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

ANÁLISES MOLECULARES DE POPULAÇÕES DE *Wasmannia auropunctata* ROGER,
1863 (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) E DA PRESENÇA DE ENDOSSIMBIONTES

LARISSA MARIN RODRIGUES SILVA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

LARISSA MARIN RODRIGUES SILVA

ANÁLISES MOLECULARES DE POPULAÇÕES DE *Wasmannia auropunctata* ROGER,
1863 (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) E DA PRESENÇA DE ENDOSSIMBIONTES

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências do Câmpus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Mestra em Ciências Biológicas (Biologia
Celular e Molecular).

Orientador: Prof. Dr. Odair Correa Bueno

Co-orientador: Dr. Vanderlei Geraldo Martins

Março - 2015

595.796 Silva, Larissa Marin Rodrigues
S586a Análises moleculares de populações de *Wasmannia*
auropunctata Roger 1863 (Hymenoptera: Formicidae) e da
presença de endossimbiontes / Larissa Marin Rodrigues Silva.
- Rio Claro, 2015
44 f. : il., figs., quadros, mapas

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Odair Correa Bueno
Coorientador: Vanderlei Geraldo Martins

1. Formiga. 2. Pequena formiga-de-fogo. 3. Wolbachia. 4.
Caracterização molecular. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: ANÁLISES MOLECULARES DE POPULAÇÕES DE *Wasmannia auropunctata* ROGER, 1863 (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) E DA PRESENÇA DE ENDOSSIMBIOTES

AUTORA: LARISSA MARIN RODRIGUES SILVA

ORIENTADOR: Prof. Dr. ODAIR CORREA BUENO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:



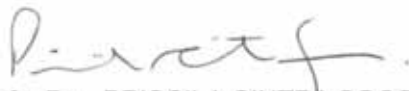
Prof. Dr. ODAIR CORREA BUENO

Departamento de Biologia / Instituto de Biociências de Rio Claro



Profa. Dra. MARIA SANTINA DE CASTRO MORINI

Núcleo de Ciências Ambientais / Universidade de Mogi das Cruzes



Profa. Dra. PRISCILA CINTRA SOCOLOWSKI

CEIS / Instituto de Biociências de Rio Claro

Data da realização: 27 de fevereiro de 2015.

AGRADECIMENTOS

À minha família, que sempre acreditou mais em mim do que eu mesma e sempre me incentivou a alçar voos maiores.

Ao primeiro e único amor da minha vida, por todo o companheirismo, paciência e por sempre apoiar meus sonhos, não importando quão malucos sejam.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Odair Correa Bueno pela oportunidade e por me encantar com seus conhecimentos e ideias na área de Mirmecologia.

Ao meu co-orientador, Dr. Vanderlei Geraldo Martins por me apresentar à Biologia Molecular e, com enorme paciência, me ensinar a lidar com suas inexatidões.

Às minhas amigas e co-orientadoras extraoficiais: Viviane Tofolo, Cintia Martins e Manuela Ramalho, pelo carinho, inúmeros suportes na hora do sufoco, discussões e trocas de ideias aleatórias.

A todos que me ajudaram nas coletas (Prof. Vanderlei, Vivi, João, Alex, Daniela), àqueles que gentilmente doaram amostras para o presente trabalho (Prof. Laurent Keller, Profª. Dra. Ana Souza, Tae Fernandes, Aline Nondillo, Eliana Garzón e Juan C. Abadia) e principalmente àqueles que me receberam com tanto carinho e atenção (Prof. Dr. Jacques Delabie, Sr. Zé Maia e integrantes do Laboratório de Mirmecologia da CEPLAC e ao Prof. Dr. Antônio Mayhé e Bianca Ferreira da UFRRJ).

À Prof. Dra. Maria Santana Morini, à Dra. Priscila Socolowski e ao Dr. Alexsandro Vieira pelas sugestões apresentadas tanto na qualificação quanto na defesa da dissertação.

Aos queridos “amigos do lab.” e da vida que me acompanharam em mais essa etapa.

A todos que me receberam em Rio Claro e ao “bonde das caronas”, pela companhia, paciência e por amenizarem minhas preocupações.

Ao programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular e a CAPES, pelo auxílio financeiro.

The Road Not Taken

(Robert Frost)

*Two roads diverged in a yellow wood
And sorry I could not travel both
And be one traveler, long I stood
And looked down one as far as I could
To where it bent in the undergrowth;*

*Then took the other, as just as fair
And having perhaps the better claim,
Because it was grassy and wanted wear;
Though as for that, the passing there
Had worn them really about the same,*

*And both that morning equally lay
In leaves no step had trodden black.
Oh, I kept the first for another day!
Yet knowing how way leads on to way,
I doubted if I should ever come back.*

*I shall be telling this with a sigh
Somewhere ages and ages hence:
Two roads diverged in a wood and I—
I took the one less traveled by,
And that has made all the difference.*

RESUMO

Wasmannia auropunctata é uma espécie de formiga generalista e nativa da região Neotropical que tem se dispersado mundialmente. Quando introduzida em novas áreas, muitas vezes por ação antrópica, pode causar problemas ambientais, econômicos e de saúde pública. Diferenças encontradas entre populações introduzidas e nativas, ou sexuais e clonais tem aumentado o interesse por essa espécie, assim como alternativas para seu controle. O endossimbionte *Wolbachia*, além de ser amplamente distribuído entre os artrópodes e ser responsável por causar alterações reprodutivas em seus hospedeiros, tem sido considerado como um possível agente de controle para diversas espécies. Buscando compreender melhor a relação existente entre esses dois organismos e aumentar os perfis moleculares de populações na América do Sul, operárias de *W. auropunctata* de 31 pontos de coleta provenientes do Brasil e da Colômbia foram analisadas através da amplificação por PCR e sequenciamento de Sanger dos genes nuclear (*28S rDNA*) e mitocondrial (COI, IGS, tRNA e COII), assim como do gene *wsp* e *coxA* do endossimbionte. Através da caracterização molecular das operárias e de seus endossimbiontes e da análise das redes de haplótipos para ambos, observou-se que há evidências de que: o Leu-tRNA e o IGS entre o COI e COII podem ser utilizados para auxiliar na diferenciação inter e intraespecífica, respectivamente; o fragmento do gene *28S rDNA* utilizado neste trabalho não deve ser utilizado sozinho para a identificação dessas formigas; amostras que apresentam IGS menor representam uma linhagem mais antiga; dispersão natural e por ação antrópica podem ter ocorrido entre as amostras analisadas; o gene *coxA* é o mais indicado para a detecção de *Wolbachia* nessas formigas do que o gene *wsp*; transmissão vertical e horizontal do endossimbionte são passíveis de estarem ocorrendo; dois dos alelos encontrados para o gene *coxA* podem estar envolvidos na especialização de *Wolbachia* em formigas. Embora o presente trabalho apresente dados inéditos e hipóteses interessantes, estudos futuros são necessários para atingir a melhor compreensão da evolução dos sistemas envolvidos.

Palavras-chave: Pequena formiga-de-fogo. *Wolbachia*. Caracterização molecular.

ABSTRACT

Wasmannia auropunctata is a generalist ant, native of the Neotropical region that has being spread in worldwide scale and when introduced in new areas, many times by human transportation, can cause environmental, economics and health service troubles. Control alternatives and differences between introduced and native populations as well as between clonal and sexual colonies, has increased the interest about this species. The endosymbiont *Wolbachia*, the most widespread between arthropods, is responsible for many reproductive manipulations in its hosts and has been considered as a possibility of control agent for several species. Thus, the aim of this work was better understand the relationship between these two organisms and increase the molecular profiles of populations in South America. For this purpose, workers of 31 collection points were analyzed by PCR amplification and Sanger's sequencing of the nuclear (*28S rDNA*) and mitochondrial (*COI*, *IGS*, *tRNA* e *COII*) genes, as well as *wsp* and *coxA* genes from the endosymbiont. The molecular characterization of workers and their endosymbionts and the Network analysis from both showed that there is evidences for believe that: the Leu-tRNA and the IGS between the COI and COII genes could be used to help in the inter and intraspecific distinction of these ants, respectively; the region of *28S rDNA* should not be used alone as a marker to the identification of these ants; the samples that presented shorter IGS could represent ancient populations; natural dispersal and human transportation are likely to be occurring between the samples screened; the *coxA* gene is more appropriate than the *wsp* gene for detection of *Wolbachia* in this ants; vertical and horizontal transmission of the endosymbiont can be occurring; two of the alleles found in this work may be involved in ants specialization. Although this work brings new data and interesting hypothesis, more studies are needed to achieve a better understanding of the evolution of the systems involved.

Keywords: Little fire ant. *Wolbachia*. Molecular characterization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mapa ilustrando a localidade de cada coleta de <i>Wasmannia auropunctata</i>	18
Figura 2 - Localidade dos sítios amostrais de coleta de <i>Wasmannia auropunctata</i>	19
Figura 3 - Variação do IGS de <i>Wasmannia auropunctata</i>	23
Figura 4 - Leu-tRNA de <i>Wasmannia auropunctata</i>	24
Figura 5 - Mitótipos de <i>Wasmannia auropunctata</i>	25
Figura 6 - Rede de haplótipos mitocondriais (mitótipos) de <i>Wasmannia auropunctata</i>	26
Figura 7 - Haplótipos do gene <i>coxA</i>	29
Figura 8 – Rede de haplótipos do gene <i>coxA</i>	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PCR	-	Polymerase Chain Reaction (Reação de Polimerização em Cadeia)
DNA	-	Ácido desoxirribonucleico
rDNA	-	DNA ribossomal
COI	-	Citocromo oxidase I
IGS	-	Espaçador intergênico
tRNA	-	RNA transportador
COII	-	Citocromo oxidase II
Leu-tRNA	-	RNA transportador de Leucina
MLST	-	Multilocus Sequencing Typing
BLASTn	-	Basic Local Alignment Search Tool
GPS	-	Global Positioning System

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	OBJETIVOS.....	17
3	MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1	Áreas de coleta	18
3.2	Conservação, identificação dos espécimes e extração de DNA	20
3.3	Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) e sequenciamento	20
3.4	Análises moleculares	21
4	RESULTADOS	23
4.1	Caracterização molecular de amostras de <i>W. auropunctata</i>	23
4.1.1	DNA mitocondrial	23
4.1.2	DNA nuclear.....	27
4.2	Caracterização molecular do endossimbionte <i>Wolbachia</i>	27
4.2.1	Caracterização pelo gene <i>wsp</i>	28
4.2.2	Caracterização pelo gene <i>coxA</i>	28
5	DISCUSSÃO.....	31
5.1	Caracterização molecular de <i>W. auropunctata</i> e relação entre as colônias	31
5.2	Caracterização molecular do endossimbionte em colônias de <i>W. auropunctata</i>	33
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
	REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

Formigas são insetos eussociais que têm habitado a superfície terrestre possivelmente por mais de 100 milhões de anos (WARD, 2007). Desenvolvendo papéis importantes como revolvimento do solo, dispersão de sementes, enriquecimento nutricional do solo (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990), polinização (PHILPOTT; UNO; MALDONADO, 2006) e proteção de plantas contra herbívoros (KOPTUR, 1984) ou apresentando incríveis adaptações como resistência à radiação e à poluição e sobrevivência embaixo d'água (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990), já foram descritas mais de 12 mil espécies com muitas outras aguardando por descrição (ANTBASE, 2005).

Entretanto, apesar dos benefícios atribuídos às formigas, algumas espécies também podem causar uma variedade de prejuízos ambientais, econômicos e de saúde pública (RABITSCH, 2011), atuar na diminuição da biodiversidade de invertebrados (HOFFMANN; ANDERSEN; HILL, 1999), na proteção de pragas em plantações (BUCKLEY, 1987) ou como vetores mecânicos de microrganismos em hospitais (COSTA et al., 2006). Entre estas, encontram-se as formigas da espécie *Wasmannia auropunctata* (Roger, 1863), também conhecida como pequena formiga-de-fogo ou pixixica (WETTERER; PORTER, 2003).

