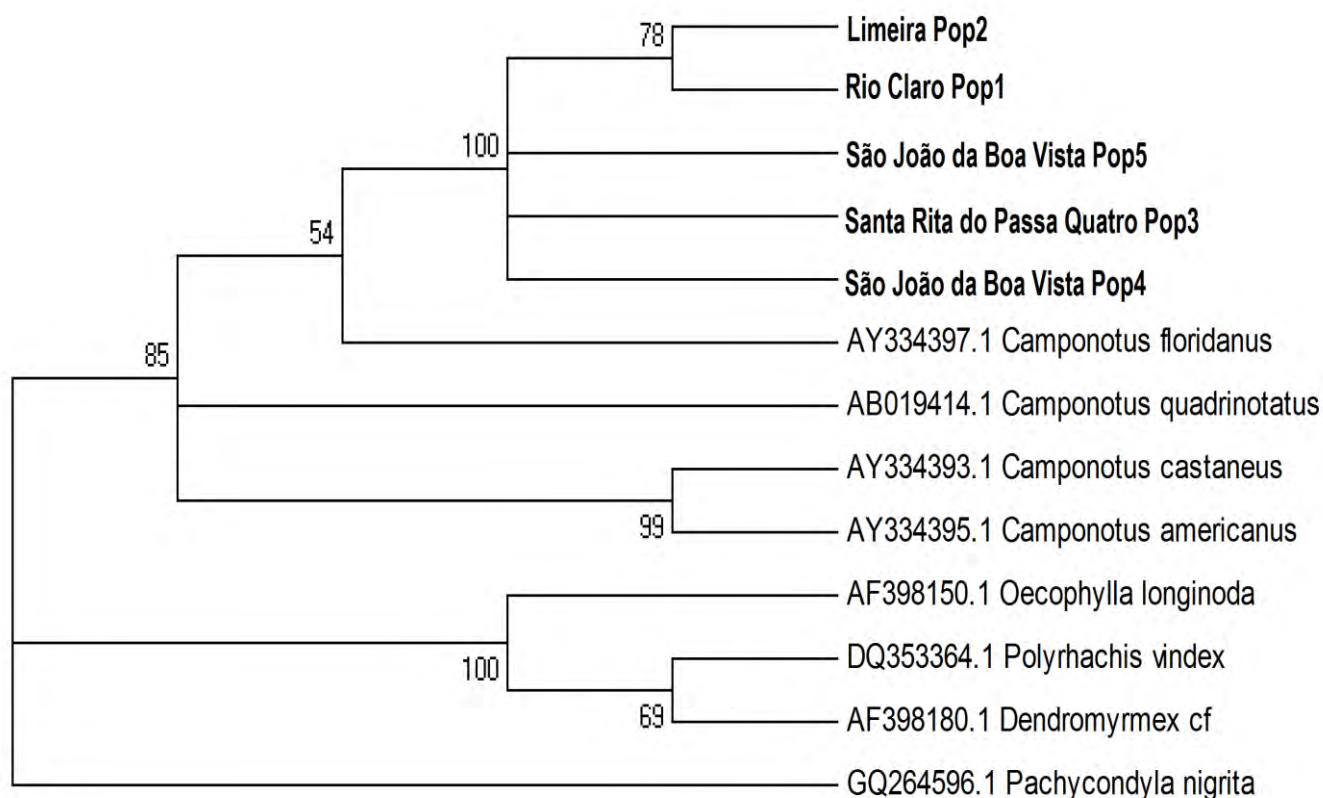


Figura 11: Árvore filogenética de máxima parcimônia com valores de bootstrap, agora evidenciando politomia, com replicata de 5000, elaborada com base nos dados obtidos no sequenciamento do gene mitocondrial relacionado à citocromo oxidase I de representantes de *Camponotus textor* provenientes de diferentes populações de espécies relacionadas.

A politomia é caracterizada por muitos ramos com base temporal, onde as relações filogenéticas não podem ser totalmente resolvidas em dicotomias.

