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

Caracterização de Populações genéticas de *Solenopsis invicta* através de Marcadores Moleculares microssatélites. Correlação de similaridade entre populações hospedeiras e endossimbionte *Wolbachia*.

RODRIGO FERNANDO DE SOUZA

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

Abril - 2011



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO



RODRIGO FERNANDO DE SOUZA

Caracterização de Populações genéticas de *Solenopsis invicta* através de Marcadores Moleculares microssatélites. Correlação de similaridade entre populações hospedeiras e endossimbionte *Wolbachia*.

Orientador: ODAIR CORREA BUENO

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

**Rio Claro
2011**

595.796 Souza, Rodrigo Fernando de
S729c Caracterização de populações genéticas de *Solenopsis invicta* através
de marcadores moleculares microssatélites. Correlação de similaridade
entre populações hospedeiras e endossimbionte *Wolbachia* / Rodrigo
Fernando de Souza. - Rio Claro : [s.n.], 2011
89 f. : il., figs., tabs., mapas

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Bióciências de Rio Claro
Orientador: Odair Correa Bueno

1. Formiga. 2. Biologia reprodutiva. 3. Genética. 4. Filogenia. I.
Título.

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

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela força nos momentos turbulentos.

Agradeço a minha Família, minha Mãe Eliane, meu Pai Vanderlei e ao meu irmãozinho Rafael pela força, companheirismo e compreensão nesta longa batalha de dois anos. Digo aqui que os momentos de saudades vividos foram decisivos para que eu pudesse crescer como ser Humano. Mais uma vez obrigado minha família.

Agradeço a minha noiva Eliane Batista pelo carinho para comigo nas horas que mais precisei e também pelos bons conselhos amigos em momentos turbulentos.

Agradeço ao Orientador Odair Correa Bueno pela paciência nas horas de minha inquietude, além dos valiosos ensinamentos para a carreira acadêmica e para a vida.

Agradeço ao Amigo Douglas Mascara pelos primeiros ensinamentos acadêmicos e ao incentivo dado para que eu pudesse seguir em frente nessa carreira.

Agradeço a Amiga Maria Santana que muito me ajudou a entender o complexo mundo das formigas.

Agradeço ao Professor Narciso Felix pelos bons conselhos nos momentos difíceis da minha vida.

Agradeço a Amiga e companheira de Laboratório Cintia Martins Perinotto que por quase dois anos aguentou minhas maluquices e modificações nos protocolos experimentais. E também pelos bons conselhos dados nos momentos de nervosismo.

Agradeço ao amigo Fernando Cocchi que me incentivou e ajudou em muitos momentos deste mestrado. Agradeço também pelas cervejadas em sua casa, pois elas foram importantes para o lazer nesta cidade de Rio Claro.

Agradeço a todos os integrantes do Centro de Estudos de Insetos Sociais – CEIS da Unesp de Rio Claro. Deixo aqui nesses agradecimentos todas as considerações e meus sinceros sentimentos de amizade. Digo também que todos os momentos de alegria, trabalho e companheirismos foram reconfortantes nos momentos solitários que passei em Rio Claro.

Agradeço aos amigos da “Família Terrassus” pelos bons momentos de conversa e diversão que me proporcionaram nestes tempos de mestrados e em todos os outros. Agradeço especialmente ao Casal Silvia e Roberto pela força moral e pelos ensinamentos que me deram para seguir em frente.

Agradeço aos amigos do “RPG” pelos momentos de diversão e lazer jogando o melhor jogo do mundo.

Agradeço a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para que esse sonho fosse alcançado. Obrigado a todos.

O cientista virou um mito. E todo mito é perigoso, porque ele induz o comportamento e inibe o pensamento

Rubem Alves – Filosofia da Ciência

Resumo:

As formigas da espécie *Solenopsis invicta* são nativas da América do Sul, mas elas foram introduzidas em novos ambientes e passaram a causar sérios danos à agricultura e pecuária bem como causar alguns transtornos ao ser humano. Muitos estudos sobre a biologia reprodutiva de *S. invicta* foram conduzidos com populações introduzidas; porém, poucos com as populações nativas. As ferramentas moleculares como microssatélites e *mtDNA* podem auxiliar na investigação sobre a biologia reprodutiva das espécies. Diferentes comportamentos sociais de *S. invicta* como a monoginia e a poliginia, podem interferir na biologia reprodutiva da espécie, e a utilização das ferramentas moleculares corretas pode evidenciar este comportamento. A expansão das populações nativas, assim como a introdução dessa formiga em outros ambientes, pode ter levado à interação com outros táxons de formigas e com outros tipos de organismos. Essa interação pode ter sido responsável pela aquisição da endobactéria *Wolbachia*. Ela é uma bactéria intracelular que pode causar distúrbios reprodutivos em seus hospedeiros. Este trabalho analisou 10 ninhos de *S. invicta* coletados em cinco cidades do Estado de São Paulo com o objetivo de inferir sobre a biologia reprodutiva de *S. invicta*, utilizando marcadores moleculares microssatélites e *mtDNA* e também verificar a presença de *Wolbachia*. A formação de quatro grupos filogeneticamente distintos para *mtDNA* sugerem linhagens divergentes de haplótipos dentro dos dez ninhos. Essa separação também pode indicar interferências na dispersão natural das fêmeas. A análise dos microssatélites revelou que alguns problemas moleculares podem interferir na investigação sobre a biologia reprodutiva. A análise específica de poliginia indica que todos os ninhos analisados são monogínicos, mas os resultados de microssatélites sugerem que ninhos de *S. invicta* possuem mais de uma rainha reprodutiva. A análise da presença da *Wolbachia* revelou duas cepas, a A do subgrupo *InvA* de *Solenopsis invicta* e a cepa B característica de *Acromyrmex insinuator*. Possivelmente, esta transmissão horizontal pode ter ocorrido devido à sobreposição de ocorrência desses grupos, levando a uma grande interação entre eles, que pode ser decorrente da relação hospedeiro-parasitóide, uma vez que *Acromyrmex insinuator* é uma espécie parasitóide. A análise do WSP Typing corrobora as análises de similaridade e revelaram que as regiões hipervariáveis dos subgrupos *InvA* e *InvB* e o grupo *B* são muitas vezes compartilhadas entre *Wolbachia* existentes em formigas. Nenhuma evidência de distúrbio reprodutivo causados por *Wolbachia* foi encontrado.

Abstract

The ants of *Solenopsis invicta* are native of South America, but they were introduced into new environments and began to cause serious damage to agriculture and livestock and cause some inconvenience to humans. Many studies on the reproductive biology of *S. invicta* were conducted with introduced populations, but few with the native populations. The molecular tools such as analysis of *mtDNA* and microsatellites can assist in research on the reproductive biology of the species. Different social behavior of *S. invicta* as monogyny and polygyny, can interfere in the reproductive biology of the species, and the use of the correct molecular tools may show this behavior. The expansion of the native populations, as well as the introduction of this ant in other environments may have led to the interaction with other taxa of ants and other types of organism. This interaction may have been responsible for the acquisition of endobacteria *Wolbachia*. This bacteria is intracellular and can cause reproductive disorders in their hosts. This study analyzed 10 nests of *S. invicta* collected in five cities of São Paulo aiming to infer the reproductive biology of *S. invicta*, using microsatellite markers and *mtDNA* and also verify the presence of *Wolbachia*. The formation of four groups phylogenetically distinct *mtDNA* suggests divergent lineages of haplotypes inside the ten nests. This separation can also indicate interference with the natural dispersal of females. Analysis of microsatellite revealed that some molecular problems may interfere in the research on the reproductive biology. The specific analysis of polygyny indicates that all nests that were analyzed are monogynous, but results of microsatellite suggest that nests of *S. invicta* have more than one reproductive queen. The *Wolbachia* presence analysis revealed two strains, the A from subgroup *InvA* of the *S. invicta* and the B strain characteristic of *Acromyrmex insinuator*. Possibly, this horizontal transmission may have occurred due to the overlapping occurrence of these groups, leading to a strong interaction between them, which may be due to host-parasitoid relationship, since *Acromyrmex insinuator* is a species parasitoid. Analysis of WSP Typing confirms the similarity analysis and revealed that the hypervariable regions of the subgroups *InvA* and *InvB* and group B are often shared among existing *Wolbachia* in ants. No evidence of reproductive disorders caused by *Wolbachia* was found.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO 1.0	10
- Marcadores Moleculares 1.1.....	10
- Biologia de <i>Solenopsis invicta</i> e análises moleculares 1.2.....	12
- Biologia de <i>Wolbachia</i> e infecção em <i>Solenopsis invicta</i> 1.3.....	15
OBJETIVOS 2.0.....	21
MATERIAL e MÉTODOS 3.0	22
-Coleta, identificação e preservação dos exemplares de <i>Solenopsis invicta</i>	
3.1.....	22
-Extração de DNA total 3.2.....	28
-Reação de Polimerização em cadeia (PCR) 3.3.....	29
-DNA mitocondrial 3.3.1.....	29
-Purificação e reação de seqüenciamento do <i>mtDNA</i> 3.3.2.....	29
-Precipitação 3.3.3.....	30
-Análise das sequências obtidas 3.4.....	30
- Análise filogenética das sequências de <i>mtDNA</i> 3.4.1.....	30
- Microssatélites 3.5.....	31
-Verificação dos alelos e inferência de biologia reprodutiva.....	31
-Análise de poliginia 3.6.....	32
-Análise de relacionamento genético intra-colonial 3.7.....	32
-Verificação da infecção pelo endossimbionte <i>Wolbachia</i> 3.8.....	33
-Análise de similaridade das sequências de <i>wsp</i> 3.9.....	33
-Análise de WSP <i>Typing</i> 3.10.....	34
RESULTADOS E DISCUSSÃO 4.0.....	35
-Extração DNA 4.1.....	35
-Amplificação do <i>mtDNA</i> 4.2.....	36
-Seqüenciamento do <i>mtDNA</i> , análise e identificação 4.3.....	37
-Análise filogenética do <i>mtDNA</i> 4.4.....	39
-Análise de poliginia 4.5.....	41
-Análise de microssatélite e inferência de macho 4.6.....	42
-Relacionamento genético (r) intra-colonial 4.7.....	47
-Verificação da Infecção pelo endossimbionte <i>Wolbachia</i> 4.8.....	50
-Análise de Similaridade do gene <i>wsp</i> de <i>Wolbachia</i> 4.9.....	51
-Análise do WSP <i>Typing</i> 4.10.....	56