W. auropunctata é uma das dez espécies pertencentes ao gênero *Wasmannia* (1893, Forel) que foi agrupado recentemente à tribo Attini (WARD et al., 2014). A espécie é considerada a mais conhecida do gênero e apresenta sete subespécies (ITIS, 2004). Suas operárias são lentas, monomórficas e reconhecíveis pelo seu pequeno tamanho (~1,5mm), coloração marrom-dourada, pilosidade esparsa, 11 antenômeros, sendo os três últimos em formato de clava, escrobo antenal que se estende quase até a borda posterior da cabeça, um par de espinhos epinotais e o pecíolo sendo quase retangular e maior do que o pós-pecíolo, além de sua ardente ferroada (WETTERER; PORTER, 2003).

Os hábitos de nidificação e alimentação da espécie são generalistas. Elas não escavam ninhos, sendo encontradas em cavidades superficiais, embaixo de rochas, dentro de galhos, na base de árvores frondosas e palmeiras, na serapilheira ou mesmo em árvores, sem exibir contato algum com o solo; em ambientes secos e úmidos, abertos ou fechados, artificiais ou naturais. Quanto à alimentação, elas podem consumir material vegetal, néctar de plantas, excreta de Hemiptera e uma variedade de presas artrópodes (ULLOA-CHACÓN; CHERIX; MEIER, 1991; WETTERER; PORTER, 2003).

As colônias de *W. auropunctata* são predominantemente poligínicas, ou seja, há várias rainhas por ninho, sendo estas extremamente férteis (até 70 ovos por dia) enquanto as operárias são estéreis (ULLOA-CHACÓN; CHERIX; MEIER, 1991). Sua dispersão natural pode ocorrer por sociotomia, ou fragmentação, onde grupos de operárias acompanhadas por uma ou mais rainhas deixam o ninho original para estabelecer uma nova sociedade (WETTERER; PORTER, 2003) ou por voos nupciais (TORRES et al., 2001).

As operárias apresentam um alto nível de agressividade interespecífica e baixo nível de agressividade intraespecífica (ULLOA-CHACÓN; CHERIX; MEIER, 1991; WETTERER; PORTER, 2003) e além de sua ardente ferroadada, que pode ser letal contra outras formigas, elas apresentam, em sua glândula mandibular, um composto químico, a alquilparazina, que contribui para o ataque, atraindo e excitando operárias da mesma espécie, ou para defesa, impedindo que outras espécies de formigas se aproximem (HOWARD et al., 1982).

Tais características fazem da espécie uma excelente invasora. Nativa da região Neotropical, ela tem se dispersado mundialmente e trazido vários problemas às populações nativas. Formigas dessa espécie aparentam ser tão bem adaptadas ao processo de invasão, que diferenças comportamentais e morfológicas entre populações nativas e introduzidas têm sido relatadas (RABITSCH, 2011; FOUCAUD et al., 2010; WETTERER; PORTER, 2003).

As populações introduzidas revelam um menor grau de agressividade intraespecífica o que sugere que essas populações apresentam um maior nível de comportamento uniclonal (BRETON, et al., 2004). Essa hipótese é corroborada por hidrocarbonetos cuticulares (ERRARD et al., 2005) e análises genéticas (SOUZA et al., 2009). Operárias de populações introduzidas também são menores do que operárias de populações nativas, sugerindo que formigas introduzidas investem mais energia na produção de um número maior de indivíduos do que no aumento corporal dos mesmos, o que poderia ser uma vantagem competitiva (WETTERER; PORTER, 2003; MIKHEYEV; MUELLER, 2007).

Outra característica interessante que tem chamado atenção para esta formiga é quanto a sua reprodução. Na maioria das espécies de formigas o sexo é determinado por haplo-diploidia, onde os machos nascem de ovos não fecundados (haploides) e as fêmeas, de ovos fecundados (diploides), e a determinação de castas femininas se deve a caracteres fisiológicos e não genéticos (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Porém, algumas populações de *W. auropunctata* têm demonstrado um comportamento não usual em termos de reprodução, onde machos e rainhas reproduzem-se através de clonagem, as rainhas por partenogênese telítica, tipo ameiótica e os machos pela eliminação do genoma da rainha nos ovos diploides, enquanto as operárias são produzidas através da reprodução sexual (FOURNIER et al., 2005).

Armbrecht e Ulloa-Chacón (2003) sugeriram que a abundância de *W. auropunctata* poderia ser utilizada como um indicador de baixa diversidade de comunidades de formigas em fragmentos de florestas secas do Vale do Rio Cauca na Colômbia, pois ao analisarem 14 desses fragmentos florestais, constataram uma relação altamente negativa entre a porcentagem de amostras de *W. auropunctata* e a riqueza da comunidade de formigas.

Essa espécie também foi considerada uma importante praga em criadouros de mariposas na Colômbia, juntamente com *Linepithema* sp. e *Monomorium floricola* (Jerdon, 1851), particularmente em áreas onde os ovos completam o período de incubação e ocorre o desenvolvimento larval e a formação da crisálida. O mesmo fato se repete nos viveiros, acompanhada por *Paratrechina longicornis* (Latreille, 1802), onde são cultivadas as plantas para alimentação das larvas. Estas formigas podem causar não apenas danos diretos ao se alimentarem dos estados imaturos, mas também indiretamente ao associarem-se com hemípteros sugadores das plantas do viveiro ou ao aproveitarem-se dos alimentos oferecidos às mariposas adultas além de dificultarem o trabalho dos criadores devido à sua dolorosa ferroada (SANABRIA-BLANDÓN; ULLOA, 2009).

Tradicionalmente, o controle dessas formigas tem sido realizado através de componentes químicos polvilhados sobre o ninho e nos agrupamentos de formigas que, porém não apresentam resultados satisfatórios. Buscando uma técnica alternativa de controle, Delabie (1989) propôs a utilização de anéis de visgo à meia altura dos troncos dos cacauzeiros para impedir que cheguem aos frutos. Embora o método tenha se mostrado mais útil do que a utilização de inseticida em pó, observou-se que algumas formigas conseguem passar pela barreira estabelecendo pontes de detritos ou passando por baixo do suporte de poliestileno. Outra estratégia de erradicação dessa formiga com aparente sucesso tem sido a utilização de iscas sólidas, acompanhada de amplo monitoramento (CAUSTON; SEVILLA; PORTER, 2005).

Novas alternativas para controle de insetos têm utilizado as relações simbióticas, principalmente com o endossimbionte *Wolbachia* (BRELSFOARD; DOBSON, 2009). Descoberta em 1924 por Hertig e Wolbach, esta α -proteobactéria que é transmitida verticalmente (da mãe para a prole) e cuja distribuição aparenta atingir 40% dos artrópodes terrestres (ZUG; HAMMERSTEIN, 2012), além de nematoides, é capaz de induzir diferentes fenótipos em seus diferentes hospedeiros. Em artrópodes, os fenótipos mais conhecidos são incompatibilidade citoplasmática, feminilização de machos, indução de partenogênese telítica e morte prematura de machos (STOUTHAMER; BREEUWER; HURST, 1999).

A incompatibilidade citoplasmática tem sido descrita em aracnídeos, isópodes e insetos e é observada quando fêmeas não infectadas por *Wolbachia*, ao acasalarem com machos infectados, não produzem progênie, ou quando o mesmo ocorre com machos e fêmeas infectados por cepas diferentes (WERREN; BALDO; CLARCK, 2008).

De acordo com Bossan, Koehncke e Hammerstein (2011), dois modelos principais têm sido aceitos para elucidar a incompatibilidade citoplasmática, o *mistiming-model*, sugere que ocorra uma dessincronização de eventos celulares entre os pró-núcleos masculino e feminino, acarretando na não formação do embrião, e o *key-lock model*, sugere que o endossimbionte bloqueie a participação dos cromossomos masculinos durante a mitose, funcionando como uma fechadura que só poderia ser destravada por uma “chave” presente no citoplasma dos ovos infectados pela mesma cepa. Adicionalmente, os autores sugerem um terceiro modelo, o *goalkeeper model*, que acredita haver duas variáveis envolvidas, a primeira relacionada à dessincronização e a segunda aos prófagos do endossimbionte.

Indução de partenogênese telítica tem sido registrada para espécies que apresentam partenogênese arrenótoca (machos provêm de ovos haploides e fêmeas de ovos diploides). Nesses casos, fêmeas infectadas produzem ovos não fecundados que se desenvolvem em fêmeas, ao invés de se desenvolverem em machos, assim o endossimbionte tem sua taxa de transmissão aumentada, uma vez que é transmitido maternalmente (STOUTHAMER; BREEUWER; HURST, 1999). Tal fenômeno aparenta ocorrer através de diferentes formas da duplicação do gameta em ovos não fecundados, resultando na produção de progênie inteiramente homozigótica (PANNEBAKKER et al., 2004).

A feminilização de machos já foi registrada em isópodes e insetos e parece atuar através da proliferação do endossimbionte na glândula andrógena, causando hipertrofia ou inibindo sua função em isópodes. Em insetos, parece atuar durante todo o desenvolvimento para causar completa feminilização, uma vez que a remoção do endossimbionte durante o desenvolvimento resulta em intersexualidade. A morte prematura de machos, por sua vez, aparenta ser resultado de uma feminilização letal e que tem sido relatada para Coleoptera, Diptera, Lepidoptera e Pseudoescorpiões (WERREN; BALDO; CLARCK, 2008).

O uso de *Wolbachia* no controle de insetos vetores de doenças tem sido realizado baseando-se em duas estratégias principais que envolvem a incompatibilidade citoplasmática. A primeira estratégia, similar à técnica do inseto estéril, utiliza-se de repetidas liberações de machos incompatíveis para tornar estéreis as fêmeas de uma população determinada, podendo levar à supressão e à consequente eliminação da população alvo. A segunda, por sua vez, é baseada na substituição de populações, devido a sua alta taxa de transmissão, acredita-se que

ao se ligar um antipatógeno transgênico à *Wolbachia*, esse antipatógeno se estabeleceria rapidamente na população alvo juntamente com o endossimbionte. Outra possibilidade também baseada na substituição de populações seria a de infectar indivíduos com cepas de *Wolbachia* que diminuem o tempo de vida dos insetos não havendo tempo suficiente para a incubação dos patógenos (BRELSFOARD; DOBSON, 2009).

Embora muitos dos fenótipos induzidos pelo endossimbionte em artrópodes aparentem unicamente favorecê-lo, Zug e Hammerstein (2014) apresentam uma revisão de casos em que os hospedeiros podem vir a ser favorecidos, seja por aumento da fecundidade e da longevidade ou por complementação nutricional, e casos em que já se estabeleceu uma relação de dependência entre hospedeiro e endossimbionte. Alguns exemplos de dependência podem ser observados na vespa *Asobara tabida* (Nees, 1834) que é incapaz de produzir oócitos maduros após a remoção de *Wolbachia*, e na mariposa *Ostrinia scapularis* (Walker, 1859), cuja *Wolbachia* aparentava induzir a morte de machos, mas após a sua retirada observou-se que toda a prole era composta apenas por machos.

Em formigas, a primeira análise de ampla ocorrência de *Wolbachia* foi realizada em 1998, por Wenseleers e colaboradores que descobriram que das 50 espécies Indo-Australianas analisadas, 50% estavam infectadas. Desde então, estudos têm sido realizados na tentativa de descobrir quais seriam os fenótipos causados por *Wolbachia* nesses organismos (BORM, et al., 2001; BOUWMA; SHOEMAKER, 2011) ou se determinado fenótipo apresentado por uma ou mais espécies deve-se à presença do endossimbionte (WENSELEERS; BILLEN, 2000; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ et al., 2013; REY et al., 2013).