Em árvores filogenéticas, a politomia é representada com um nó onde possui mais de dois nós de descendentes imediatos. Na Figura 11, é possível a observação de politomia entre as populações 4, 3 e 5, com as populações 1 e 2 de *Camponotus textor*. Também foi possível a observação de politomia *Camponotus quadrinotatus* com todas as populações de *Camponotus textor* e mais a *Camponotus floridanus*.

A presença de politomias na análise significa que a relação de parentesco não está totalmente resolvida, necessitando de estudos adicionais.

De acordo com essas observações, a análise filogenética com politomia (Figura 11) explica os resultados encontrados na árvore filogenética na Figura 10. Os valores de bootstrap muito inferiores são transformados em politomia, uma vez que não possuem um valor realmente informativo de relação de parentesco.

6 - DISCUSSÃO

Não existem trabalhos de filogenia para a elucidação do grau de parentesco entre as espécies de *Camponotus*, pois devido à imensa diversidade do gênero, muitas dessas espécies foram identificadas erroneamente (MACKAY, no prelo). Adotando a abordagem molecular, muitas das questões ainda sem solução poderão ser elucidadas, principalmente em espécies parecidas morfologicamente.

De acordo com a análise pelo método *neighbor joining* pode-se separar as sequências de COI de *Camponotus textor* em duas linhagens: populações 1, 2 e 3, 4 e 5 em outra. Esse resultado também foi confirmado através da análise pelo método de Máxima Parcimônia, onde as populações 1 e 2 obtiveram um valor de bootstrap de 78.

Essas populações foram retiradas de Rio Claro e Limeira (população 1 e 2, respectivamente), cuja distância é menor comparada com as populações 3 de Santa Rita do Passa Quatro, e 4 e 5 de São João da Boa Vista (Tabela 1). Essas distâncias estão representadas na Figura 12.

O transporte de formigas, conseqüentemente o fluxo gênico, pela atividade humana é comum o suficiente para reduzir os efeitos de barreiras geográficas e distância física. Por outro lado, esses movimentos não devem ser tão frequentes e regulares de maneira a prevenir a contínua divergência genética de populações geográficas (AHRENS et al., 2005). Portanto, a separação geográfica pode ser uma explicação para a diferenciação das sequências em duas linhagens.