CONCLUSÕES 5.0	63
-Identificação através do DNA Barcode 5.1.....	63
-Análise filogenética das sequências de <i>mtDNA</i> 5.2.....	63
-Análise de Poliginia 5.3.....	63
- Análises de Microssatélites e inferências de machos 5.4.....	63
- Análise de relacionamento genético intra-colonial 5.5.....	64
- Infecção por <i>Wolbachia</i> 5.6.....	64
- Similaridade das sequências de <i>wsp</i> de <i>Wolbachia</i> 5.7.....	64
- Análise de WSP <i>TYPING</i> 5.8.....	64
- Microssatélites e <i>Wolbachia</i> 5.9.....	65
REFERÊNCIAS.....	66
APÊNDICE I	74
APÊNDICE II	86
APÊNDICE III.....	88

1.0 Introdução:

1.1 - Marcadores Moleculares:

Marcadores moleculares são caracteres hereditários com múltiplos estados para cada caráter. Em organismos diplóides os marcadores podem ter um ou dois estados variáveis para cada locus. A utilização de marcadores pode proporcionar o entendimento sobre a transmissão de caracteres, elucidar problemas sobre as diferenças encontradas entre os organismos, bem como analisar padrões de variação e divergências entre populações. O desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e o sequenciamento de DNA possibilitou e ainda possibilita o acesso a muitas informações que os estudos morfológicos e fisiológicos em alguns casos não conseguem, além disso, permitem discussões acerca do comportamento dos organismos, parentesco e filogenia. Associado a essas inovações da biologia molecular, a grande utilização e desenvolvimento de programas de bioinformática contribuiu para a resolução de problemas em diversos níveis biológicos (SUNNUCKS, 2000; AVISE, 2004).

Uma classe de marcador molecular muito utilizado são os microssatélites, que consistem em repetições de sequências de DNA (mono, di, tri, tetra, penta ou hexanucleotídeos) dispostos em tandem no genoma dos organismos. Essas repetições são encontradas em genomas procarióticos e eucarióticos e seu número é devido a pequenas falhas que ocorrem durante a replicação do DNA (SLATKIN, 1995; ZANE et al., 2002; AVISE, 2004).

O modelo de “primers universais” não é eficaz. Para a realização da técnica é necessário um par de primers para as regiões que flanqueiam as repetições em tandem. Esse é um dos maiores inconvenientes, uma vez que para cada espécie é necessário identificar novos primers. Contudo, suas vantagens são maiores devido à grande utilidade no entendimento da estrutura genética de populações naturais e introduzidas, mapeamento genômico de diversos organismos, estudos em DNA forense e pesquisas conservacionistas (ZANE et al., 2002).

Esses marcadores moleculares podem revelar a influência contemporânea de forças evolutivas, como deriva genética e migração (ROSS et al., 1997). Mudanças no tamanho das populações e pequenas barreiras que impedem o fluxo gênico são

características históricas importantes que podem ser obtidas pela análise da estrutura genética da população (MEYER et al., 1996; ROSS et al., 1997; AVISE, 2004)

Os microssatélites permitem traçar o perfil genético de populações invasoras que transmitem doenças (HUBER et al., 2002). A rápida expansão e a resistência aos métodos de eliminação dessas espécies invasoras podem causar sérios problemas de saúde pública e prejuízos financeiros (COSTA-RIBEIRO et al., 2006). Além disso, os microssatélites em conjunto com outros marcadores moleculares podem contribuir para estudos de delimitação de espécies. Podem também contribuir para a verificação de hibridização entre espécies simpátricas, análise de possíveis barreiras de fluxo gênico e também de diferenciação regional entre populações (ROSS; SHOEMAKER, 2005; ROSS et al., 2010).

Outro marcador molecular extensamente utilizado é o DNA mitocondrial (*mtDNA*), importante para inferências evolutivas, além de contribuir para estudos nas áreas de ecologia e filogeografia. O genoma circular da mitocôndria possui aproximadamente 16 KB e contém trinta e sete genes, sendo vinte e dois transportadores de RNA (tRNA), treze genes codificadores de proteínas e dois genes ribossomais (BALLARD; WHITLOCK, 2004).

Na maioria das espécies a transmissão da mitocôndria é estritamente maternal e a molécula não sofre recombinações, entretanto em algumas poucas espécies a transmissão pode ser biparental e também podem ocorrer recombinações (AVISE, 2004; BALLARD; WHITLOCK, 2004).

A taxa de mutação do *mtDNA* é dez vezes mais rápida que a do DNA nuclear (nDNA), e o mecanismo de reparação desta molécula é muito mais limitado que o nDNA. Conseqüentemente o *mtDNA* acumula mais polimorfismo que o nDNA, e por isso é grandemente utilizado nos estudos de sistemática, genética de populações, filogeografia e filogenia (BALLARD; WHITLOCK, 2004; LEEUWEN et al., 2008).

Em insetos, com algumas raras exceções, a mitocôndria é transmitida maternalmente, e isso pode ajudar na identificação de linhagens matrilineas e também na análise de dispersão das fêmeas. A análise sobre o *mtDNA* pode ser realizada através do sequenciamento de regiões de interesse ou também através da utilização de enzimas de restrição (PAMILO et al., 1997)

A despeito da sua capacidade de análise sobre problemas filogenéticos e de genética de populações, o *mtDNA* vem ganhando destaque nos últimos anos devido à proposta de identificação das espécies através do “DNA Barcode”. O estudo de Hebert et al., (2003) propõe que a região correspondente ao Citocromo Oxidase I (COI) do *mtDNA* serve como ferramenta para identificação das espécies. Além disso, os pesquisadores sugerem que esta ferramenta pode facilitar a identificação das espécies em comparação com a morfologia, além da resolução taxonômica de diversos grupos. Algumas características desta região dão suporte a proposta destes autores, como: escassez de indels, bom sinal filogenético, regiões conservadas que servem para elaboração de primers universais e alta incidência de substituições na terceira base dos códons.

A proposta do Barcode possui uma página eletrônica – www.barcodinglife.org – que funciona como um banco de dados para depósitos de sequências de DNA e busca de organismos já catalogados. (RATNASINGHAM; HEBERT, 2007).

A proposta de identificar e catalogar espécies através do COI também se estende para formigas, e na sua página eletrônica - www.formicidaebol.org -, é possível depositar e buscar sequências de DNA de diversas espécies.

1.2 - Biologia de *Solenopsis invicta* e análises moleculares:

Nativa da região sub-Amazônica na América do Sul, as formigas lava-pés, *S. invicta* (BUREN, 1972), quando introduzidas em outras regiões do mundo passaram a causar sérios danos à agricultura, pecuária, plantas e animais nativos ou domésticos bem como a saúde humana (MORRISON et al., 2004). Estima-se que a introdução dessa espécie nos Estados Unidos ocorreu entre os anos de 1930 e 1940 e os gastos com esta infestação chegam a quase um bilhão de dólares anualmente (WOJCIK et al., 2001). A infestação por *S. invicta* foi relatada em diversos países, como: Porto Rico, Nova Zelândia e Austrália (MORRISON et al., 2004)

A nidificação dessa formiga acontece em áreas abertas e ensolaradas para que haja a termoregulação da colônia. A temperatura ideal para o crescimento da colônia está entre 30°C a 32°C. Entretanto, o sucesso da nidificação depende de fatores como a composição do solo, clima, disposição de alimento, patógenos presentes nos ninhos, predadores e competição inter e intraespecífica. Abaixo da

porção de terra visível do ninho (montículos) ele se irradia para vários túneis de forrageio, onde aproximadamente 90% é subterrâneo e cerca de 10 % encontra-se acima do solo (LOFGREN; BANKS; GLANCEY, 1975; PORTER; TSCHINKEL, 1987; PORTER; TSCHINKEL, 1993; MORRISON et al., 2004).