Borm e colaboradores (2001) ao estudarem sete espécies de formigas cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, indicaram, através de técnicas de PCR e de modelos teóricos, que o cenário mais provável para as espécies *Acromyrmex echinator* (Forel, 1899) e *A. octospinosus* (Reich, 1793) estudadas seria o de morte prematura de machos, enquanto a espécie *A. insinuator* (Schultz, Bekkevold e Boomsma, 1998) mostrava um cenário compatível com incompatibilidade citoplasmática. Bouwma e Shoemaker (2011), porém, ao estudarem populações nativas de *Solenopsis invicta* (Buren, 1972), não encontraram evidências de incompatibilidade citoplasmática, morte de machos ou efeitos significativos na capacidade reprodutiva.

Wenseleers e Billen (2000), ao analisarem espécies de himenópteros sociais que apresentavam partenogênese telítica, incluindo seis espécies de formigas, à procura de *Wolbachia*, não a encontraram, descartando a possibilidade de que o endossimbionte fosse o responsável pela partenogênese apresentada nessas espécies. Igualmente, Martínez-Rodríguez

e colaboradores (2013) chegaram à mesma conclusão ao analisar populações ibéricas das formigas coletoras de sementes *Messor barbarus* (Linnaeus, 1767) e *M. capitatus* (Latreille, 1798).

Um estudo similar foi realizado por Rey e colaboradores (2013) em *W. auropunctata*, analisando populações sexuais e clonais. Os autores verificaram que a *Wolbachia* era o único endossimbionte presente, porém não foram encontradas evidências de que fosse o responsável pela reprodução clonal, uma vez que tanto populações clonais como sexuais apresentaram cepas muito similares do endossimbionte.

A detecção e caracterização molecular de *Wolbachia* nos seus diferentes hospedeiros têm sido realizadas através da amplificação e sequenciamento de diferentes genes. Tradicionalmente foi detectada por iniciadores alvos dos genes *16S rRNA*, *wsp* e *ftsZ* (SIMÕES et al., 2011). Recentemente, Baldo e colaboradores (2006) criaram um sistema de caracterização *multilocus* (MLST – *Multilocus Sequence Typing*) onde são utilizados cinco genes conservados (*coxA*, *gatB*, *ftsZ*, *hcpA* e *fbpA*) para a caracterização das diferentes cepas de *Wolbachia*. Adicionalmente, um banco gênico específico para a submissão de alelos do endossimbionte foi criado buscando-se agrupar em um só lugar as informações relativas aos seus hospedeiros e os respectivos alelos apresentados. Todas as informações associadas a esse esquema de caracterização encontram-se disponíveis no website: <http://pubmlst.org/wolbachia/>.

Através da caracterização molecular do endossimbionte e da comparação de suas filogenias com a de seus hospedeiros observou-se que além de ser transmitida verticalmente, também há casos frequentes de transmissão horizontal entre hospedeiros (BALDO et al., 2008; SCHULER et al., 2013; WERREN; ZHANG; GUO, 1995). Em formigas, Frost e colaboradores (2014) observaram níveis significativos de *Wolbachia* na hemolinfa, no corpo gorduroso e no líquido fecal em operárias e gines de *A. echinator*, o que sugere que operárias também podem participar significativamente da transmissão horizontal de *Wolbachia* via parasitoides ou via fecal-oral.

Recentemente, diferentes estudos têm sido realizados no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) da UNESP de Rio Claro analisando a relação entre endossimbiontes e formigas da América do Sul. Martins, Souza e Bueno (2012) ao estudarem espécies do gênero *Solenopsis* do Brasil e da Argentina através do gene *wsp*, encontraram uma alta frequência de infecção por *Wolbachia* (51%), sendo a maior incidência em climas temperados. Cepas dos supergrupos A e B foram encontradas e houve evidências de transmissão horizontal através do parasito social *S. daguerrei* (Santschi, 1930).

Analisando as mesmas populações de *Solenopsis* com a abordagem *multilocus*, Martins (2014) registrou 15 novas cepas. Das cepas encontradas, nenhuma foi compartilhada com outros hospedeiros provenientes do Brasil e não houve correlação entre a distância geográfica e a distribuição das cepas analisadas. Embora indícios de coevolução entre o endossimbionte e o hospedeiro tenham sido encontrados, esta não aparenta ocorrer em padrão de cofilogenias.

Ramalho (2013) ao analisar formigas da espécie *Camponotus textor* (Forel, 1899) provenientes do território brasileiro, encontrou três endossimbiontes diferentes, sendo um deles *Wolbachia*. Todas as amostras analisadas estavam infectadas e apresentaram a mesma cepa pertencente ao supergrupo A, que veio a ser inédita. De acordo com a autora, o compartilhamento da mesma cepa entre populações de localidades diferentes sugere a infecção de um ancestral comum seguido pelo estabelecimento da cepa na espécie.

Atualmente, Bastos e Marchesin têm analisado espécies dos gêneros *Cephalotes* e *Ectatomma*, respectivamente, à procura de *Wolbachia* e Ramalho estendeu seu estudo para outras espécies do gênero *Camponotus* analisando a microbiota associada (informação pessoal). Tais estudos, juntamente com o presente, poderão fornecer uma melhor compreensão sobre o *status* do endossimbionte *Wolbachia* associado às formigas da América do Sul.

2 OBJETIVOS

Considerando que populações de formigas da espécie *Wasmannia auropunctata* possuem ampla distribuição na América do Sul e que a bactéria *Wolbachia* tem sido caracterizada como um dos endossimbiontes mais abrangentes em artrópodes, estando presente inclusive em *W. auropunctata*, o presente trabalho teve o objetivo de verificar a ocorrência de *Wolbachia* em amostras de *W. auropunctata* da América do Sul e analisar as relações existentes entre endossimbionte e hospedeiro através da caracterização molecular de ambos. Para tal, foram realizados os seguintes objetivos específicos:

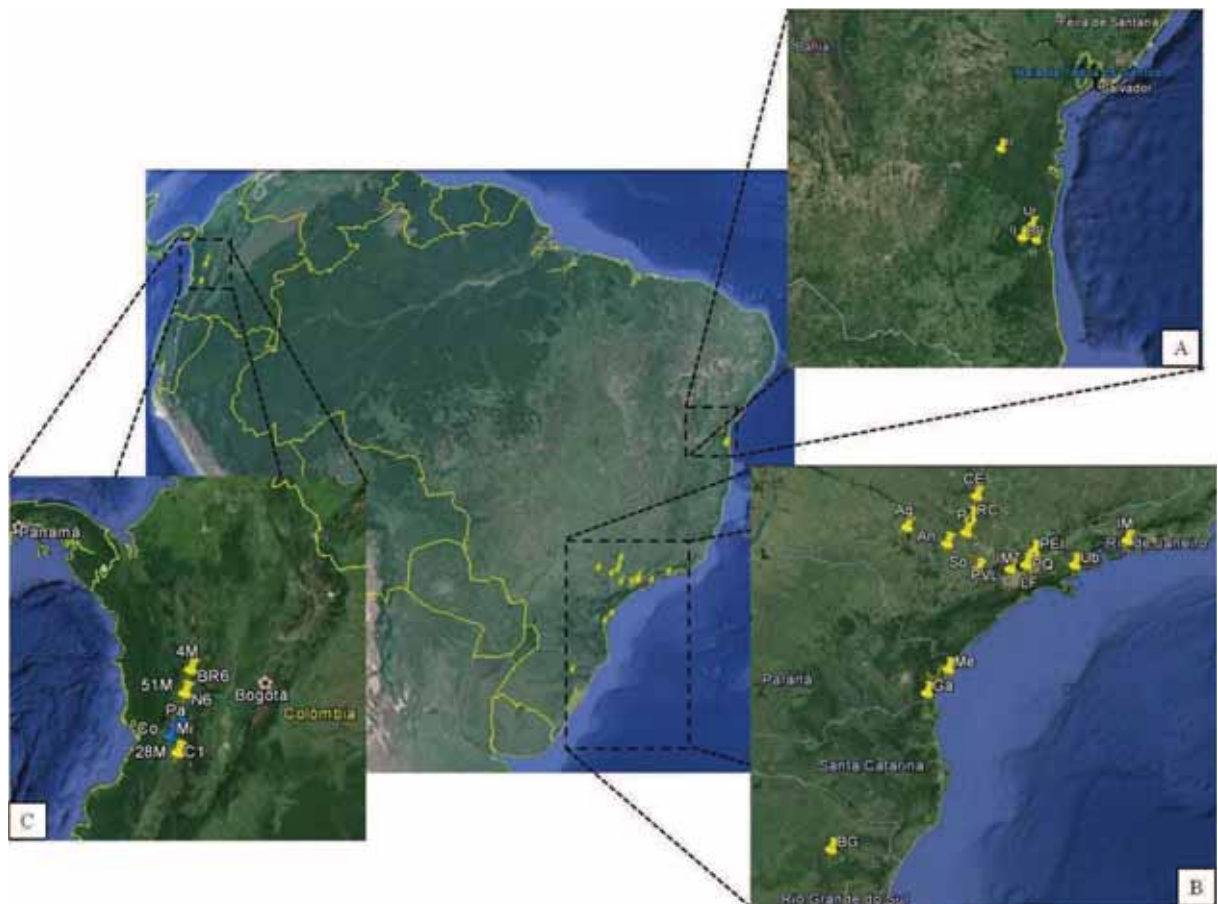
- Caracterizar molecularmente as operárias de *W. auropunctata* provenientes de 31 localidades do Brasil e da Colômbia através da amplificação e sequenciamento do gene nuclear *28S rDNA* e de um fragmento do DNA mitocondrial (*COI*, *IGS*, *tRNA* e *COII*)
- Analisar a similaridade genética entre as formigas provenientes de diferentes localidades.
- Verificar a ocorrência do endossimbionte *Wolbachia* nessas formigas e caracterizá-lo molecularmente, através da amplificação e sequenciamento do gene *wsp* e posteriormente do gene *coxA*.
- Comparar os diferentes alelos encontrados para o endossimbionte e relacioná-los com os haplótipos mitocondriais (mitótipos) de seus hospedeiros.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Áreas de coleta

Operárias de *Wasmannia auropunctata* provenientes de 31 localidades das regiões Sul, Sudeste e Nordeste do Brasil, assim como da Colômbia (Figuras 1 e 2), foram coletadas ou doadas.

Figura 1 - Mapa ilustrando a localidade de cada coleta de *Wasmannia auropunctata*.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor. Mapa modificado do Google Earth evidenciando a localidade dos pontos de coleta de *W. auropunctata*. Cada pino representa um ponto de coleta. A: sítios amostrais do Estado da Bahia, Brasil. B: Sítios amostrais das regiões Sul e Sudeste brasileiras. C: Sítios amostrais da Colômbia.