Pontos de Coleta das Amostras

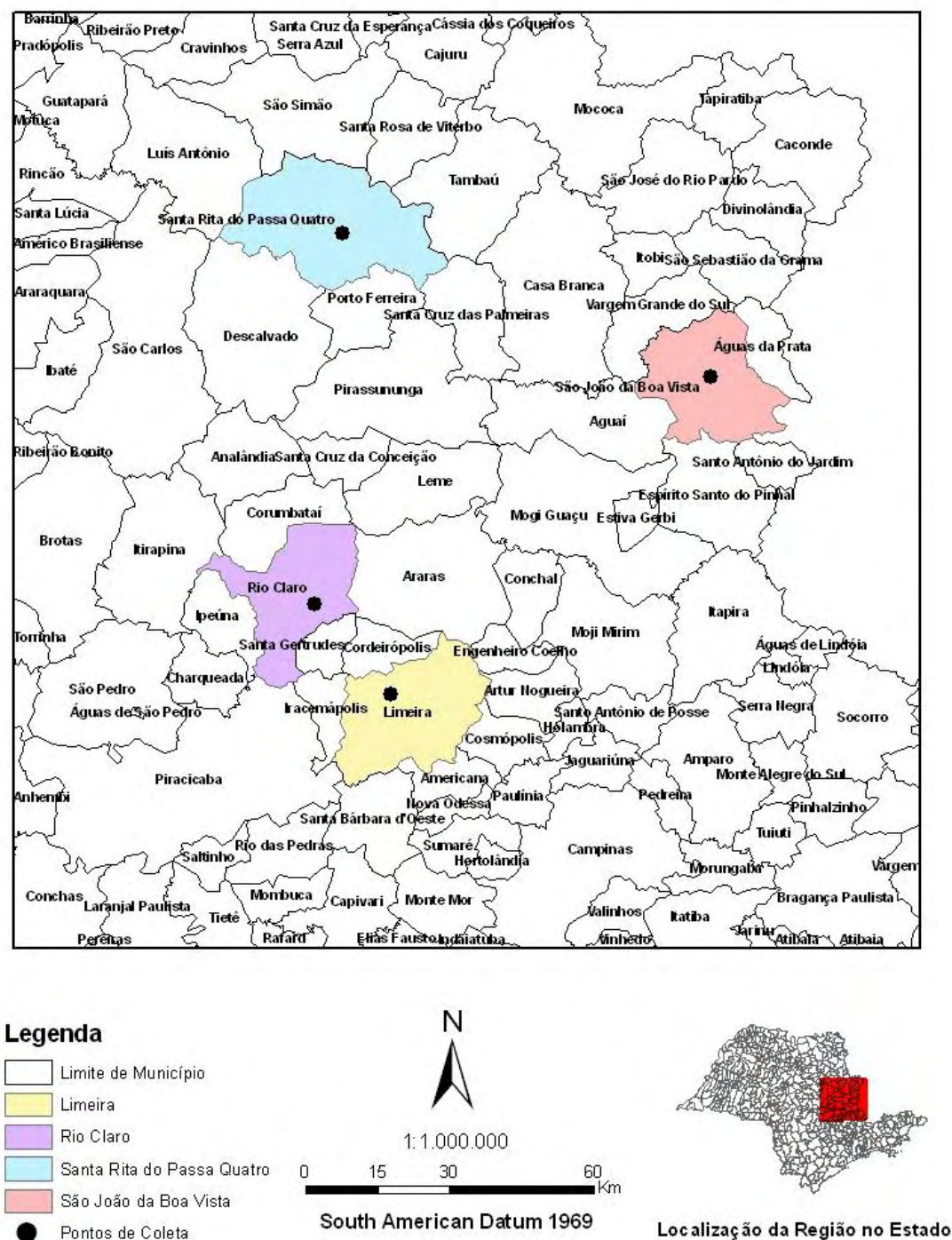


Figura 12: Localização das cidades onde foram realizadas as coletas de representantes de *Camponotus textor*.

Outra questão que dificulta o esclarecimento da filogenia tanto de *Camponotus* como o dos Hymenoptera em geral, é o excesso de nucleotídeos

AT no genoma mitocondrial (KOULIANOS; CROZIER, 1999). As sequências obtidas confirmam um número excessivamente baixo de GC, em média de 30%, reiterando a problemática.

Analisando a árvore filogenética pelo método de Máxima Parcimônia, pode também observar a presença de politomias dentre as populações 3, 4 e 5 de *C. textor*. A presença de politomias na análise significa que a relação de parentesco não está totalmente resolvida, necessitando de mais estudos.

Ao utilizar o método de Máxima Parcimônia para o gênero *Camponotus* ficou evidente que ele é monofilético, obtendo um bootstrap de 85.

Com apenas a análise do COI não foi possível a separação da tribo Camponotini em um clado monofilético, como foi proposto por Johnson et al. (2003), mas estudos adicionais serão necessários para elucidar essa questão do comportamento de tecelagem como convergência adaptativa.

Pela análise de apenas um exemplar de cada população, não foi possível o esclarecimento do grau de parentesco dentro das populações estudadas, uma vez que a espécie possui diversas rainhas, ou seja, é poligínica e, portanto pode apresentar uma variedade de genoma mitocondrial. Entretanto, como parâmetro inicial de análises moleculares, os dados iniciais são importantes e servirão para dar continuidade aos estudos.

7- CONSIDERAÇÕES FINAIS

A continuidade deste trabalho é necessária para aprimorar a caracterização molecular das populações de *C. textor*, embora uma parte inicial já tenha sido analisada neste trabalho.

Para isto, será necessário considerar três aspectos: incluir a análise de exemplares de outras localidades, de preferência mais distantes geograficamente, aumentar a amostragem dentro de cada população, para entender a ocorrência de poliginia, e aumentar o número de genes analisados nas sequências, uma vez que trará mais significância ao trabalho.