De acordo com Tschinkel (2006), os machos possuem uma glândula acessória em seu aparelho reprodutor que produz ácidos graxos, que são introduzidos no aparelho reprodutor da fêmea após o acasalamento, e sua oxidação forma uma espécie de tampão, impedindo a fêmea de cruzar novamente com outro macho. Após o acasalamento e a subsequente obstrução do trato genital da fêmea o macho morre. Sendo assim, macho e fêmea de *S. invicta* acasalam uma vez cada.

Existem duas formas conhecidas de organização social de *S. invicta*: a forma monogínica e a forma poligínica. A forma social monogínica ocorre quando uma colônia apresenta uma única rainha, enquanto que na forma poligínica a colônia possui várias rainhas. A organização social é associada com o genótipo de um gene específico *GP-9*, que quando encontrado em homozigose dominante, *GP-9^{BB}*, a forma social monogínica prevalece. Quando o genótipo é encontrado em heterozigose, *GP-9^{Bb}*, a forma social poligínica é a prevalente (ROSS, KRIEGER; SHOEMAKER, 2003; KRIEGER; ROSS 2005). As operárias de ninhos monogínicos efetivamente excluem operárias e rainhas de outras colônias e nos ninhos poligínicos isto é inversamente observado. A característica de perda da discriminação de operárias e rainhas estrangeiras permite que os ninhos poligínicos abriguem múltiplas rainhas (ROSS, KRIEGER; SHOEMAKER, 2003; HENSHAW et al., 2005; KRIEGER; ROSS 2005)

De acordo com Morrison et al. (2004), o potencial de expansão de *S. invicta* está relacionado com a variação de temperatura e níveis de precipitação. Variações bruscas entre esses fatores limitam o sucesso da expansão. A maior abundância de indivíduos de *S. invicta* em áreas invadidas é devida ao baixo número de inimigos naturais, uma vez que, em sua região nativa isto não é observado. Essa espécie também possui a habilidade de expandir-se rapidamente em áreas desmatadas. A dispersão de ninhos monogínicos necessita de uma atenção maior, uma vez que as rainhas podem voar vários quilômetros, entretanto, os ninhos poligínicos dispersam-se por fissão da colônia, mas o seu poder de destruição pode ser maior, por conta da alta densidade populacional (HENSHAW et al., 2005).

Historicamente as análises taxonômicas do gênero *Solenopsis* têm revelado grandes controvérsias, pela alta diversidade de espécies, além de escassos caracteres fidedignos (WILSON, 1952; TRAGER, 1991; PITTS et al., 2005). De acordo com Pitts et al. (2005), *S. invicta* está contida no complexo (espécie-grupo) *Solenopsis saevissima*.

Estudo realizado por Ross et al. (2007), sobre a estrutura genética de 10 populações brasileiras e 3 argentinas de *S. invicta*, revelou a existência de diferenciação genética significativa entre as populações. De acordo com os autores existe pronunciada diferenciação regional entre as populações nos genomas mitocondrial e nuclear, principalmente nas populações brasileiras. Essa diferenciação provavelmente mostra que essas populações são geneticamente e evolutivamente independentes. O trabalho de Ahrens; Ross e Shoemaker (2005), relata que populações de *S. invicta* do Brasil possuem pronunciada diferenciação genética. Esse estudo revela também uma forte barreira geográfica entre as populações do norte da Argentina e populações do sul e centro oeste do Brasil.

Um estudo de delimitação de espécies do gênero *Solenopsis* realizado por Ross e Shoemaker (2005), demonstra que as espécies *S. invicta* e *Solenopsis richteri* são completamente isoladas reprodutivamente em populações nativas simpátricas, em contraste com suas populações introduzidas nos Estados Unidos, onde ocorrem híbridos dessas duas espécies. Também mostra um mapa de possível ocorrência das espécies (figura 1). Entretanto o trabalho de Martins (2010) revelou que área de ocorrência de *S. invicta* é muito maior que a demonstrada por Ross e Shoemaker (2005), pois ninhos de *S. invicta* foram coletados nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná e Pernambuco.

Uma análise realizada por Krieger et al. (1999) através de microssatélites e alozimas em *S. invicta* evidencia a existência de operárias triplóides em populações poligínicas nativas e introduzidas. A origem dessas operárias provavelmente deve-se a alta frequência de machos diplóides férteis. Embora os himenópteros sociais sejam caracterizados por um sistema genético de machos haplóides, machos diplóides podem ser produzidos em certas circunstâncias.

A verificação do perfil genético de populações nativas ou introduzidas de espécies potencialmente invasoras, como *S. invicta*, pode ajudar no entendimento e no planejamento de estratégias mais eficazes de controle. A revisão de Tsutsui e Suarez (2003), ressalta que populações de formigas potencialmente invasoras

nativas ou introduzidas exibem diferenças pronunciadas em sua biologia, como mudanças no comportamento, organização social, biologia reprodutiva e perfil genético.

O trabalho de Henshaw et al. (2005) utiliza marcadores moleculares para analisar o perfil genético de populações introduzidas de *S. invicta* em duas localidades na Austrália. Os resultados da análise demonstram que a possível origem da introdução é a América do Norte. Os autores dispõem que essa análise tem implicações para os planos de prevenção e erradicação desta espécie.

1.3 - Biologia de *Wolbachia* e infecção em *Solenopsis invicta*

A *Wolbachia* é uma bactéria intracelular pertencente ao grupo das Alpha-Proteobactérias que infecta uma grande variedade de hospedeiros como insetos, crustáceos, quelicerados, nematóides, ácaros e aranhas. Estima-se que a infecção por *Wolbachia* nos insetos pode chegar a 76 % das espécies (WERREN, 1997; STOUTHAMER et al., 1999; WERREN; WINDSOR, 2000; FENN; BLAXTER, 2004; LO et al. 2007).

Atualmente, *Wolbachia* possui oito supergrupos: A, B, C, D, E, F, G e H. Essa divisão é decorrente das diversas análises filogenéticas realizadas com os genes 16S rDNA, *wsp*, *ftsZ*, *groEL*, *gltA* e *dnaA*. Os supergrupos ou cepas de *Wolbachia* A e B são comumente encontrados em artrópodes; os supergrupos C e D estão presentes na maioria dos nematóides; o E é encontrado em colêmbolos, o F é encontrado em artrópodes e também nematóides, o supergrupo G é encontrado em aranhas e o supergrupo H é encontrado em cupins. (LO et al. 2007).

Devido à rápida expansão e a interação com diversos táxons, muitas espécies de formigas podem ter adquirido *Wolbachia* através de diversas formas de parasitoides (DEDEINE et al., 2005).

O estudos de Baldo et al. (2005, 2006) propõem um conjunto de cinco genes que devem ser utilizados para a caracterização molecular de *Wolbachia*. O Multi Locus Sequencing Typing (MLST) é mais consistente na identificação molecular, uma vez que diminui os erros causados por recombinação gênica. Além do MLST, os autores utilizam o “WSP Typing”, que consiste na análise das regiões hipervariáveis (HVRs) do gene que codifica a proteína de superfície *wsp* de *Wolbachia*. As regiões hipervariáveis podem sofrer recombinação entre diferentes

cepas e entre organismos da mesma cepa. Essas regiões hipervariáveis possuem seleção positiva e a recombinação gênica pode ter papel fundamental na interação hospedeiro e parasita, bem como na troca de características funcionais.

A transmissão de *Wolbachia* acontece verticalmente e pode acarretar diversos efeitos em seus hospedeiros, como partenogênese, morte dos machos, feminização, adaptação local, especiação e incompatibilidade citoplasmática (IC) (STOUTHAMER et al., 1999). A IC tem sido relacionada com alterações na sincronia das divisões endomitóticas dos núcleos masculino e feminino, resultando na inviabilidade do embrião (TRAM ; SULLIVAN, 2002).

Os efeitos da IC estão relacionados com a inviabilidade dos embriões a partir de cruzamentos unidirecional e bidirecional. O cruzamento entre macho infectado e fêmea não infectada não gera prole, mas a situação inversa deixa descendente. Quando há cepas distintas em cada indivíduo o cruzamento também é inviável, entretanto fêmeas com mais de uma cepa possuem uma maior vantagem adaptativa, pois conseguem cruzar e produzir prole (BARR, 1980; ROUSSET; RAYMOND, 1991).

A IC promove o rápido aumento de *Wolbachia* dentro de uma população hospedeira não infectada, e esse rápido aumento pode gerar isolamento reprodutivo, que, posteriormente, pode levar a especiação (FENN; BLAXTER, 2004). As alterações reprodutivas induzidas nos hospedeiros podem ser vantajosas para a bactéria, uma vez que há o aumento de indivíduos infectados que posteriormente transmitirão a *Wolbachia* para as gerações futuras (CASPARI; WATSON, 1959; FINE, 1978; TURELLI, 1994; WERREN; O' NEILL, 1997).

As variantes de *Wolbachia* encontradas em formigas do Novo Mundo são similares entre si, porém diferem de outras cepas que ocorrem em outros grupos de insetos, sugerindo que elas são específicas de formigas (TSUTSUI et al., 2003).

O estudo de Russel et al. (2009) que utilizaram o MLST demonstra que as variantes encontradas em Formicidae são altamente similares. Os resultados desse estudo corroboram aqueles de Tsutui et al. (2003), indicando que há uma diferença entre variantes encontradas em formigas e outros insetos e também há diferença nas variantes encontradas no Novo Mundo e Velho Mundo.