Figura 2 - Localidade dos sítios amostrais de coleta de *Wasmannia auropunctata*

	Amostra	Longitude (°)	Latitude (°)	Localidade	Coletor
Brasil	RC	-47.5429790	-22.3926460	Rio Claro/SP	SILVA, L. M. R
	CE	-47.3718160	-21.9311280	Pirassununga/SP	SILVA, L. M. R
	An	-48.1256130	-22.7850350	Anhembi/SP	SILVA, L. M. R
	Ag	-49.0208310	-22.4793500	Agudos/SP	SILVA, L. M. R
	So	-47.4543100	-23.5160620	Sorocaba/SP	SILVA, L. M. R
	Pi	-47.6683880	-22.7012730	Piracicaba/SP	SILVA, L. M. R
	Ub	-45.2323680	-23.5398910	Ubatuba/SP	SILVA, L. M. R
	LF	-46.2240860	-23.5304500	Mogi das Cruzes/SP	FERNANDES, T. T.*
	PEI	-46.1517270	-23.2048556	Igaratá/SP	FERNANDES, T. T.*
	IMT	-46.1973470	-23.5118160	Mogi das Cruzes/SP	FERNANDES, T. T.*
	PQ	-46.3497417	-23.4802500	Itaquaquecetuba/SP	FERNANDES, T. T.*
	PVL	-46.7180778	-23.5476000	São Paulo/SP	FERNANDES, T. T.*
	It	-39.2300500	-14.7590100	Itabuna/BA	SILVA, L. M. R
	Ij	-39.3537900	-14.7120400	Itajuípe/BA	SILVA, L. M. R
	Ur	-39.2786300	-14.6003000	Uruçuca/BA	SILVA, L. M. R
	BP	-39.3857000	-14.7350200	Barro Preto/BA	SILVA, L. M. R
	Ir	-39.6293643	-13.7768125	Itamari/BA	SOUZA, A. L. B.*
	IM	-43.9777600	-23.0604500	Mangaratiba/RJ	SILVA, L. M. R
	BG	-51.5177109	-29.1500391	Bento Gonçalves/RS	NONDILLO, A.*
	Ga	-48.8582190	-26.0347430	Garuva/SC	SILVA, L. M. R
	Me	-48.3143200	-25.5714880	Paranaguá/PR	SILVA, L. M. R
Colômbia	Co	-76.5315830	3.3736670	Cali	GARZÓN, E.*
	51M	-76.0840390	4.3378890	Cali	KELLER, L.*
	Br6	-75.8876550	4.8602610	Pereira	KELLER, L.*
	C1	-76.4016190	2.9852190	Caloto	KELLER, L.*
	Pa	-76.3169190	3.5303890	Palmira	ABADIA, J. C.*
	Mi	-76.5312100	3.3739000	Cali	ABADIA, J. C.*
	A2**			Cali	KELLER, L.*
	N6	-76.079061	4.33605	Cali	KELLER, L.*
	4M	-75.88898	4.860711	Pereira	KELLER, L.*
	28M	-76.39905	2.983319	Caloto	KELLER, L.*

Fonte: Elaborado pelo próprio autor. Legenda, coordenadas de GPS, localidades e coletores de cada amostra de *W. auropunctata*. *Cedidas gentilmente por. **Coordenadas geográficas não disponíveis.

3.2 Conservação, identificação dos espécimes e extração de DNA

Cada coleta conteve no mínimo dois indivíduos por colônia que foram conservados em álcool 80% e sobre refrigeração. A identificação morfológica foi realizada pelos coletores e confirmada de acordo com a chave dicotômica de Longino e Fernández (2007).

A extração de DNA foi total e por método não fenólico. Cada extração conteve apenas um indivíduo macerado em 250µL de solução de lise TNES (100mM Tris, 100mM NaCl, 50mM EDTA, 0,5% SDS, pH 9,1) e 1,5µL de proteinase K (20mg/mL) submetidos a banho seco por 3h a 55°C, seguidos à precipitação de proteínas com 100µL de NaCl 5M e à precipitação de DNA com dois banhos consecutivos em álcool (isopropanol 100% e etanol 70%, respectivamente). O DNA foi reidratado com 20µL de solução TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8).

3.3 Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) e sequenciamento

Para a caracterização molecular da *Wasmannia*, amplificou-se um fragmento do DNA mitocondrial, abrangendo os genes *citocromo oxidase I (COI)*, *espaçador intergênico (IGS)*, *RNA transportador (tRNA)* e *citocromo oxidase II (COII)*, e adicionalmente, um fragmento do gene nuclear *28S rDNA*. Para o DNA mitocondrial analisou-se dois indivíduos de cada colônia e para o gene nuclear, três indivíduos de cada colônia, quando disponível.

Cada PCR conteve 25µL de reação com: MgCl₂, 1,0mM; iniciador F, 0,1mM; iniciador R, 0,1mM; Gotaq®Colorless Master Mix (Promega), 1X; 2,5µL de DNA molde; e água Milli-Q.

Os iniciadores utilizados para a amplificação dos genes mitocondriais da formiga foram WaF e WaR (MIKHEYEV; MUELLER, 2007) e as condições do termociclador foram: 95°C por 5min de denaturação inicial; 35 ciclos de 95°C por 1min de denaturação, 54°C por 1,5min de anelamento, 72°C por 3min de extensão; 70°C por 6min de extensão final.

Os iniciadores utilizados para a amplificação do gene nuclear da formiga foram 28S-3365F (BELSHAW; QUICKE, 1997) e 28S-4745R (FRIEDRICH; TAUTZ, 1997) e as condições do termociclador foram: 94°C por 5min de denaturação inicial; 35 ciclos de 94°C por 1min de denaturação, 56°C por 1,5min de anelamento, 72°C por 3min de extensão; 70 °C por 5min de extensão final.

Para verificar a ocorrência do endossimbionte e para sua caracterização molecular, oito indivíduos de cada amostra foram analisados, quando disponíveis, pela amplificação de um fragmento do gene *wsp* (*Wolbachia Surface Protein*). Buscando-se evitar um falso negativo da amplificação do endossimbionte (quando a amplificação não ocorre devido às más condições dos reagentes da PCR ou do DNA e não devido à ausência do endossimbionte), foi utilizada uma amostra de *Camponotus textor* altamente infectada por *Wolbachia* como controle positivo e a qualidade da extração do DNA foi confirmada pela amplificação dos genes mitocondriais e nucleares.

Nos casos em que a amplificação do gene *wsp* foi negativa, procedeu-se ainda à tentativa de amplificação do gene *coxA* do endossimbionte, uma vez que, em testes preliminares, o último apresentou maior rendimento com relação aos outros genes utilizados para a análise de *Wolbachia* pelo esquema MLST (*Multilocus Sequence Typing*). Para o gene *coxA*, analisou-se dois indivíduos por amostra.

Os pares de iniciadores utilizados para a amplificação dos genes *wsp* e *coxA* foram, respectivamente, *wsp* 81F e *wsp* 691R (ZHOU et al., 1998), seguindo um protocolo modificado, e *coxA_F1* e *coxA_R1* (BALDO et al., 2006) seguindo o protocolo original.

Os resultados de todas as amplificações foram visualizados em gel de agarose 0,8%. Para toda reação que apresentou resultado negativo, ou seja, não foi possível a visualização em gel, procedeu-se à PCR *nested*, uma reação de polimerização em cadeia em que o DNA molde utilizado é o resultado da PCR anterior. Para tal, utilizou-se como DNA molde 1,0µL de uma diluição de 1:9 da PCR original.

A purificação da PCR foi realizada com GFX PCR e Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) e o sequenciamento foi realizado em um sequenciador Automatic Genetic Analyser 3130 (Applied Biosystems) com reagentes BigDye Terminator (Applied Biosystem Inc), pelo método de Sanger. Para o sequenciamento do DNA nuclear o iniciador 28S-3665F foi substituído pelo iniciador 28S-4023F (WARD; DOWNIE, 2005).

3.4 Análises moleculares

As sequências obtidas foram editadas manualmente no programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (HALL, 1999) e alinhadas pelo aplicativo *ClustalW Multiple alignment* (HIGGINS et al., 1992). Os sítios polimórficos e haplótipos foram analisados utilizando-se o *DNASP Software* (LIBRADO; ROZAS, 2009). Para a identificação do tRNA, utilizou-se

tRNAscan-SE 1.21 (SCHATTNER et al., 2005) e a comparação com dados já existentes foi feita pela ferramenta BLASTn – Basic Local Alignment Search Tool (ALTSCHUL et al., 1990) no Genbank (BENSON et al., 2013) e nos casos relativos ao endossimbionte, pela ferramenta de busca disponível no website <http://pubmlst.org/wolbachia/>. Redes de haplótipos foram construídas utilizando-se o programa Network 4.6, disponível no website fluxus-engineering.com, pelo método Median Joining (BANDELT; FORSTER; RÖHL, 1999).

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização molecular de amostras de *W. auropunctata*

4.1.1 DNA mitocondrial

Obteve-se um fragmento de 431 pares de bases do DNA mitocondrial abrangendo os genes *COI*, *IGS*, *tRNA* e *COII*.

Para o gene *COI*, obteve-se 82pb, sendo 11 deles polimórficos, dos quais nove mostraram-se parcimoniosos. O fragmento obtido relativo ao *COII* apresentou 266pb, sendo 29 deles polimórficos, dos quais 23 mostraram-se parcimoniosos. Adicionalmente, o gene *COII* apresentou uma região conservada de 54pb.

O *IGS* mostrou variação tanto na composição quanto no tamanho com 20 amostras apresentando um *IGS* de 10pb sem variação na composição e as 11 amostras restantes apresentando um *IGS* com 18pb com variação na composição dos últimos dez pares de bases. A Figura 3 ilustra um representante de cada variação encontrada para o *IGS* neste trabalho e duas variações adicionais encontradas no Genbank também para *W. auropunctata*.

Figura 3 - Variação do IGS de *Wasmannia auropunctata*.

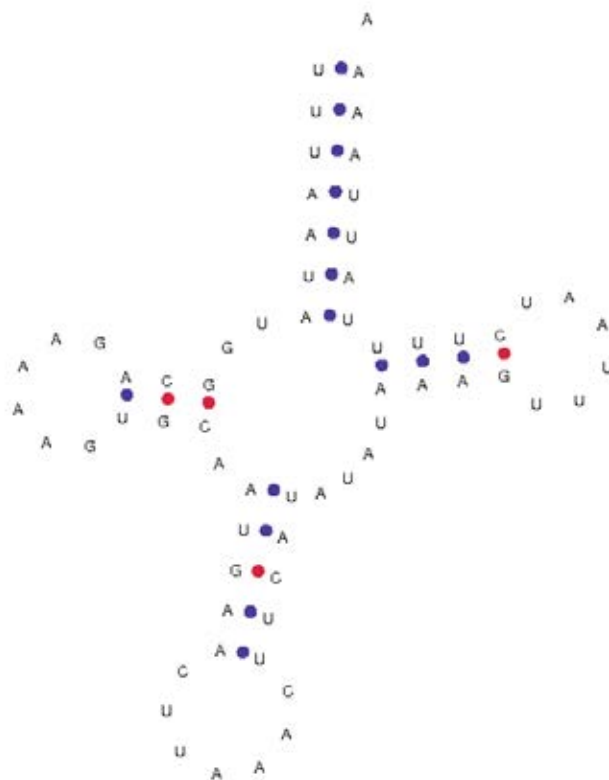
_____ATTTAATTAA	AF016026 – <i>W. auropunctata</i>
_____ATTTAATTAC	Anhembi
TAATTTAATTAAATTAA	Bento Gonçalves
TAATTTAATTCAATTAA	Piracicaba
TAATTTAACCTTAATTAA	Sorocaba
TAATTTAATTTAACCTAA	Uruçuca
TAATTTAACCTCAATTAA	EF409387 – <i>W. auropunctata</i>

Fonte: Elaborada pelo próprio autor. Cinco representantes do *IGS* obtidos neste trabalho e duas variações adicionais encontradas no Genbank com seus respectivos números de acesso.

O *tRNA* foi identificado como sendo de Leucina e apresentou 65pb e anticódon TAA (Figura 4), sendo compartilhado entre todas as amostras analisadas. Todas as amostras de *W. auropunctata* catalogadas no Genbank também apresentam o mesmo *tRNA*. Adicionalmente, comparando-se essa sequência de *tRNA* pela ferramenta BLASTn no Genbank, a análise

revelou várias amostras de *W. auropunctata* com máxima pontuação, apresentando 100% de cobertura e identidade, sendo que a segunda maior pontuação foi relativa à uma amostra de *Cataglyphis cursor* (Fonscolombe, 1846) apresentando 100% de cobertura, mas apenas 94% de identidade.

Figura 4 - Leu-tRNA de *Wasmannia auropunctata*.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor. Estrutura secundária proposta pelo programa tRNAscan-SE 1.21 para o *Leu-tRNA* de *W. auropunctata*. Todas as formigas dessa espécie analisadas para o gene apresentam o mesmo tRNA.

A análise de haplótipos resultou em 15 mitótipos (haplótipos mitocondriais), sendo 12 deles inéditos. A Figura 5 ilustra cada um dos mitótipos com suas respectivas frequências e amostras correspondentes.