Com a análise de apenas cinco populações de *C. textor*, já foi possível a separação de duas linhagens, dependendo da posição geográfica (Figura 11). É possível que esse número aumente com novos estudos.

8- CONCLUSÕES

O presente trabalho caracterizou molecularmente, pela primeira vez na literatura, o fragmento COI do gene mitocondrial de cinco populações de *Camponotus textor* provenientes de diferentes localidades do estado de São Paulo. Assim, foi possível a separação de duas linhagens, aparentemente dependentes da distância geográfica.

9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, K.L. et al. 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.

AHRENS, M. E. et al. Phylogeographic structure of the fire ant *Solenopsis invicta* in its native south American range: roles of the natural barriers and habitat connectivity. **Evolution**, v. 59, p.1733-1743. 2005.

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.

AVISE, J. C. **Molecular Markers, Natural History, and Evolution**. Nova York: Ed. Chapman and Hall. 1994.

AUSUBEL, F. M. et al. **Current protocols in molecular biology**, New York: John Wiley, p.4755. 2003.

BEARD, C. B. et al. 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.

BECKENBACH, A. et al. Single nucleotide +1 frameshifts in an apparently functional mitochondrial cytochrome b gene in ants of the genus *Polyrhachis*. **Journal of Molecular Evolution**, v.60, p.141–152. 2005.

BENZIE, J. et al. 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. et al. 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.

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

BOLTON, B. G. **Identification Guide to the Ant Genera of the World**. Harvard University Press, Cambridge, MA. 1994.

BOLTON, B. G. et al. **Bolton catalogue of Ants of the World**, Harvard University Press, Cambridge. 2006.

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

DARNELL, J. et al. **Molecular Cell Biology**, 2.Ed. Scientific American Books. Distributed by W. H. Freeman and Company, New York, 1990.

DEL-CLARO, K. et al. 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. et al. Population structure and intraspecific aggression in the invasive ant species *Anoplolepis gracilipes* in Malaysian Borneo. **Molecular Ecology**, v.16, p.1453-1465. 2007.

FISHER, B.L.; ROBERTSON, H.G. Silk production by adult workers of the ant *Melissotarsus emeryi* (Hymenoptera, Formicidae) in South African fynbos. **Insectes Sociaux**, v.46, p.78–83. 1999.

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, et al. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v.270, p.313-321. 2003.

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

HÖLLDOLBLER, B.; WILSON, E.O. The evolution of communal nestweaving in ants. **American Scientist**, v.71, p.490–499. 1983.

HÖLLDOLBLER, B.; WILSON, E. O. Weaver ants. **Scientific American**, v.237, n.6, p. 146-154. 1977.

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

JOHNSON, et al. A tree island approach to inferring phylogeny in the ant subfamily Formicinae, with especial reference to the evolution of weaving. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.29, p.317–330. 2003.

KEMPF, W.W. Catálogo Abreviado das Formigas da Região Neotropical (Hymenoptera: Formicidae). **Studia Ent.**, v. 15. 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**, v.49, p.44–48. 1999.

KUMAR, et al. **MEGA: molecular evolutionary genetics analysis**, v. 2. Pennsylvania State University. 1993.

LESSINGER, et al. The mitochondrial genome of the primary screwworm fly *Cochliomyia heminivorax* (Diptera: Calliophoridae). **Insect Molecular Biology**, n.9, p.521-529. 2000.

LEWIN, B. Organelle genomes. In: LEWIN, B. (Ed.). **Genes IX**. Nova York: Oxford University Press and Cell Press. 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)**. No prelo.

MARANHÃO, A.Q., MORAES, L.M.P. Extração e purificação de DNA. In: AZEVEDO, M.O.; FELIPE, M.S.S; BRIGIDO, M.M.; MARANHÃO, A.Q.; DE-SOUZA, M.T. (Org)s. **Técnicas Básicas em Biologia Molecular**, Brasília: Editora UnB, p. 49-72. 2003.