Embora o MLST seja a ferramenta mais adequada na caracterização molecular de *Wolbachia* (BALDO et al., 2006), até o ano de 2010, essa técnica foi pouco utilizada. Alguns dos trabalhos realizados com esta ferramenta corroboram

estudos anteriores que utilizavam somente um gene para a caracterização, inferências filogenéticas e dinâmica da *Wolbachia* (RUSSEL et al., 2009). Grande parte dos estudos realizados com *Wolbachia* em *S. invicta* utilizou o gene que codifica a proteína de superfície *wsp* (SHOEMAKER et al., 2000; SHOEMAKER et al., 2003; AHRENS ; SHOEMAKER ,2005; DEDEINE et al., 2005; BOUWMA et al., 2006)

Dedeine et al. (2005) relataram que a *Wolbachia* pode ser transmitida pela interação entre os táxons, conhecida como transmissão horizontal. Esse mecanismo ainda não está totalmente esclarecido, entretanto, o autor sugere que a infecção horizontal pode ocorrer entre a interação de insetos hospedeiros e seus parasitas sociais, como *Solenopsis invicta* e seu parasita social *Solenopsis dauguerrei*.

Análises sobre a história evolutiva da infecção por *Wolbachia* em *S. invicta* em populações da Argentina e Brasil realizadas por Ahrens e Shoemaker (2005) revelam que a infecção ocorreu possivelmente em seis momentos diferentes através de transmissão horizontal, seguidas de múltiplas infecções e independentes perdas. Os autores discutem também que a variação significativa da prevalência de *Wolbachia* pode ser decorrente de fatores como: limites regionais, fatores ambientais ou fatores de eliminação do hospedeiro. Shoemaker et al. (2000) analisando populações nativas de *S. invicta* também verificaram que a frequência de infecção por *Wolbachia* pode variar entre populações geograficamente distintas e também entre ninhos com formas sociais diferentes.

Uma análise realizada por Bouwma et al. (2006) em populações introduzidas de *S. invicta* mostrou que coletas realizadas em 1996 e 2003 exibem uma baixa prevalência de *Wolbachia*. As diferentes cepas encontradas nas diferentes formas sociais (monogínica e poligínica) podem ser decorrentes de um ou mais eventos recentes de introdução de rainhas infectadas no sul dos Estados Unidos.

Em populações introduzidas de formigas, a taxa de infecção por *Wolbachia* é menor que a observada em populações nativas. Shoemaker et al. (2000) relataram que em populações introduzidas de *S. invicta* nos Estados Unidos, a taxa de infecção é menor que em populações da América do Sul. Essa escassez pode ser decorrente da falta de infecção em rainhas fundadoras ou até mesmo que a infecção foi perdida por conta de deriva ou seleção natural. Os autores argumentam também que a infecção deve atingir um limiar para que *Wolbachia* possa se fixar na população. Esse limiar depende do sucesso da adaptação das fêmeas que

carregam a bactéria, além do sucesso na transmissão da bactéria para futuras gerações.

Reuter, Pedersen e Keller, (2005) analisando populações nativas e introduzidas da formiga *Linepithema humile* corroboram o trabalho de Shoemaker et al., (2000). Para esses autores a conquista de novos territórios pode influenciar na dinâmica de transmissão de *Wolbachia*, uma vez que os parâmetros de transmissão em populações nativas possivelmente diferem dos encontrados em populações introduzidas. Muitas características diferem entre as populações nativas e introduzidas, tais como: estrutura social, prolongada fase de crescimento, aumento na densidade populacional. A conexão de diversos ninhos pode mudar a dinâmica de propagação de *Wolbachia* e ocasionar perda de infecção em populações introduzidas. A análise sobre o gene *wsp* revela que há uma pronunciada similaridade entre as sequências de *L. humile* e de *wsp* de outras espécies de formigas como *Acromyrmex octospinosus*, *Acromyrmex echinator*, *S. invicta* e *S. richteri*, essa similaridade pode ser decorrente da aquisição por transmissão horizontal, parasitas sociais em comum ou até mesmo recombinação entre diferentes linhagens de *Wolbachia*

A figura 1 ilustra a ocorrência de *S. invicta* no Brasil de acordo com o trabalho de Ross e Shoemaker (2005), e as coletas de Martins (2010) são indicadas com círculos em preto. A figura 2 mostra a formiga *S. invicta*. A figura 3 ilustra a forma de ataque *S. invicta* e figura 4 mostra o ninho e a consequência de múltiplos ataques.

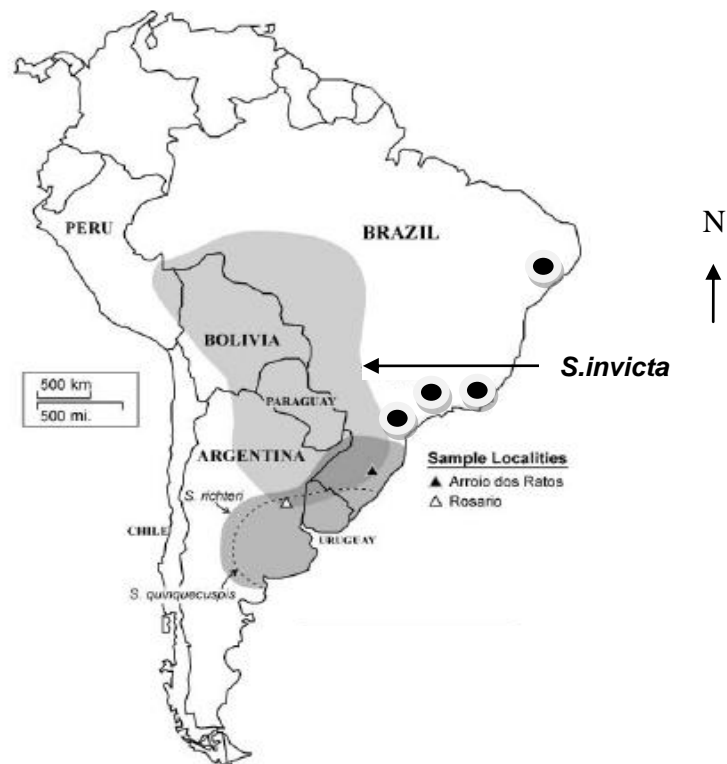


Figura 1: Inferência sobre a ocorrência de *Solenopsis invicta* na América do Sul. A seta indica a ocorrência de *S. invicta* de acordo com o trabalho de Ross & Shoemaker (2005), os círculos em preto indicam os pontos de coleta realizados por Martins (2010). **Fonte:** Ross e Shoemaker (2005).



Figura 2: *Solenopsis invicta*. **Fonte:** The University of Texas - Texas - Alex Wild 2003.



Figura 3: Forma de ataque de *S. invicta*. **Fonte:** University of California, Riverside – Center for Invasive Species Research.



Figura 4: Ninho de *S. invicta* e consequência de múltiplos ataques. **Fonte:** University of California, Riverside – Center for Invasive Species Research.

2.0 - Objetivos:

Embora esteja amplamente distribuída na América do Sul, somente alguns grupos estrangeiros têm trabalhado com *S. invicta*. Muitas das inferências sobre a biologia reprodutiva e sobre a infecção por *Wolbachia* limitam-se a poucas populações amostradas nos locais de ocorrência natural. Ninhos e populações localizados na costa leste do Brasil foram pouco estudados e as observações feitas até o momento decorrem de amostras das regiões Centro-Oeste e Sul e da Argentina. Em virtude desta observação o objetivo geral compreendeu caracterizar colônias de *S. invicta* através de marcadores moleculares, *mtDNA* e microssatélites, e inferir sobre biologia reprodutiva das populações.

Especificamente procurou-se:

- 1- Verificar a média de relacionamento entre as formigas do mesmo ninho através do programa Spagedi (HARDY; VEKEMANS, 2002)
- 2- Inferir a filogenia entre a linhagens de *mtDNA* de cada ninho analisado pelo método de máxima parcimônia software Mega 4.0 (TAMURA, et al., 2007).
- 3- Investigar a presença da endobactéria *Wolbachia* em ninhos de *S. invicta* através da reação de polimerização em cadeia (PCR), utilizando primers para fragmento do gene *wsp*, Wsp81F e Wsp691R descritos por Zhou et al. (1998).
- 4- Sequenciar o fragmento do gene *wsp* e comparar com sequências depositadas no GenBank.
- 5- Verificar a similaridade do gene *wsp* entre as sequências obtidas e as sequências depositadas no Genbank através do método Neighbour-joining do software Mega 4.0 (TAMURA, et al., 2007).
- 6- Realizar a análise do WSP Typing descrito por BALDO et al. (2005) para a verificação das estruturas das regiões Hipervariáveis do gene *wsp*.

3.0 Material e Métodos:

3.1 - Coleta, identificação e preservação dos exemplares de *S. invicta*.