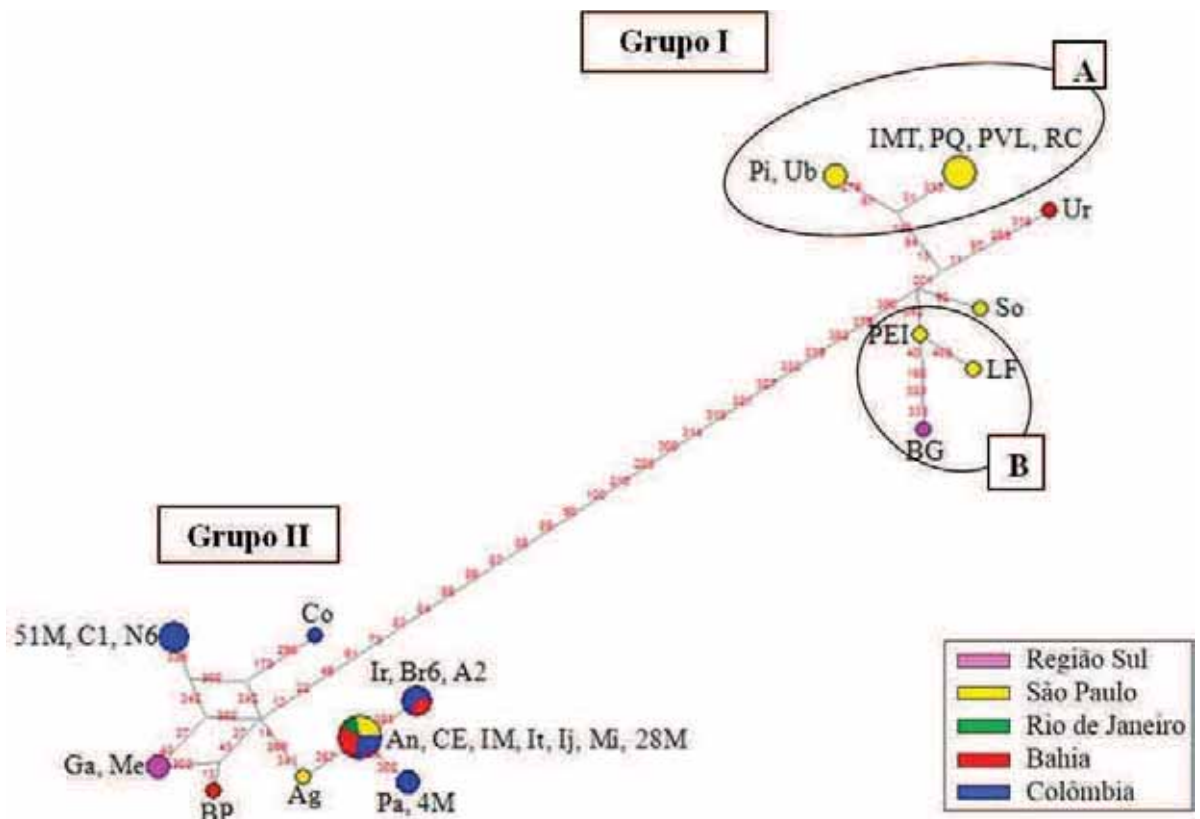
Figura 5 - Mitótipos de *Wasmannia auropunctata*.

Mitótipo	Frequência	Amostras
1	7	An e CE (SP), It e Ij (BA), IM (RJ), Mi e 28M (Colômbia)
2	4	IMT, PQ, PVLe RC (SP)
3	3	51M, C1 e N6 (Colômbia)
4*	3	Br6 e A2 (Colômbia), Ir (BA)
5*	2	Ga e Me (Sul do Brasil)
6*	2	Pi e Ub (SP)
7*	2	Pa e 4M (Colômbia)
8*	1	Ag (SP)
9*	1	BP (BA)
10*	1	BG (Sul do Brasil)
11*	1	LF (SP)
12*	1	PEI (SP)
13*	1	So (SP)
14*	1	Ur (BA)
15*	1	Co (Colômbia)

Fonte: Elaborada pelo próprio autor. Os mitótipos são apresentados em ordem decrescente de frequência e a procedência de cada amostra encontra-se entre parênteses. Os mitótipos inéditos apresentam um asterisco ao lado do número correspondente.

A rede de haplótipos (Figura 6) mostrou uma clara separação em dois grupos que coincidem com a variação de tamanho do *IGS*. Amostras que ficaram agrupadas no canto inferior esquerdo da figura (Grupo II) apresentam 10pb e as amostras que ficaram agrupadas no canto superior direito da figura (Grupo I) são aquelas que apresentam 18pb. Ainda dentro do Grupo I, pode-se observar essa mesma tendência de agrupamento de acordo com o *IGS*, já que as amostras pertencentes ao subgrupo A apresentam a mesma composição do *IGS*, assim como aquelas do subgrupo B. Redes de haplótipos sem o *IGS* e apenas com o *IGS* apresentaram a mesma estrutura geral.

Figura 6 - Rede de haplótipos mitocondriais (mitótipos) de *Wasmannia auropunctata*.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor. Rede de haplótipos das 31 amostras de *W. auropunctata* analisadas neste trabalho construída por meio do programa Network 4.6. Os círculos foram coloridos de acordo com a localização geográfica de cada amostra. O Grupo I e o Grupo II representam amostras que foram separadas de acordo com polimorfismo de tamanho do IGS. Dentro do Grupo I as amostras apresentaram polimorfismo de composição do IGS. As amostras pertencentes ao subgrupo A apresenta a mesma composição do IGS, assim como às pertencentes ao subgrupo B.

Para facilitar a comparação, os círculos que representam os mitótipos foram coloridos de acordo com a localização das amostras correspondentes. Observa-se que não há uma clara separação de acordo com a localização geográfica, com amostras de São Paulo, Bahia e do Sul do Brasil estando presente em ambos os grupos, porém, pode-se observar uma tendência com o grupo I sendo composto, em sua maioria, por amostras do Estado de São Paulo e o grupo II sendo mais diverso com amostras de todas as regiões analisadas. Adicionalmente, analisando-se o segundo grupo separadamente, observa-se que algumas amostras apresentaram similaridade geográfica, como é o caso de 51M, C1 e N6; Ir e Br6; Mi e 28M; Pa e 4M (todas da Colômbia) e entre Ga e Me do Sul do Brasil, An e CE de São Paulo e It e Ij da Bahia.

4.1.2 DNA nuclear

Obteve-se 524pb do gene *28S rDNA* e três haplótipos, sendo dois deles inéditos. Como até a presente data só havia uma sequência do gene *28S rDNA* de *W. auropunctata* catalogada no Genbank (EF013078.1), as comparações realizadas pelo BLASTn foram baseadas nessa sequência.

O haplótipo mais frequente (23 amostras) e inédito apresentou 100% de cobertura e 99% de identidade com a amostra do Genbank, diferindo em apenas três mutações, sendo duas delas deleções.

O segundo haplótipo mais frequente (3 amostras) e também inédito, apresentou 100% de cobertura e 99% de identidade, mas diferiu da amostra do Genbank em apenas duas mutações. Esse haplótipo foi compartilhado entre as amostras *Ga* (Sul do Brasil), *51M* e *CI* (Colômbia).

As amostras *51M* e *CI* também apresentaram o mesmo mitótipo que difere em apenas quatro mutações do mitótipo de *Ga*, o último mitótipo também sendo compartilhado pela amostra *Me* (Sul do Brasil).

O último haplótipo encontrado pertence à amostra *Br6* (Colômbia) e quando comparado com as sequências de *28S rDNA* do Genbank pela análise BLASTn, várias amostras apresentando 100% de cobertura e identidade com diferentes espécies de *Camponotus* retornaram. Entretanto, quando comparada com a amostra de *W. auropunctata* do Genbank evidenciou-se 17 mutações, sendo oito delas, deleções. O mitótipo apresentado pela amostra *Br6* também foi compartilhado pela amostra *Ir* (BA).

Embora a amplificação das quatro amostras restantes (*N6*, *4M*, *A2* e *28M*) tenha sido positiva, não se obteve sucesso no sequenciamento.

4.2 Caracterização molecular do endossimbionte *Wolbachia*

A qualidade de todas as sequências relativas ao endossimbionte foi verificada com o auxílio da ferramenta PHPH (TOGAWA; BRIGIDO, 2003) disponível no website <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>. As bases que apresentavam qualidade inferior foram verificadas em busca de picos múltiplos que poderiam indicar múltipla infecção (mais de uma cepa de *Wolbachia* presente em um único indivíduo). Apenas as amostras que apresentaram pelo menos um indivíduo com infecção simples, evidenciado por

eletroferogramas com picos únicos e bem definidos, foram utilizadas para a análise. Para comparação com sequências já existentes, a busca foi realizada tanto no Genbank quanto no banco gênico do MLST para *Wolbachia*.

4.2.1 Caracterização pelo gene *wsp*

A amplificação do gene *wsp* foi positiva apenas para amostras de cinco colônias, sendo elas *It*, *Ur* e *Ir* da Bahia, e *So* e *PEI* de São Paulo, porém obteve-se eletroferogramas confiáveis apenas para as três primeiras amostras. Todas as tentativas de sequenciar o gene *wsp* de indivíduos das amostras *So* e *PEI* resultaram em eletroferogramas com mistura no decorrer das sequências e, portanto foram excluídas das análises.

As amostras *It* e *Ir* apresentaram o mesmo alelo, o *wsp-679*, que embora tenha sido inédito para o banco do MLST, já havia sido encontrado em *W. auropunctata* por Rey e colaboradores (2013) e catalogado no Genbank (acesso: JX499068.1). Já a amostra *Ur* apresentou o *wsp-23*, que difere do *wsp-679* por apenas uma substituição. De acordo com o Genbank, o *wsp-23* já foi encontrado em pelo menos 20 gêneros diferentes, incluindo um gênero de formiga *Formicoxenus* e um gênero de forídeo parasitóide de formigas, o *Pseudacteon*. De acordo com o banco do MLST, esse alelo já foi encontrado nos gêneros *Nasonia*, *Rhagoletis*, *Leucophenga*, *Suillia* e *Anastrepha* no Japão, Áustria, USA, Panamá, Alemanha e Argentina.

4.2.2 Caracterização pelo gene *coxA*

A amplificação do gene *coxA* foi positiva para todas as amostras, porém, de acordo com o critério previamente estabelecido para verificação de infecção simples, apenas 23 foram utilizadas nas análises.

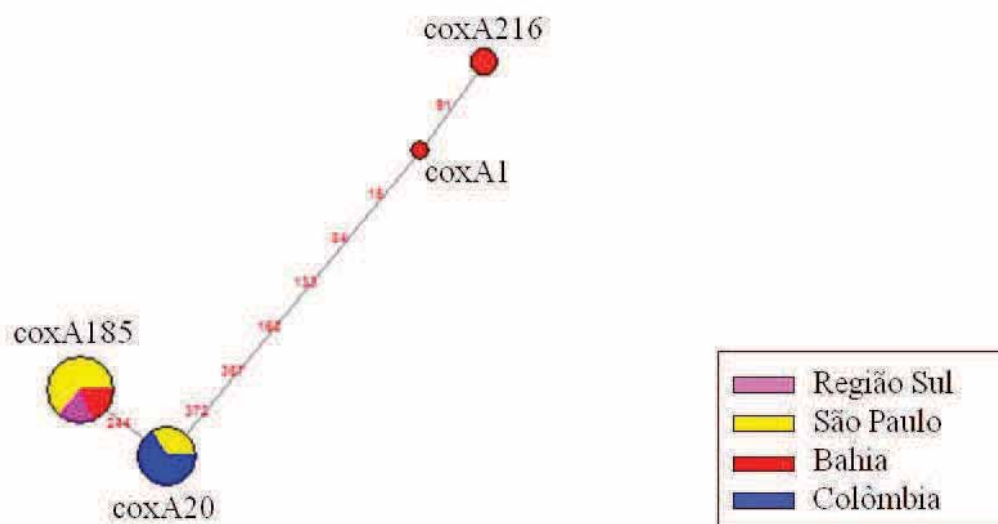
A análise haplótipa retornou quatro variantes (Figura 7), sendo uma delas, *coxA-216*, inédita de acordo com o banco do MLST, porém, também já determinado em *W. auropunctata* por Rey e colaboradores (2013) e catalogado no Genbank (acesso: JX499064.1). Observa-se que os alelos *coxA-185* e *coxA-20* foram os mais frequentes, abrangendo 11 e nove amostras, respectivamente; o *coxA-216* foi compartilhado entre as amostras de *It* e *Ir*, ambas da Bahia e o *coxA-1* foi apresentado pela amostra *Ur* também da Bahia.