MATIOLI, S. R ; PASSOS-BUENO, M. R. S. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucléicos. In: MATIOLI, S. R. (Ed.). **Biologia molecular e evolução**, Ribeirão Preto: Holos, p.153-161. 2001.

MITCHELL, et al. The mitochondrial genome of *Anopheles quadrimacullatus* species: A complete nucleotide sequence and gene organization. **Genome**, n.36, p.1058-1073. 1993.

MORITZ, et al. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 18, p. 269-292, 1987.

NASCIMENTO, et al. **Tecnologia do DNA recombinante**, Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 1999.

PÄÄBO, S. Amplifying ancient DNA. In: INNES, M. A.; G ELFAND, D. H.; S NINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Eds.). **PCR protocols**. San Diego: Academic, p.159-166. 1990.

PALUMBI, S. Nucleic Acids II. The polymerase chain reaction. In: HILLIS, D. M.; MORITZ, C.; MABLE, B. K. (Ed.). **Molecular Systematics**, 2. ed. Sunderland: Sinauer Press, p. 205-248.1996.

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, et al. 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.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v.4, p.406-425. 1987.

SANGER, et al. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.74,p.5463-5467. 1977.

SANTOS, J. C. **Ecologia e comportamento de formigas tecelãs (*Camponotus*) do cerrado brasileiro**. 2002. 103 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Ecologia de Conservação de Recursos Naturais, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, 2002.

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.

SCHNEIDER, H. **Métodos de análise filogenética**: um guia prático. Ribeirão Preto: Holos; Sociedade Brasileira de Genética, 2003.

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

SHOEMAKER, et al. 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.

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

SIMON, C. et al. 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. et al. 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.

SOUZA, M. T. **Técnicas básicas em biologia molecular**. Brasília, DF: Universidade de Brasília, 2003.

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

WATSON, J. D. et al. Recombinant DNA and evolution. In: WATSON, J.D. (Ed.). **Recombinant DNA**, Nova York: Scientific American, p.433-451. 1993.

WEAVER, R. F. **Molecular biology**. Lawrence: University of Kansas, 2001.

WHEELER, W. M. On the presence and absence of cocoons among ants, the nest-spinning habits of the larvae and the significance of black cocoons among certain Australian species. **Annals of the Entomological Society of America**, v.8, p.323-342. 1915.

WILSON, E. O. et al. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. **Biological Journal of the Linnean Society**, v.26, p.375– 400. 1985.

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

YUKUHIRO, K. et al. Not trivial level of sequence divergence, and sequence rearrangements of mitochondrial genome between the wild mulberry silkmoth, *Bombyx mandarina*, and its close relative, the domesticated silkmoth *Bombyx mori*. **Molecular Biology and Evolution**, v.19, p.1385-1389. 2002.

ZARA, F. J. et al. Post-embryonic development of larvae on the weaver ant *Camponotus textor* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 55, n. 2, p. 557- 578. 2010.

ANEXOS

Figura 13: Ninho de *Camponotus textor* evidenciando alguns representantes da espécie. Amostra de Santa Rita de Passa Quatro, SP, denominada como Pop4. Fotografia: Manuela de Oliveira Ramalho.



Figura 14: Ninho de *Camponotus textor* cuja localização pode ser nas extremidades das árvores. Foto de Manuela de Oliveira Ramalho.



Figura 15: *Camponotus textor* durante o forrageio. Foto de Manuela de Oliveira Ramalho



Figura 16: Ninho de *Camponotus textor* associado à plantação de café. Foto de Odair Correa Bueno.



Figura 17: Ninho de *Camponotus textor* (seta) associado à plantação de café, mais detalhes. Foto de Odair Correa Bueno.



Figura 18: Detalhe no forrageio da formiga *Camponotus textor*. Foto de Odair Correa Bueno.



Figura 19: Operárias de *Camponotus textor* carregando a larvas. Seta indica a larva. Foto de Odair Correa Bueno.



Figura 20: Detalhe interno do ninho de *Camponotus textor*.



Figura 21: Fios de seda originados a partir da saliva das larvas de *Camponotus textor*. Foto de Odair Correa Bueno.