Os ninhos de formigas do gênero *Solenopsis* foram coletados nas cidades de Salesópolis, Mogi das Cruzes, São Paulo, Campinas e Rio Claro no estado de São Paulo. A coleta foi efetuada manualmente, dispensando qualquer tipo de armadilhas. Foram coletados de 4 a 6 ninhos em cada cidade, para que houvesse maior possibilidade de amostrar ninhos de *S. invicta*, pois a espécie *Solenopsis saevissima*, também é muito frequente na região. A distância mínima entre as cidades amostradas foi de 30 km.

Todas as coletas foram realizadas manualmente com ferramentas de jardinagem e utensílios domésticos: pá para jardinagem e potes plásticos para armazenamento de alimentos (fig. 5). Antes de iniciar a coleta foi necessário fazer a verificação da atividade do formigueiro, para avaliar se o ninho estava em baixa atividade, o que pode indicar migração dos indivíduos. Essa verificação foi realizada enterrando-se a pá de jardinagem por 10 cm na parte superior do formigueiro. Somente foram coletados os ninhos onde, após a retirada da pá as formigas de diferentes castas apareciam. Uma porção de terra do formigueiro foi colocada no pote plástico e vedada em seguida. As coletas foram realizadas em dias chuvosos ou após um período de chuva, devido à característica da espécie de aumentar seu montículo de terra superior. Isto torna à visualização e localização dos ninhos mais evidente.

Na cidade de Salesópolis – SP foram realizadas coletas em dois pontos diferentes: o primeiro local foi próximo a Rua Benedito Vicente de Faria (23° 32'00.03" S 45°50'55.46" O), no centro da cidade (fig. 6). Os mapas da cidade de Salesópolis não estão no mesmo padrão que os das outras cidades porque não há disponibilidade de imagens pela ferramenta Google Earth. Cerca de três ninhos foram coletados e todos se encontravam próximos ao córrego Padre Emanuel. O segundo ponto de coleta foi próximo ao Rio Paraitinga na Av. Profº Ademar Bolina II (23°31'46.11" S 45°51'03.86" O) onde três ninhos foram coletados (fig. 7).



Figura 5: Utensílios utilizados na coleta de formigas lava-pés *S. invicta*.

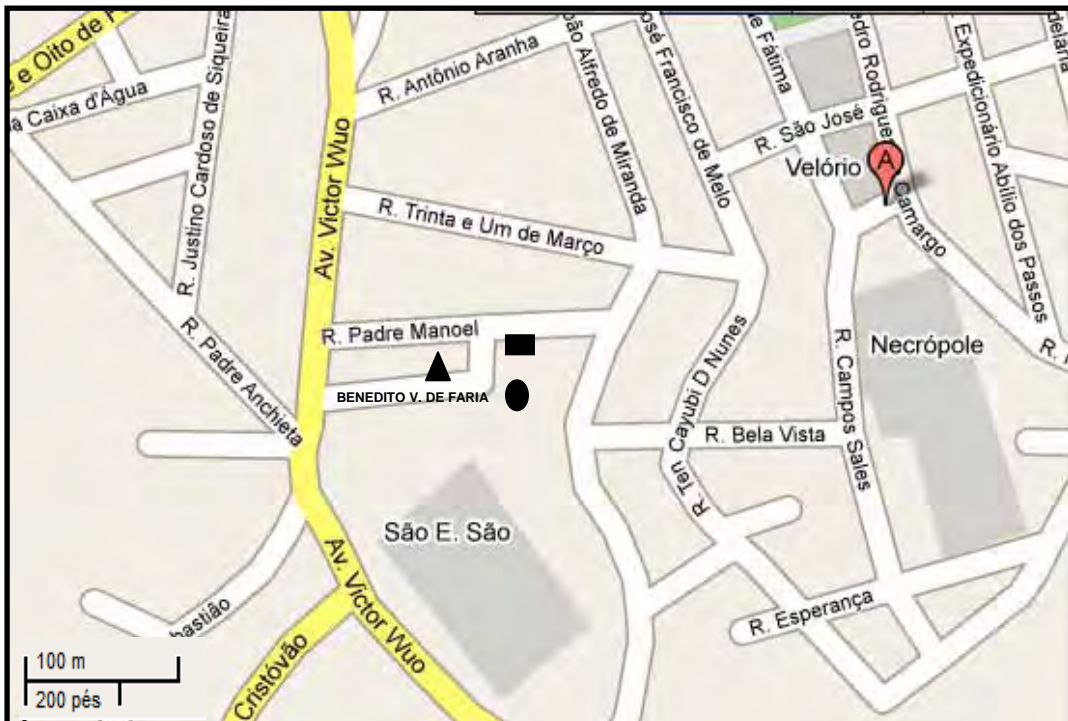


Figura 6: Mapa da cidade de Salesópolis indicando os pontos de coletas dos ninhos de *S. invicta*. (Triângulo) Ponto 1, (Retângulo) Ponto 2 e (Círculo) Ponto 3. **Fonte:** Google Maps

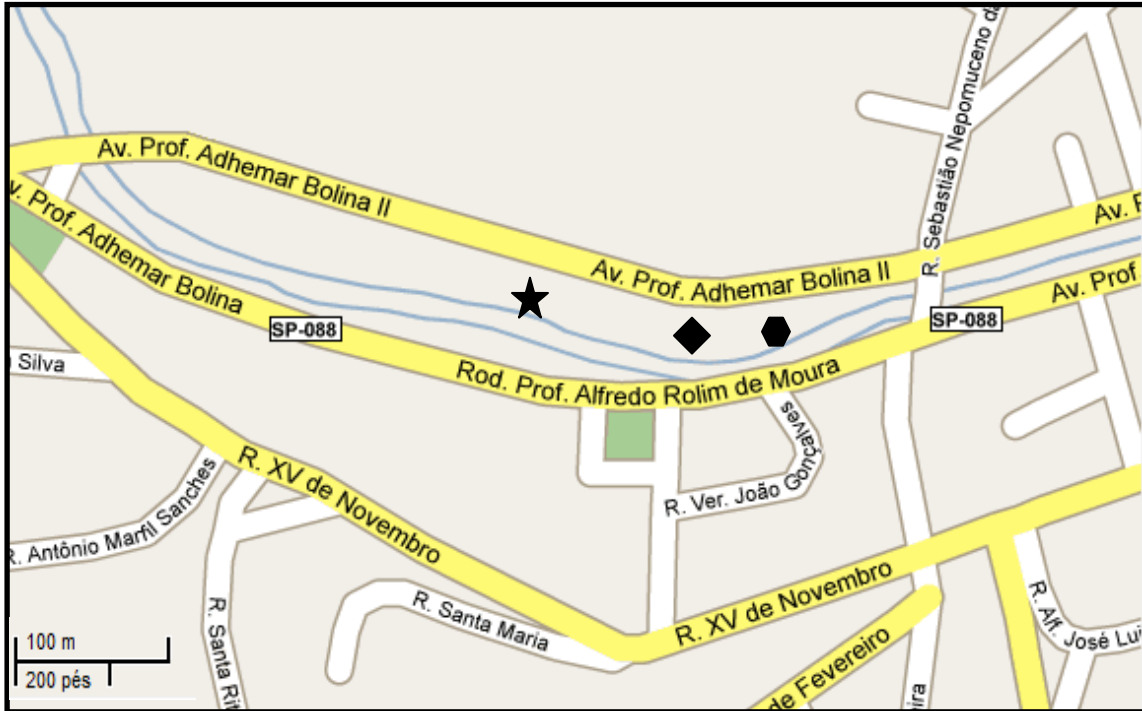


Figura 7: Mapa da cidade de Salesópolis indicando os pontos de coleta dos ninhos de *S. invicta*. (Estrela) Ponto 6, (Losango) Ponto 5 e (Hexágono) Ponto 4. **Fonte:** Google Maps. **Escala:** Canto inferior esquerdo.

Na cidade de Mogi das Cruzes – SP as coletas foram realizadas entre as Avenidas Dr. Cândido Xavier de Almeida e Souza e Ver. Narciso Yague Guimarães – Centro Cívico, próximo ao campus da Universidade de Mogi das Cruzes - UMC (fig.8). Foram realizadas coletas em seis diferentes pontos: Ponto 1 ($23^{\circ} 31' 07.12''$ S $46^{\circ} 10' 58.60''$ O), Ponto 2 ($23^{\circ} 31' 07.84''$ S $46^{\circ} 10' 58.92''$ O), Ponto 3 ($23^{\circ} 31' 08.90''$ S $46^{\circ} 10' 58.55''$ O), Ponto 4 ($23^{\circ} 31' 08.02''$ S $46^{\circ} 10' 59.71''$ O), Ponto 5 ($23^{\circ} 31' 09.60''$ S $46^{\circ} 11' 03.52''$ O) e Ponto 6 ($23^{\circ} 31' 10.03''$ S $46^{\circ} 11' 05.17''$ O). Em cada ponto foi coletado um ninho e todos se encontravam sobre o gramado aberto.