Figura 7 - Haplótipos do gene *coxA*.

Haplótipo	Frequência	Amostras
<i>coxA-185</i>	11	CE, An, Ag, Pi, Ub, RC e PQ (SP); BP e Ij (BA); e Me e BG (Sul do Brasil)
<i>coxA-20</i>	9	So, PEI e LF (SP); e 51M, N6, C1, Pa, Co e Mi (Colômbia)
<i>coxA-216*</i>	2	It e Ir (BA)
<i>coxA-1</i>	1	Ur (BA)

Fonte: Elaborada pelo próprio autor. Alelos encontrados neste trabalho para o gene *coxA* do endossimbionte *Wolbachia*, suas frequências e respectivas amostras. O asterisco indica um alelo inédito de acordo com banco gênico do MLST.

Analisando-se a rede de haplótipos (Figura 8), observa-se que todos os alelos são próximos, apresentando poucas mutações entre si. Observa-se também que todas as amostras da Colômbia apresentaram o mesmo alelo, assim como as amostras do Sul do Brasil, enquanto as amostras da Bahia foram as mais diversas, apresentando três alelos diferentes. Adicionalmente, todas as amostras que apresentaram o *coxA-185* são provenientes do Brasil.

Figura 8 – Rede de haplótipos do gene *coxA*.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor. Rede de haplótipos resultante deste trabalho para o gene *coxA* do endossimbionte *Wolbachia*, desenvolvida por meio do programa Network 4.6. O tamanho dos círculos representando cada haplótipo é correspondente às suas frequências e foram coloridos de acordo com a localização geográfica da amostra.

Comparando-se os alelos obtidos neste trabalho com os já catalogados no banco gênico do MLST de *Wolbachia*, observa-se que o único registro do alelo *coxA-185* é de uma

amostra da formiga *Camponotus textor* proveniente do Brasil. O alelo *coxA-20*, por outro lado, já foi encontrado em gêneros de formiga, tais como *Solenopsis*, *Stenamma*, *Myrmica*, *Polyergus*, *Pheidole* e a própria *Wasmannia*, além de estar presente também em uma espécie de aranha e todas as amostras serem provenientes das Américas. Já o alelo *coxA-1* foi encontrado em espécies de *Drosophila*, *Nasonia*, *Rhagoletis*, *Leucophenga*, *Suillia* e *Anastrepha*, presente em quase todos os continentes mas sendo inédito para formigas.

5 DISCUSSÃO

5.1 Caracterização molecular de *W. auropunctata* e relação entre as colônias

As sequências obtidas do DNA mitocondrial foram relativamente curtas, 431 pb, porém permitiram a identificação de 15 mitótipos, sendo 12 deles inéditos. Essa diversidade de mitótipos, principalmente com a maioria deles sendo inéditos, indica que, embora amplamente distribuída na América do Sul, há poucas informações genéticas de *W. auropunctata* com relação aos genes analisados. Através da análise desse fragmento de DNA mitocondrial também foi possível identificar regiões moleculares que podem auxiliar na diferenciação inter e intraespecífica, tais como o *tRNA* e o *IGS*, respectivamente.

Apesar de Higgs e colaboradores (2003) relatarem que um único *tRNA* não seja suficiente para resolver filogenias ao nível de espécies, Chiotis e colaboradores (2000) estudando formigas da subfamília Dolichoderinae indicaram que há uma tendência de gêneros próximos apresentarem *tRNAs* similares. Adicionalmente, Martins e colaboradores (2012) e Ramalho e colaboradores (não publicado) apresentaram resultados que indicam que o *tRNA* entre o *IGS* e o *COII* pode ser conservado nas formigas das espécies *Linepithema micans* e *Camponotus textor*, entretanto, apresentando diferenças entre espécies do mesmo gênero.

Uma vez que o *tRNA* foi único para todas as amostras de *W. auropunctata* analisadas, assim como para as sequências contidas no Genbank, e que não existe nenhuma outra espécie que compartilha o mesmo *tRNA*, pode-se sugerir que o sequenciamento desse gene pode ser utilizado como uma ferramenta auxiliar na correta identificação dessa espécie.

A rede de haplótipos mitocondriais apresentou uma clara separação de acordo com a variação do *IGS*. No Grupo I foram alocadas as amostras com 18pb de *IGS* e no Grupo 2, as com 10 pb de *IGS*. Analisando-se o Grupo I separadamente, observou-se que os subgrupos A e B também apresentam a mesma tendência de agrupamento de acordo com a variação do *IGS*, uma vez que amostras que apresentaram a mesma composição do *IGS* ficaram agrupadas. Adicionalmente, essa divisão é corroborada com a rede de haplótipos apenas da região do *IGS*.

O polimorfismo de comprimento no *IGS* entre o COI e COII já foi documentado para vários Hymenoptera. Para formigas do gênero *Myrmecocystus* e da tribo Attini, tem sido sugerido que essa região possa ser utilizada para análises filogenéticas, uma vez que grupos basais aparentam apresentar um *IGS* menor do que aqueles encontrados em grupos derivados

(KRONAUER et al., 2004; WETTERER et al., 1998). Rodovalho e colaboradores (2014) sugeriram que o *IGS* pode ser utilizado para distinguir espécies crípticas da tribo Attini. Adicionalmente, Garnery e colaboradores (1993) e Franck e colaboradores (1998) utilizaram esse polimorfismo do *IGS* para diferenciar com sucesso diferentes linhagens da abelha *Apis mellifera*.

Como Mikheyev e Mueller (2007) ao estudarem populações nativas e introduzidas de *W. auropunctata*, encontraram o mesmo padrão de separação em dois grupos diferenciados por um indel no *IGS*, sugere-se que essa região possa ser útil para distinguir entre suas diferentes linhagens.

Adicionalmente, embora pouco discutido, existem sete variações reconhecidas como subespécies de *W. auropunctata* e apenas *W. a. laevifrons* e *W. a. pulla* não foram documentadas no Brasil e na Colômbia (WETTERER; PORTER, 2003). Seria interessante descobrir se esses grupos encontrados poderiam na verdade ser representantes de diferentes subespécies, porém, para isso, seria necessário um trabalho morfológico fundamentado, o que não se encaixava na proposta deste trabalho.

A análise do gene nuclear possibilitou a separação das amostras em três haplótipos, sendo dois deles inéditos, o que trará um aumento significativo de sequências catalogadas para o gene *28S rDNA* de *W. auropunctata* no Genbank, pois atualmente há uma única sequência relativa a esse gene para essa espécie.

Os dois haplótipos mais frequentes do DNA nuclear apresentaram uma alta similaridade com a amostra de *W. auropunctata* já catalogada no Genbank, porém, a amostra *Br6* (Colômbia) apresentou 17 mutações quando comparada à mesma sequência, sendo idêntica às várias sequências do gene *28S rDNA* de diferentes espécies de *Camponotus*. Devido à alta variação morfológica entre esses dois gêneros, e aos fatos de que o mitótipo dessa amostra também é compartilhado com a amostra *Ir* (BA) e de que as sequências do DNA mitocondrial e do DNA nuclear são provenientes do mesmo indivíduo, acredita-se que esta seja uma variação verdadeira.

Considerando que a amostragem desse gene nuclear para *W. auropunctata* ainda é escassa, não se pode afirmar que o haplótipo compartilhado com *Camponotus* seja característico também dessa espécie. Estudos adicionais são necessários para compreender essa questão e até então, sugere-se que esse marcador molecular não seja utilizado sozinho para a identificação da espécie.

A rede de haplótipos mitocondriais apresentou uma clara separação das amostras em dois grupos principais (Grupo I e Grupo II). O fato de o Grupo II apresentar um *IGS* menor

pode evidenciar que esse grupo represente uma linhagem mais antiga, como observado para outras espécies de Hymenoptera (WETTERER, J K et al., 1998; KRONAUER et al., 2004). Tal hipótese encontra apoio no fato de que esse grupo é composto por amostras de todas as áreas analisadas e é mais diverso do que o Grupo I. Adicionalmente, as amostras *An* e *CE* (SP), *IM* (RJ), *It* e *Ij* (BA), e *Mi* e *28M* (Colômbia) no Grupo II compartilham o mesmo mitótipo, sendo esse o mais frequente, o que sugere ser um mitótipo antigo.

A comparação entre os mitótipos e suas localidades geográficas traz indicativos sobre os meios de dispersão da espécie. A dispersão natural em *W. auropunctata* pode ser aleatória por meio de voo nupcial (TORRES et al., 2001) ou estabelecendo novas colônias por brotamento para dispersão próxima (WETTERER; PORTER, 2003). Adicionalmente, sabe-se que colônias da África realizam dispersão através de fluxos de água (WALKER, 2006) ou mesmo aproveitando-se da atividade de desmatamento (WALSH et al., 2004), além de sua bem conhecida característica de ser introduzida em novos habitats com sucesso (FABRES; BROWN, 1978; CAUSTON et al., 2005; REY et al., 2012). Sendo assim, mitótipos similares sendo compartilhado entre amostras geograficamente próximas podem indicar dispersão natural enquanto mitótipos similares sendo compartilhado por amostras geograficamente distantes sugerem dispersão por ação antrópica.

No presente estudo, dispersão natural pode ser inferida no Grupo II entre as amostras: *51M*, *Cl*, *N6* e *Co* (Colômbia); *Ga* e *Me* (Sul do Brasil); *An*, *CE* e *Ag* (SP); *It*, *Ij* e *Ir* (BA); e *Br6*, *A2*, *Mi*, *28M*, *Pa* e *4M* (Colômbia), assim como no Grupo I para as todas as amostras do Estado de São Paulo. As amostras *BG*, *Ur* e *BP* podem ter sido movidas por atividade humana, uma vez que são geograficamente distantes das amostras com as quais foram agrupadas.

5.2 Caracterização molecular do endossimbionte em colônias de *W. auropunctata*

Desde que foi descoberta em 1924, diversos estudos foram realizados investigando a presença de *Wolbachia* em uma ampla gama de possíveis hospedeiros com a expectativa de esse endossimbionte ser o responsável por determinadas características apresentadas por seus hospedeiros ou mesmo se poderia ser utilizado no controle populacional. Para tal, diferentes metodologias envolvendo a técnica de PCR são utilizadas para a detecção e caracterização de *Wolbachia*, porém após cerca de 90 anos depois de sua descoberta, ainda são necessárias melhorias para compreender a real extensão de sua distribuição (SIMÕES et al., 2011).

Embora amplamente utilizado para a detecção de *Wolbachia* (JACOB et al., 2014; MARTINS; SOUZA; BUENO, 2012; REY et al., 2013; SUH et al., 2015), o gene *wsp* tem-se mostrado, em alguns casos, ineficaz, assim como outros genes do MLST (AUGUSTINOS et al., 2011; BING et al., 2014), o que pode levar a um falso negativo.

Como apenas cinco amostras das 31 analisadas apresentaram amplificação positiva para o gene *wsp*, sendo apenas três delas sequenciadas com sucesso e como 18 das amostras que apresentaram *wsp* negativo foram sequenciadas com sucesso para o gene *coxA*, sendo caracterizadas como *Wolbachia*, sugere-se que o gene *wsp* não é o mais adequado para a detecção do endossimbionte em *W. auropunctata*, seja devido à baixa infecção ou a outros fatores desconhecidos.