Na cidade de São Paulo- SP as coletas foram realizadas no campus da Universidade de São Paulo- Cidade Universitária – USP (fig. 9). Foram amostrados seis pontos do campus, sendo coletado um ninho por ponto: Ponto 1 ($23^{\circ} 33' 36.69''$ S $46^{\circ} 42' 47.65''$ O), Ponto 2 ($23^{\circ} 33' 37.18''$ S $46^{\circ} 42' 48.66''$ O), Ponto 3 ($23^{\circ} 33' 36.02''$ S $46^{\circ} 42' 50.00''$ O), Ponto 4 ($23^{\circ} 33' 39.39''$ S $46^{\circ} 42' 45.59''$ O), Ponto 5 ($23^{\circ} 33' 45.24''$ S $46^{\circ} 42' 45.31''$ O) e Ponto 6 ($23^{\circ} 33' 44.27''$ S $46^{\circ} 42' 46.29''$ O).

As coletas realizadas na Cidade de Rio Claro- SP foram feitas no campus da Universidade Estadual Paulista – Júlio Mesquita Filho – campus Bela Vista – Bairro Bela Vista (fig. 10). A amostragem foi realizada em quatro pontos sendo coletado um ninho por ponto: Ponto 1 ($22^{\circ} 23' 50.18''$ S $47^{\circ} 32' 56.03''$ O), Ponto 2 ($22^{\circ} 23' 49.00''$ S

47°32'55.51" O), Ponto 3 (22°23'49.57" S 47°32'53.01" O) e Ponto 4 (22°23'43.20" S 47°32'39.93" O).



Figura 8: Vista aérea da cidade de Mogi das Cruzes onde foram realizadas coletas de ninhos de formigas *S. invicta*. Marcadores em amarelo indicam cada ponto de coleta. **Fonte:** Google Earth. **Escala:** Canto inferior esquerdo.

As coletas realizadas na cidade de Campinas- SP foram feitas dentro do Campus da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP (fig. 11). A amostragem foi realizada em cinco diferentes pontos, sendo coletado um ninho por ponto: Ponto 1 (22°49'11.19" S 47°03'36.79" O), Ponto 2 (22°49'14.01" S 47°03'37.47" O), Ponto 3 (22°49'21.43" S 47°03'41.78" O), Ponto 4 (22°49'24.41" S 47°03'41.49" O), Ponto 5 (22°49'25.83" S 47°03'46.17" O).

Em todas as cidades amostradas, todos os ninhos estavam situados em gramados expostos ou perto de fontes hídricas. Essas são características de adaptação que possivelmente influenciaram no sucesso de invasão desta formiga em outros ambientes; Morrison et al., (2004) expõem que esta espécie possui alto potencial para invadir ambientes impactados. Estes ambientes possuem solos

descobertos pela vegetação o que pode aumentar sua temperatura, facilitando a invasão de *S. invicta*.



Figura 9: Vista aérea do campus da USP na cidade de São Paulo onde foram coletados ninhos da formiga *S. invicta*. Marcadores em amarelo indicam os pontos de coleta. **Fonte:** Google Earth. **Escala:** Canto esquerdo inferior.

A identificação definitiva da espécie se deu pelo sequenciamento do DNA mitocondrial (Citocromo Oxidase I – mtDNA COI), pelo método Barcode (HERBERT et al., 2003). O armazenamento dos exemplares foi em etanol 80% e congelamento em freezer – 20 ° C.



Figura 10: Vista aérea do campus da UNESP campus Rio Claro onde foram realizadas coletas dos ninhos de formiga *S. invicta*. Marcadores amarelos indicam os pontos de coletas. **Fonte:** Google Earth. **Escala:** Canto esquerdo inferior.



Figura 11: Vista aérea da Universidade Estadual de Campinas- UNICAMP onde foram realizadas coletas dos ninhos de formiga *S. invicta*. Marcadores amarelos indicam os pontos de coletas. **Fonte:** Google Earth. **Escala:** Canto esquerdo inferior.

3.2 - Extração de DNA total.

Para a análise preliminar de identificação através do *mtDNA* foi utilizada uma formiga de cada ninho. Cada exemplar foi homogeneizado em solução tamponada (100 mM Tris, pH 9.0; 100mM NaCl; 200 mM sacarose; 50 mM EDTA e 0.5 % SDS e 200 ug/ ml Proteinase K) a 65 ° C por 4 horas; as proteínas e restos celulares foram precipitados com solução NaCl 5M. Em seguida foram incubados com RNase a 37° C por 5 minutos. A precipitação do DNA foi realizada com álcool isopropílico 100 % em seguida por álcool etílico gelado a 70%. O DNA foi ressuscitado em 30µL de tampão TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8.0). A visualização da qualidade do DNA extraído foi realizada através de gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

3.3 - Reação de polimerização em cadeia (PCR).

3.3.1- DNA mitocondrial

A análise realizada do DNA mitocondrial (*mtDNA*) para a identificação ocorreu com a utilização dos primers *CIJ* (5' TTGATTTTTTGGTCATCCAGAAGT 3') e *DDS* (5' TAAGATGGTTAATGAAGAGTAG 3') descritos por Ahrens; Ross e Shoemaker (2005) que amplifica uma porção de aproximadamente 920 pb do gene codificante Citocromo Oxidase I. Através do sequenciamento desse gene, os ninhos que apresentaram haplótipos mais similares com aqueles depositados no banco de dados National Center for Biotechnology Information (NCBI) para *S. invicta* foram submetidos às análises posteriores. A amplificação foi executada em reações de 50µL de volume final, contendo DNA molde, Tampão PCR, MgCl₂, dNTP's, primers e Taq DNA polimerase.

O programa para a amplificação do fragmento consistiu em pré-desnaturação a 94°C por 1 minuto, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 48°C por 1 minuto e 68°C por 2 minutos e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. A confirmação da amplificação do fragmento foi realizada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

3.3.2 - Purificação e Reação de Sequenciamento do *mtDNA*

As amostras de PCR foram purificadas com o kit de purificação – Illustra™ GFX™ PCR and Gel Band Purification Kit da empresa GE Healthcare. Após a purificação das amostras a quantificação do DNA foi realizada em um equipamento de nanodrop – NanoDrop 2000 Thermo scientific.

De cada tubo da purificação foram retirados 20ng de DNA e transferidos para microtubos de 0.2mL, aos quais foram adicionados: 2µL de água milliQ, 3µL de tampão Save Money, 1µL de primer (10mM), 2µL de Big Dye (dd; A,T,C,G; Taq e tampão), resultando em 10µL final de reação.

Os microtubos contendo 10µl de DNA para a reação de sequenciamento foram levados até o termociclador, com mesmo programa para os primers *CIJ* e *DDS* para *mtDNA*- COI. Ao final, o termociclador foi programado para um hold, de 0 a 4°C, para manter as amostras conservadas até o momento de estocagem.

3.3.3 - Precipitação

Nesta etapa, em cada microtubo com a reação de seqüência, foram adicionados 100µL de isopropanol 75%. Em seguida as reações foram transferidas para microtubos de 1,7mL. Após 10 minutos em repouso as reações foram centrifugadas a 3000RCF por 30 min. Desprezando o sobrenadante, houve a adição de 200µL de etanol 70%. Uma nova centrifugação foi realizada por 2 minutos a 3000RCF. O sobrenadante foi desprezado e todas as reações foram colocadas em termobloco a 96°C para eliminação de resíduos de etanol. O sequenciamento das amostras foi realizado no aparelho Genetic Analyzer ABI 3130 (Applied Biosystem TM) do Laboratório de Formigas do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) na Universidade Estadual Paulista (UNESP) campus Rio Claro.

3.4 - Análise das seqüências obtidas

As seqüências nucleotídicas obtidas do *mtDNA* foram analisadas pelo software Bioedit (HALL, 1999) para a verificação da qualidade do sequenciamento. Em seguida, estas seqüências foram alinhadas e comparadas com as seqüências depositadas no banco de dados NCBI através da ferramenta de bioinformática BLAST, presente no próprio banco de dados (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Os ninhos que apresentaram seqüências de haplótipos similares aos de *S. invicta* foram selecionados para as futuras análises.

3.4.1- Análise filogenética das seqüências de *mtDNA*

Foi realizada uma análise filogenética utilizando o software Mega 4.0 (TAMURA, et al., 2007) com as seqüências de *mtDNA* positivas para *S. invicta*. Para estimar a similaridade bem como a relação filogenética foram utilizados dois métodos de análise: Neighbour-joining e Máxima Parcimônia; as distâncias dos ramos foram calculadas através parâmetro 2 de Kimura. A análise de Máxima Parcimônia utilizou 2 seqüências de *Solenopsis daguerrei* depositadas no GenBank (AY950705.1 e AY 950706.1) como grupo externo. Shoemaker, Ahrens e Ross, (2006) sugerem que esta espécie (*S.daguerrei*) é uma espécie basal da espécie-grupo em que está contida. Outras 3 sequencias de *Solenopsis geminata* depositadas no GenBank também foram utilizadas como grupo externo (H13 AY 254487.1, H14 AY 254488.1 e H15 AY 254489.1). Uma seqüência de *Solenopsis*

xyloni (DQ153015.1) também foi utilizada como grupo externo. A análise de bootstrap com 2000 réplicas foi conduzida para verificar a confiabilidade e dar suporte à análise filogenética.