A amplificação do gene *coxA* foi positiva para todas as amostras, porém só se pode afirmar a infecção por *Wolbachia* para aquelas que foram sequenciadas com sucesso e comparadas com sequências já catalogadas do endossimbionte em ambos os bancos gênicos. A amplificação e sequenciamento de um número consideravelmente maior para o gene *coxA* e o fato de que esse apresentou um maior rendimento quando comparado com os outros genes do MLST e o *wsp*, indicam que ele seja mais confiável para a detecção de *Wolbachia* em *W. auropunctata*.

Através da caracterização molecular da *Wolbachia* e da comparação com os mitótipos de *W. auropunctata* pode-se inferir o modo de transmissão do endossimbionte nessas formigas. O fato de a amostra *Ur* ter apresentado os alelos *wsp-23* e *coxA-1*, que foram encontrados em diferentes gêneros de artrópodes e apresentam ampla distribuição geográfica, sugere que essa cepa tenha sido adquirida através de transmissão horizontal. A presença do *wsp-23* em apenas um gênero de formiga e em forídeos parasitóides de formigas adicionam argumentos a essa teoria (VAVRE et al., 1999).

As amostras *It* e *Ir* (BA) apresentaram os mesmos alelos para os genes *wsp* e *coxA*, e ambos foram os mesmos apresentados pelo trabalho de Rey e colaboradores (2013) que analisaram colônias de *W. auropunctata* da mesma região do Estado da Bahia. Os alelos dessas amostras apresentaram uma única mutação quando comparados aos alelos da amostra *Ur* também da Bahia. Como há indicações de que a cepa presente na amostra *Ur* tenha sido adquirida horizontalmente, sugere-se que ela tenha se estabelecido na espécie e divergido para as cepas das amostras *It* e *Ir*. O fato de os mitótipos das amostras *It* e *Ir* pertencerem ao Grupo II e a amostra *Ur* ao Grupo I, sinaliza a ocorrência de transmissão horizontal da *Wolbachia* da amostra *Ur* para as amostras *It* e *Ir*, uma vez que seus mitótipos são geneticamente distantes, mas as amostras são relativamente próximas geograficamente.

O segundo alelo mais frequente (9 amostras) para o gene *coxA*, foi o *coxA-20* que ocorreu em todas as amostras da Colômbia e em algumas amostras de São Paulo do Grupo I e já havia sido catalogado para outros cinco gêneros de formigas provenientes das Américas e uma espécie de aranha. A presença do alelo *coxA-20* também foi prevalente nas cepas de *Wolbachia* analisadas em formigas de *Solenopsis* (MARTINS 2014) da América do Sul, o que sugere que esse alelo pertença a cepas que tenham ou estejam em processo de especialização em formigas.

O alelo *coxA-185* foi o mais frequente na presente análise e apresentou uma única variação quando comparado ao *coxA-20*. Ramalho (2013), que identificou esse alelo pela primeira vez, encontrou a mesma cepa contendo o alelo *coxA-185* para todas amostras analisadas e provenientes de três estados brasileiros. Como até o momento esse alelo só foi encontrado nas espécies de formigas *Wasmannia auropunctata* (este trabalho) e *Camponotus textor* (RAMALHO, 2013), provenientes do Brasil e apresenta uma única mutação quando comparado ao alelo *coxA-20*, sugere-se que esse alelo seja derivado do *coxA-20* e que também pertença a cepas especializadas em formigas.

A especialização de *Wolbachia* em formigas já foi documentada por Russel e colaboradores (2009) e é evidenciada por hospedeiros taxonomicamente próximos compartilhando cepas geneticamente similares. Isto pode ser justificado pelo fato de que hospedeiros próximos apresentam fisiologias similares, o que parece facilitar o estabelecimento de *Wolbachia* em novos hospedeiros através da transmissão horizontal (RIGAUD; PENNINGS; JUCHAULT, 2001).

Um possível cenário seria de que o alelo *coxA-20* teria se estabelecido originalmente em formigas da América do Sul sendo distribuído amplamente por transmissão horizontal entre as espécies e por transmissão vertical dentro de cada espécie. Posteriormente, esse alelo teria divergido para o alelo *coxA-185* em algumas espécies de formigas do Brasil e, novamente seria dispersado tanto por transmissão horizontal quanto vertical. A vasta ocorrência e distribuição de ambos os alelos e o fato de divergirem em apenas um nucleotídeo corroboram esse cenário.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de amplamente distribuída pela América do Sul, a formiga *Wasmannia auropunctata* tem sido pouco amostrada molecularmente no Brasil e na Colômbia com relação aos genes estudados neste trabalho. Tal escassez de informações moleculares ficou evidenciada pela descoberta de 12 novos mitótipos e dois haplótipos nucleares inéditos. Também foi possível identificar regiões que possam ser utilizadas para auxiliar na diferenciação inter e intraespecífica como o *tRNA* e *IGS*, respectivamente, além de evidências de que o fragmento do gene *28S rDNA* não deva ser utilizado sozinho para a identificação de formigas dessa espécie. A análise da relação entre os mitótipos e a comparação com a localização dos sítios de coleta sugere que as amostras que apresentaram *IGS* com 10 pares de bases representem uma linhagem mais antiga e de que dispersão natural e por ação antrópica podem ter ocorrido entre as amostras analisadas.

A detecção do endossimbionte *Wolbachia* através da amplificação dos genes *wsp* e *coxA* revelou que, quando comparados, o segundo apresenta uma porcentagem consideravelmente maior de sucesso e melhor rendimento nas amplificações, sendo mais indicado para esse objetivo. Através da caracterização molecular do endossimbionte e a comparação com os respectivos mitótipos e localidades geográficas ficou evidenciado que não apenas transmissão vertical, mas também transmissão horizontal é passível de estar ocorrendo, assim como dois dos alelos encontrados para o gene *coxA*, possam estar envolvidos na especialização em formigas.

Embora o presente trabalho tenha apresentado dados inéditos, estudos futuros são necessários para atingir a melhor compreensão da evolução dos sistemas envolvidos.

REFERÊNCIAS

AGOSTI, D.; JOHNSON, N. F. **Antbase** (05/2005) website. Disponível em: <<http://antbase.org/>>.

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990.

ARMBRECHT, I.; ULLOA-CHACÓN, P. The little fire ant *Wasmannia auropunctata* (Roger) (Hymenoptera: Formicidae) as a diversity indicator of ants in tropical dry forest fragments of Colombia. **Environmental Entomology**, v. 32, p. 542–547, 2003.

AUGUSTINOS, A. A. et al. Detection and characterization of *Wolbachia* infections in natural populations of aphids: is the hidden diversity fully unraveled? **PloS one**, v. 6, n. 12, p. 1-11, 2011. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3236762&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 18 jan. 2015.

BALDO, L. et al. 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**, v. 17, n. 2, p. 557–569, 2008.

BALDO, L. et al. Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 11, p. 7098–110, 2006. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1636189&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 15 jul. 2014.

BANDELT, H. J.; FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n. 1, p. 37–48, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10331250>>. Acesso em: 5 dez. 2013.

BELSHAW, R.; QUICKE, D. L. J. A molecular phylogeny of the Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 7, n. 3, p. 281–293, 1997.

BENSON, D. A. et al. GenBank. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D36–42, 2013. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3531190&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 10 jul. 2014.

BING, X.-L. et al. Diversity and evolution of the *Wolbachia* endosymbionts of *Bemisia* (Hemiptera: Aleyrodidae) whiteflies. **Ecology and Evolution**, v. 4, n. 13, p. 2714–37, 2014. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4113295&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 3 nov. 2014.

BORM, S. VAN. et al. *Wolbachia* in leafcutter ants: a widespread symbiont that may induce male killing or incompatible matings. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 14, n. 5, p. 805–

814, 2001. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1420-9101.2001.00321.x>>. Acesso em 16 jan. 2015.

BOSSAN, B.; KOEHNCKE, A.; HAMMERSTEIN, P. A new model and method for understanding *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility. **PloS one**, v. 6, n. 5, p. 1-9, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3091874&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 18 jan. 2015.

BOUWMA, A. M.; SHOEMAKER, D. *Wolbachia* wSinvietaA infections in natural populations of the fire ant *Solenopsis invicta* : testing for phenotypic effects. **Journal of Insect Science**, v. 11, n. 11, p. 1–19, 2011.

BRELSFOARD, C. L.; DOBSON, S. L. *Wolbachia*-based strategies to control insect pests and disease vectors. **Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 55–63, 2009.

BRETON, J. LE. et al. Experimental evidence of large-scale unicoloniality in the tramp ant *Wasmannia auropunctata* (Roger). **Journal of Insect Behavior**, v. 17, n. 2, p. 263–271, 2004. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1023/B:JOIR.0000028575.28700.71>>. Acesso em 26 out. 2012.

BUCKLEY, R. C. Interactions involving plants, Homoptera, and ants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 18, p. 111–135, 1987.

CAUSTON, C. E.; SEVILLA, C. R.; PORTER, S. D. Eradication of the little fire ant, *Wasmannia Auropunctata* (Hymenoptera: Formicidae), from Marchena Island, Galápagos: on the edge of euccess? **Florida Entomologist**, v. 88, n. 2, p. 159–168, 2005. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.1653/0015-4040%282005%29088%5B0159%3AEOTLFA%5D2.0.CO%3B2>>. Acesso em 28, out. 2012.

CHIOTIS, M.; JERMIIN, L. S.; CROZIER, R. H. A Molecular framework for the phylogeny of the ant subfamily Dolichoderinae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 17, n. 1, p. 108–116, 2000.

COSTA, S. B. et al. Formigas como vetores mecânicos de microorganismos no Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 6, p. 527–529, 2006.

DELABIE, J. H. C. Avaliação preliminar de técnica alternativa de controle da formiga “pixixica” *Wasmannia auropunctata* em cacauais. **Agrotropica**, v. 1, p. 75–78, 1989.

ERRARD, C. et al. Intercontinental chemical variation in the invasive ant *Wasmannia auropunctata* (Roger) (Hymenoptera Formicidae): a key to the invasive success of a tramp species. **Die Naturwissenschaften**, v. 92, n. 7, p. 319–323, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15973547>>. Acesso em: 15 jul. 2014.

FABRES, G.; BROWN, W. L. The recent introduction of the pest *Wasmannia auropunctata* into New Caledonia. **Australian Journal of Entomology**, v. 17, n. 2, p. 139–142, 1978.

Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1440-6055.1978.tb02220.x/abstract>>. Acesso em: 3 nov. 2014.

FOUCAUD, J. et al. Worldwide invasion by the little fire ant: Routes of introduction and evolutionary pathways. **Evolutionary Applications**, v. 3, p. 363–374, 2010.

FOURNIER, D. et al. Clonal reproduction by males and females in the little fire ant. **Nature**, v. 435, p. 1230–1234, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15988525>>. Acesso em: 10 set. 2014.

FRANCK, P. et al. The origin of west European subspecies of honeybees (*Apis mellifera*): new insights from microsatellite and mitochondrial data. **Evolution**, v. 52, n. 4, p. 1119–1134, 1998.

FRIEDRICH, M.; TAUTZ, D. An episodic change of rDNA nucleotide substitution rate has occurred during the emergence of the insect order Diptera. **Molecular Biology and Evolution**, v. 14, n. 6, p. 644–653, 1997.

FROST, C. L.; POLLOCK, S. W.; SMITH, J. E.; HUGHES, W. O. H. *Wolbachia* in the flesh: symbiont intensities in germ-line and somatic tissues challenge the conventional view of *Wolbachia* transmission routes. **PloS one**, v. 9, n. 7, p. e95122, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4079706&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 18 jan. 2015.

GARNERY, L. et al. A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L. **Experientia**, v. 49, n. 11, p. 1016–1021, 1993.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95–98, 1999. Disponível em: <<http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf>>. Acesso em 24 mai. 2013.