3.5 - Microssatélites

Foram utilizados oito loci para microssatélites descritos por Krieger e Keller, (1997). A reação para cada locus foi efetuada em microtubo apropriado contendo: Tampão, DNA polimerase, MgCl₂, dNTP's, primers e DNA molde para um volume final de 10 µL. Todos os loci utilizam o mesmo programa para a amplificação do DNA molde: Pré-desnaturação a 92°C por 2 minutos, seguidos por 35 ciclos de 92°C por 45 segundos, 57°C por 45 segundo e 72°C por 1 minuto, e uma extensão final de 5 minutos a 72°C.

Todos os primers Forward foram marcados com as seguintes fluorescências: Sol 6 – 6FAM, Sol 11 – VIC, Sol 18 – NED, Sol 20 – PET, Sol 42 - 6FAM, Sol 49 - 6FAM, Sol 52 – PET, Sol 55 – NED. A marcação com fluorescências permite que a genotipagem seja realizada por tamanho da molécula, diferentemente do sequenciamento convencional que permite visualizar a composição das bases nucleotídicas. Como todos os primers utilizam o mesmo programa de ciclagem, os primers com moléculas diferentes foram combinados e amplificação ocorreu em “multiplex”. A genotipagem das amostras foi efetuada por eletroforese capilar, em um seqüenciador automático modelo ABI 3130 (Applied Biosystem TM) e analisados através do aplicativo Genemapper® (Applied Biosystem TM).

3.5.1- Verificação dos alelos e inferência de biologia reprodutiva

Os resultados da genotipagem foram analisados para verificação de possíveis erros. Artefatos de amplificação, “Stutters”, são comuns em microssatélites e por isso podem atrapalhar muitas análises. Para estudos em genética de populações existem programas que verificam a presença de stutters, além de analisar a presença de alelos nulos. Entretanto esses programas levam em consideração a premissa de população, e este estudo analisa “ninhos” e a utilização destes programas pode gerar resultados errôneos. Em virtude disso a análise dos microssatélites foi feita manualmente.

Em sistemas de cruzamento haplodiplóide como o de *S. invicta* o macho haplóide contribui somente com um conjunto de alelos para seus descendentes. Considerando que fêmeas e machos são monogâmicos é possível inferir o provável número de casais que compõe o ninho através da análise da prole.

3.6 – Análise de poliginia

Os 10 ninhos de *Solenopsis invicta* foram analisados com 2 conjuntos de primers para a verificação da monoginia e poliginia. O primeiro conjunto de primers: *26BS* (5' - CTCGCCGATTCTAACGAAGGA - 3'), *16BAS* (5' - ATGTA TACTTTAAAGCATTTCCTAATATTTTGTG - 3'), *24bS* (5' - TGGAGCTGATTATGATGAAGAGAAAATA - 3') e *25bAS* (5' - GCTGTTTTTAATTGCATTTCTTATGCAG - 3'), foi descrito por Valles e Porter (2003). Os primers foram utilizados em multiplex e o programa para a amplificação foi: 1 ciclo a 94°C por 2 min, seguidos por 35 ciclos a 94°C por 15 sec, 55°C por 15 sec, e 68°C por 30 sec, e uma extensão final de 5 min a 68°C.

O segundo conjunto de primers utilizados foi: *Gp-9.for* (5' - GGAGCTGATTATGATGAAGAGAAAAT - 3'), *Gp-9.rev* (5'- AGCACAGCTTCAGCTGCTAAGA-3'), *all_b.rev* (5' - AGCACAGCTTCAGCTGCTAAGAT - 3') e *all_b.for* (5' - GGAGCT GATTATGATGAAGAGAAAATA - 3'). A descrição dos primers juntamente com a combinação utilizada e os programas de amplificação foram descrito por Ross ; Krieger e Shoemaker (2003).

3.7 – Análise de relacionamento genético intra-colonial

O índice de relacionamento genético intra-colonial foi medido através do programa Spagedi (HARDY ; VEKEMANS, 2002) seguindo a estimativa de Queller e Goodnight (1989). A análise entre pares foi realizada e os dados foram testados pelo método Jackknifing. Após a análise de pares, foi calculada a média de relacionamento genético intra-colonial.

3.8 - Verificação da infecção pelo endossimbionte *Wolbachia*

A análise da prevalência do endossimbionte *Wolbachia* foi realizada pela utilização de primers para o gene *wsp*, *Wsp81F* (5' - TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC - 3') e *Wsp691R* (5' - AAAAATTAACGCTACTCCA - 3'), o qual amplifica um fragmento com aproximadamente 590 pares de bases descritos por Zhou et al. (1998). A amplificação foi executada em reações de 50µL de volume final, contendo DNA molde, Tampão PCR, MgCl₂, dNTP's, primers e Taq DNA polimerase . O controle negativo para contaminação por DNA consistiu em uma reação de amplificação sem o DNA molde (substituído por H₂O autoclavada), incluído em todas as reações de PCR realizadas.

O programa para a amplificação do fragmento foi uma pré-desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 56°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, e uma extensão final a 72°C por 7 minutos. A confirmação da amplificação do fragmento, foi realizada em gel de agarose 1%.

A purificação e o sequenciamento das amostras de *Wolbachia* foram realizados com os mesmos parâmetros descritos acima para o *mtDNA*.

3.9 - Análise de similaridade das sequências de *wsp* de *Wolbachia*

A análise de similaridade das sequências obtidas foi realizada com o método Neighbour-joining, através do software Mega 4.0 (TAMURA et al., 2007) . As distâncias dos ramos foram calculadas utilizando parâmetro 2 de Kimura e a confiabilidade dos cladogramas foi medida através do Bootstrap (2000 réplicas). Sequências de *wsp* de *Wolbachia* de *S. invicta* foram gentilmente cedidas pelo professor Dr. David Dewayne Shoemaker da Universidade da Florida – Florida, Estados Unidos da América, e incluídas na análise. Dentre as sequências cedidas, duas sequências pertenciam a amostras de Formosa – Argentina, duas de Roldan – Argentina, duas de Corrientes – Argentina, duas de Rosário – Argentina e duas dos EUA. Outras vinte e duas sequências de *Wolbachia* depositadas nos bancos de dados do NCBI e do European Bioinformatics Institute (EMBL- EBI) foram incluídas na análise filogenética. Além destas, outras cinco sequências provenientes do grupo de pesquisa liderado pelo professor Dr. Odair Correa Bueno da Universidade Estadual Paulista (UNESP) foram incluídas nas análises.

3.10 - Análise WSP Typing

A análise para a verificação de recombinação do gene *wsp* de *Wolbachia* através do método WSP Typing, foi realizada com todas as sequências obtidas de *S. invicta*. A análise também foi realizada com as sequências que estão contidas no subgrupo *InvA* e *InvB*. As sequências foram comparadas com outras depositadas no banco de dados The *Wolbachia wsp* database - <http://pubmlst.org/wolbachia/wsp>. Essa análise possibilita a verificação dos alelos das HVRs do gene *wsp* e comparar com alelos encontrados em outros organismos. Essa comparação pode indicar se o gene encontrado nas amostras de *S. invicta* é resultado de recombinação entre diferentes tipos de alelos de diferentes supergrupos.

4.0-Resultados e Discussão:

4.1 - Extração de DNA

Para a identificação molecular prévia da espécie a extração de DNA foi realizada com uma formiga de cada ninho. Uma alíquota de 5µl do DNA ressuspendido em tampão TE foi injetada em gel de agarose 1% para a verificação da qualidade da extração (fig. 8). Os parâmetros elétricos foram ajustados para 100 V, 30 Ma; em aproximadamente 30 minutos. Ao término do tempo o gel foi colocado em solução TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8.0) com brometo de etídeo para posterior visualização do DNA. As amostras foram consideradas de boa qualidade quando não apresentavam um arrasto no percurso da amostra mais intenso que a banda de DNA na porção superior do gel.

Esses arrastos podem significar que a extração de DNA não foi realizada adequadamente, pois os procedimentos de extração visam isolar totalmente o DNA de restos celulares, proteínas e lipídeos. Sendo assim, quando o arrasto no gel de agarose foi mais intenso que a banda de DNA, possivelmente os procedimentos não separaram o DNA eficientemente. Utilizar amostras que não possuem arrastos fortes é importante no procedimento de amplificação do DNA, pois proteínas e restos celulares podem interferir na amplificação das porções nucleotídicas de interesse. Em casos onde o gel revelava a ausência de DNA como na figura 8 (seta vermelha) uma nova extração foi feita com um espécime do mesmo ninho e, posteriormente, analisada em gel de agarose.

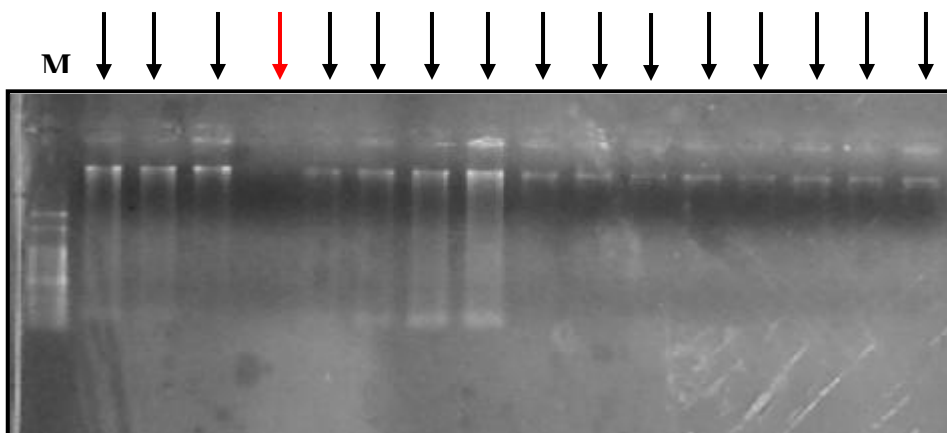


Figura 8: Resultado da injeção de 5µl de extração de DNA visualizado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. (**M**) Marcador molecular. (**Setas**) Espécimes analisados, a seta vermelha indica ausência de DNA.