HIGGINS, D. G.; BLEASBY, A. J.; FUCHS, R. CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. **Computer Applications in the Biosciences : CABIOS**, v. 8, n. 2, p. 189–191, 1992.

HIGGS, P. G. et al. The evolution of tRNA-Leu genes in animal mitochondrial genomes. **Journal of Molecular Evolution**, v. 57, n. 4, p. 435–445, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14708576>>. Acesso em: 18 jan. 2015.

HOFFMANN, B. D.; ANDERSEN, A. N.; HILL, G. J. E. Impact of an introduced ant on native rain forest invertebrates: *Pheidole megacephala* in monsoonal Australia. **Oecologia**, v. 120, p. 595–604, 1999.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The ants**. Cambridge: Harvard University Press, 1990.

HOWARD, D. F. et al. Behavioral responses to an alkylpyrazine from the mandibular gland of the ant *Wasmannia auropunctata*. **Insectes Sociaux**, v. 29, n. 2, p. 369–374, 1982. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/BF02228764>>. Acesso em: 3 nov. 2014.

ITIS. Integrated Taxonomic Information System. Disponível em: <<http://www.itis.usda.gov/index.html>>.

JACOB, T. K. et al. Single strain infection of adult and larval cardamom thrips (*Sciothrips cardamomi*) by *Wolbachia* subgroup C on belonging to supergroup B in India. **Invertebrate Reproduction & Development**, v. 59, n. 1, p. 1–8, 2014. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07924259.2014.970237>>. Acesso em: 18 jan. 2015.

KOPTUR, S. Experimental evidence for defense of *Inga* (Mimosoideae) saplings by ants. **Ecology**, v. 65, n. 6, p. 1787–1793, 1984.

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 Evolution**, v. 32, n. 1, p. 416–421, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15186826>>. Acesso em: 5 nov. 2014.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p. 1451–1452, 2009.

LONGINO, J. T.; FERNÁNDEZ, F. Taxonomic review of the genus *Wasmannia*. In: R. R. Snelling; B. L. Fisher; P. S. Ward (Eds.); **Advances in ant systematics (Hymenoptera: Formicidae): homage to E. O. Wilson – 50 years of contributions**. n. 80, p.271–289, 2007.

MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, P. A.; SARASA, J. O.; PECO, B. E.; JAUREGUI, B. E. M.; RIVERA, D. E. Endosymbiont-free ants : molecular biological evidence that neither *Wolbachia*, *Cardinium* or any other bacterial endosymbionts play a role in thelytokous parthenogenesis in the harvester ant species, *Messor barbarus* and *M. capitatus* (Hymenoptera : Formicidae). **European Journal of Entomology**, v. 110, n. 2, p. 197–204, 2013.

MARTINS, C. **Determinação de cepas de *Wolbachia* em populações naturais de *Solenopsis* spp. (Hymenoptera: Formicidae) analisadas via Multilocus Sequence Typing (MLST): Diversidade genética, coevolução e recombinação**. 117 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Biologia Celular e Molecular) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2014.

MARTINS, C. et al. Occurrence of three haplotypes of *Linepithema micans* (Forel) (Hymenoptera: Formicidae) in Southern Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 41, n. 1, p. 57–61, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23950010>>. Acesso em: 15 jul. 2014.

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**, v. 109, n. 3, p. 287–96, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22266203>>. Acesso em: 15 jul. 2014.

MIKHEYEV, A. S.; MUELLER, U. G. Genetic relationships between native and introduced populations of the little fire ant *Wasmannia auropunctata*. **Diversity and Distributions**, v.

13, n. 5, p. 573–579, 2007. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1472-4642.2007.00370.x>>. Acesso em: 3 nov. 2014.

PANNEBAKKER, B. A. et al. Cytology of *Wolbachia*-induced parthenogenesis in *Leptopilina clavipes* (Hymenoptera: Figitidae). **Genome**, v. 47, n. 2, p. 299–303, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15060582>>. Acesso em: 18 jan. 2015.

PHILPOTT, S. M.; UNO, S.; MALDONADO, J. The importance of ants and high-shade management to coffee pollination and fruit weight in Chiapas, Mexico. **Biodiversity and Conservation**, v. 15, n. 1, p. 487–501, 2006. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10531-005-0602-1>>. Acesso em: 18 jan. 2015.

RABITSCH, W. The hitchhiker's guide to alien ant invasions. **BioControl**, v. 56, n. 4, p. 551–572, 2011.

RAMALHO, M. O. **Análises moleculares e da presença de endobactérias de *Camponotus textor* Forel, 1899 (Hymenoptera, Formicidae)**. 2013. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Biologia Celular e Molecular) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2013.

REY, O. et al. Distribution of endosymbiotic reproductive manipulators reflects invasion process and not reproductive system polymorphism in the little fire ant *Wasmannia auropunctata*. **PloS one**, v. 8, n. 3, p. e58467, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3594316&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 15 jul. 2014.

REY, O. et al. Where do adaptive shifts occur during invasion? A multidisciplinary approach to unravelling cold adaptation in a tropical ant species invading the Mediterranean area. **Ecology Letters**, v. 15, n. 11, p. 1266–1275, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22906215>>. Acesso em: 9 jun. 2014.

RIGAUD, T.; PENNINGS, P. S.; JUCHAULT, P. *Wolbachia* bacteria effects after experimental interspecific transfers in terrestrial isopods. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 77, n. 4, p. 251–257, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11437528>>. Acesso em: 18 jan. 2015.

RODOVALHO, C. D. M. et al. The mitochondrial genome of the leaf-cutter ant *Atta laevigata*: a mitogenome with a large number of intergenic spacers. **PloS one**, v. 9, n. 5, p. 1–9, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4020775&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 3 nov. 2014.

RUSSELL, J. A. et al. Specialization and geographic isolation among *Wolbachia* symbionts from ants and lycaenid butterflies. **Evolution**, v. 63, n. 3, p. 624–640, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19054050>>. Acesso em: 15 jun. 2014.

SANABRIA-BLANDÓN, M. C.; ULLOA, P. C. Hormigas como plagas potenciales en tres criaderos de mariposas del suroccidente de Colombia. **Acta Agronómica (Palmira)**, v. 58, p. 47–52, 2009.

SCHATTNER, P.; BROOKS, A. N.; LOWE, T. M. The tRNAscan-SE, snoscan and snoGPS web servers for the detection of tRNAs and snoRNAs. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. suppl 2, p. W686–W689, 2005.

SCHULER, H. et al. Evidence for a recent horizontal transmission and spatial spread of *Wolbachia* from endemic *Rhagoletis cerasi* (Diptera: Tephritidae) to invasive *Rhagoletis cingulata* in Europe. **Molecular Ecology**, v. 22, n. 15, p. 4101–11, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23844658>>. Acesso em: 19 jan. 2015.

SIMÕES, P. M. et al. *Wolbachia* detection: an assessment of standard PCR protocols. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, n. 3, p. 567–572, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21481216>>. Acesso em: 16 jan. 2015.

SOUZA, A. L. B. et al. Genetic variability of native populations of *Wasmannia* Forel (Hymenoptera: Formicidae) and their biogeographical implications. **Neotropical Entomology**, v. 38, n. 3, p. 376–383, 2009.

STOUTHAMER, R.; BREEUWER, J. A J.; HURST, G. D. D. *Wolbachia* pipientis: microbial manipulator of arthropod reproduction. **Annual Review of Microbiology**, p. 71–102, 1999. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.micro.53.1.71>>. Acesso em: 15 jul. 2014.

SUH, E. et al. Inter-population variation for *Wolbachia* induced reproductive incompatibility in the haplodiploid mite *Tetranychus urticae*. **Experimental & Applied Acarology**, v. 65, n. 1, p. 55–71, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25091123>>. Acesso em: 18 jan. 2015.

TOGAWA, R. C.; BRIGIDO, M. M. PHPH : Web based tool for simple electropherogram quality analysis. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOINFORMATICS AND COMPUTATIONAL BIOLOGY, 1. 2003, Ribeirão Preto, 2003. Disponível em: <<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>>.

TORRES, J. A.; SNELLING, R. R.; CANALS, M. Seasonal and nocturnal periodicities in ant nuptial flights in the tropics (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 37, n. 3 B, p. 601–626, 2001.

ULLOA-CHACÓN, P.; CHERIX, D.; MEIER, R. Bibliografía de la hormiga colorada *Wasmannia auropunctata* (Roger) (Hymenoptera: Formicidae). **Notícias de Galápagos**, , n. 50, p. 8–12, 1991.

VAVRE, F. et al. Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n. 12, p. 1711–23, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10605113>>. Acesso em: 19 fev. 2013.

WALKER, K. L. Impact of the Little Fire Ant, *Wasmannia auropunctata*, on Native Forest Ants in Gabon. **Biotropica**, v. 38, n. 5, p. 666–673, 2006. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1744-7429.2006.00198.x/full>>. Acesso em: 15 jul. 2014.

WALSH, P. D. et al. Logging speeds little red fire ant invasion of Africa. **Biotropica**, v. 36, n. 4, p. 637–641, 2004. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1744-7429.2004.tb00358.x/abstract>>. Acesso em: 3 nov. 2014.

WARD, P. S. Phylogeny, classification, and species-level taxonomy of ants. **Zootaxa**, v. 1668, p. 549–563, 2007.

WARD, P. S. et al. The evolution of myrmicine ants: phylogeny and biogeography of a hyperdiverse ant clade (Hymenoptera: Formicidae). **Systematic Entomology**, v. 40, n. 1, p. 61–81, 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/syen.12090>>. Acesso em: 25 jul. 2014.

WARD, P. S.; DOWNIE, D. A. The ant subfamily Pseudomyrmecinae (Hymenoptera: Formicidae): phylogeny and evolution of big-eyed arboreal ants. **Systematic Entomology**, v. 30, n. 2, p. 310–335, 2005. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3113.2004.00281.x>>. Acesso em: 12 jul. 2014.

WENSELEERS, T.; BILLEN, J. No evidence for *Wolbachia*-induced parthenogenesis in the social Hymenoptera. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 13, p. 277–280, 2000. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1420-9101.2000.00168.x/full>>. Acesso em: 15 jul. 2014.

WENSELEERS, T. et al. Widespread occurrence of the micro-organism *Wolbachia* in ants. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 265, n. 1404, p. 1447–1452, 1998.

WERREN, J. H.; BALDO, L.; CLARK, M. E. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. **Nature reviews. Microbiology**, v. 6, n. 10, p. 741–51, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18794912>>. Acesso em: 14 jul. 2014.

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: Biological Sciences**, v. 261, n. 1360, p. 55–63, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7644549>>. Acesso em: 29 out. 2012.

WETTERER, J. K.; PORTER, S. D. The little fire ant, *Wasmannia auropunctata*: distribution, impact, and control. **Sociobiology**, v. 42, n. 1, p. 1–41, 2003. Disponível em: <[http://www.usmarc.usda.gov/sp2UserFiles/Place/66151015/publications/Wetterer_and_Porter-2003\(M-3778\).pdf](http://www.usmarc.usda.gov/sp2UserFiles/Place/66151015/publications/Wetterer_and_Porter-2003(M-3778).pdf)>. Acesso em: 15 jul. 2014.

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**, v. 9, n. 1, p. 42–47, 1998.

ZHOU, W.; ROUSSET, F.; O'NEIL, S. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 265, n. 1395, p. 509–15, 1998. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1688917&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 15 jul. 2014.

ZUG, R.; HAMMERSTEIN, P. Still a host of hosts for *Wolbachia*: analysis of recent data suggests that 40% of terrestrial arthropod species are infected. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e38544, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3369835&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 11 out. 2014.

ZUG, R.; HAMMERSTEIN, P. Bad guys turned nice? A critical assessment of *Wolbachia* mutualisms in arthropod hosts. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 49, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24618033>>. Acesso em: 12 jan. 2015.