4.2- Amplificação do *mtDNA*

Foram realizadas as amplificações de vinte e nove espécimes de formiga provenientes dos vinte e nove ninhos coletados nas cinco diferentes cidades. As amplificações do gene mitocondrial *COI* resultaram em bandas únicas de aproximadamente 900 pb. Nos casos onde a amplificação não ocorreu, uma nova reação foi realizada para verificar a possibilidade de erros. Em todos os vinte e nove ninhos analisados não houve problemas em relação a amplificação do *mtDNA*, e todas as amplificações tiveram resultados satisfatórios. Nos casos onde amplificação havia falhado, uma segunda reação foi feita e esta se mostrou positiva. Foram injetadas 5 µl de cada amplificação em gel de agarose 1 % por 30 minutos a 100v e 30 Ma. O corante utilizado para marcar o DNA foi Blue Green da empresa LGC Biotecnologia (fig. 9).

De acordo com a empresa LGC o corante Blue Green tem a capacidade de interferir na passagem de corrente elétrica sobre a molécula de DNA, o que pode explicar a pequena diferença de tamanho entre as bandas da amplificação de *mtDNA*.

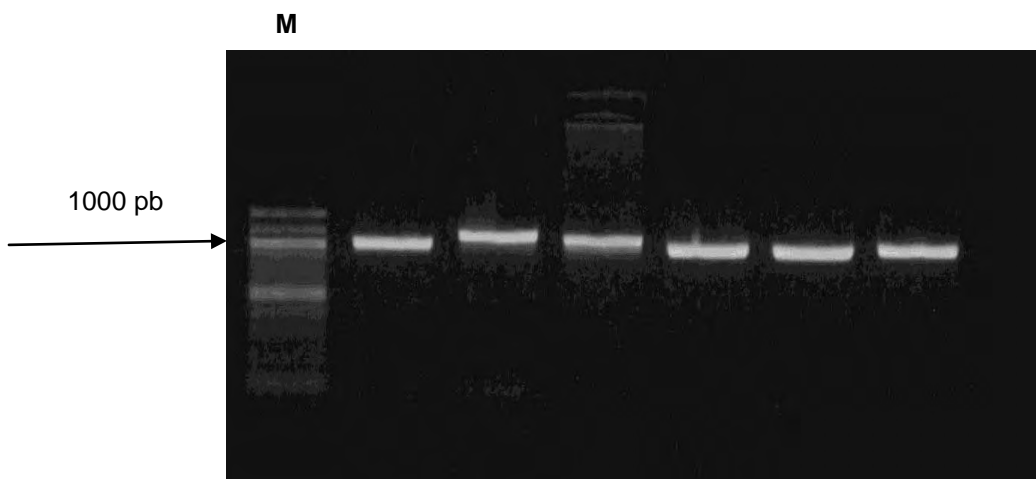


Figura 9: Amplificações do gene *mtDNA COI* injetadas em gel de agarose 1% e coradas com corante Blue Green da LGC – Biotecnologia. (M) Marcador Molecular.

4.3 - Sequenciamento do *mtDNA*, análise e identificação

O sequenciamento das 29 amostras coletadas foi analisado pelo software Bioedit (HALL, 1999), que possibilitou a correção de algumas imperfeições decorrentes do experimento. Normalmente, as regiões iniciais e terminais das sequências não possuem bases confiáveis, pois o equipamento não consegue realizar a leitura corretamente, por conta da estabilização do sistema e pequenas porções amplificadas que se acumulam no início do processo. A fim de evitar erros e possível perda de informações foram utilizados para o sequenciamento os primers *Foward* e *Reverse*, com isso obteve-se de cada amostra um “contig” ou sequência consenso que foi posteriormente comparada com sequências depositadas no banco de dados NCBI através da ferramenta de bioinformática BLAST.

Foram selecionadas duas sequências de cada cidade que obtiveram resultados satisfatórios quanto a sua máxima identificação e E-Value para *S. invicta* (tabela 1). Os valores de máxima identificação representam a porcentagem de similaridade que a sequência obtida possui com aquelas depositadas no banco de dados. O E-value é a probabilidade da sequência do banco de dados ter sido escolhida ao acaso e não por similaridade.

A confirmação de duas sequências para *S. invicta* determinou os dois ninhos de cada cidade que foram utilizados nas análises de microssatélites e infecção por *Wolbachia*. Após esta determinação, o *mtDNA* de cinco operárias de cada ninho de *S. invicta* foi extraído, amplificado, sequenciado e comparado no NCBI para a verificação de diferença de haplótipos mitocondriais entre as formigas do mesmo ninho. Esta comparação mostrou que cada ninho possui somente uma linhagem mitocondrial e nenhuma diferença de haplótipo foi observada. Além disso, o maior número de sequências de cada ninho serviu para dar suporte à identificação pelo “DNA Barcode”.

Tabela 1: Relação das sequências com os maiores valores de identificação para *S. invicta*.

Amostra	Cidade	Número de acesso do haplótipo similar	Haplótipo	E-value	% DE IDENTIFICAÇÃO
Ponto 1	Mogi das Cruzes N1	AY950734.1	39	0.0	99%
Ponto 2	Mogi das Cruzes N2	AY950735.1	40	0.0	99 %
Ponto 1	Rio Claro N1	EF620558.1	Lu-Chuan	0.0	99 %
Ponto 3	Rio Claro N2	AY950735.1	40	0.0	99%
Ponto 6	São Paulo N1	AY950742.1	47	0.0	99%
Ponto 3	São Paulo N2	AY950736.1	41	0.0	99%
Ponto 6	Salesópolis N1	AY950742.1	47	0.0	99%
Ponto 4	Salesópolis N2	AY950736.1	41	0.0	99%
Ponto 2	Campinas N2	AY950742.1	47	0.0	99%
Ponto 3	Campinas N3	AY950744	49	0.0	99%

Embora os espécimes tenham sido enviados para a identificação morfológica, este estudo apoia a ideia e a estratégia da identificação das espécies através do *mtDNA COI* (“DNA Barcode”), como descrito por Herbert et al. (2003). Essa técnica pode melhorar e contribuir para a identificação das espécies, uma vez que a identificação morfológica requer a contribuição de taxonomistas especializados que muitas vezes não conseguem viabilizar as identificações dada a demanda de trabalho. Esse projeto e outros que fazem parte do mesmo grupo de pesquisa sofreram inicialmente com a demora da identificação morfológica, por isso optou-se pela identificação através do *mtDNA*. Além disso, a proposta “DNA Barcode” possui uma página eletrônica (www.barcodinglife.org) que funciona como um banco de dados para as sequências de DNA e que também contém ferramentas que auxiliam a promover a proposta dentro da comunidade científica. Possivelmente a viabilidade deste projeto estaria comprometida caso o *mtDNA-COI* não fosse usado devido a dificuldade de realizar a identificação morfológica das espécies.

Somente foram incluídas na tabela 1 as sequências com os melhores valores de porcentagem de identificação da espécie desejada, enquanto que os outros ninhos identificados como *S. invicta* foram armazenados para estudos posteriores. Na amostragem realizada nessas cinco cidades, as duas espécies encontradas

foram *S. invicta* e *S. saevissima*. Os ninhos de *S. saevissima* também foram armazenados para estudos posteriores.

4.4 - Análise filogenética do *mtDNA*

Para a análise filogenética do *mtDNA-COI* somente uma sequência consenso de cada ninho foi utilizada, uma vez que não houve diferenças de haplótipos entre as formigas do mesmo ninho, em todos os ninhos analisados.

A árvore filogenética (fig. 10) resultante mostra a formação de quatro grupos de haplótipos que existem nas cinco cidades amostradas. O grupo 1 é composto por seis haplótipos praticamente idênticos, uma vez que o bootstrap resultante não conseguiu discriminar a diferença existente. O grupo 2 é resultante de dois haplótipos, sendo um de São Paulo e outro de Salesópolis enquanto que o grupo 3 é formado por um haplótipo de Campinas e o grupo 4 formado por um haplótipo de Rio Claro.

Uma análise filogenética realizada por Shoemaker; Ahrens e Ross (2006) com espécies do gênero *Solenopsis* demonstrou que a espécie *S. invicta* possui grande diversidade de haplótipos mitocondriais, corroborados pelos resultados obtidos no presente trabalho. Os autores argumentam isso pode ser decorrente de alguns fatores como: linhagens altamente divergentes dentro da espécie, forte estruturação filogeográfica e formação de espécies crípticas. Observaram a formação de sete clados bem suportados para *S. invicta* em amostras do Brasil e Argentina.

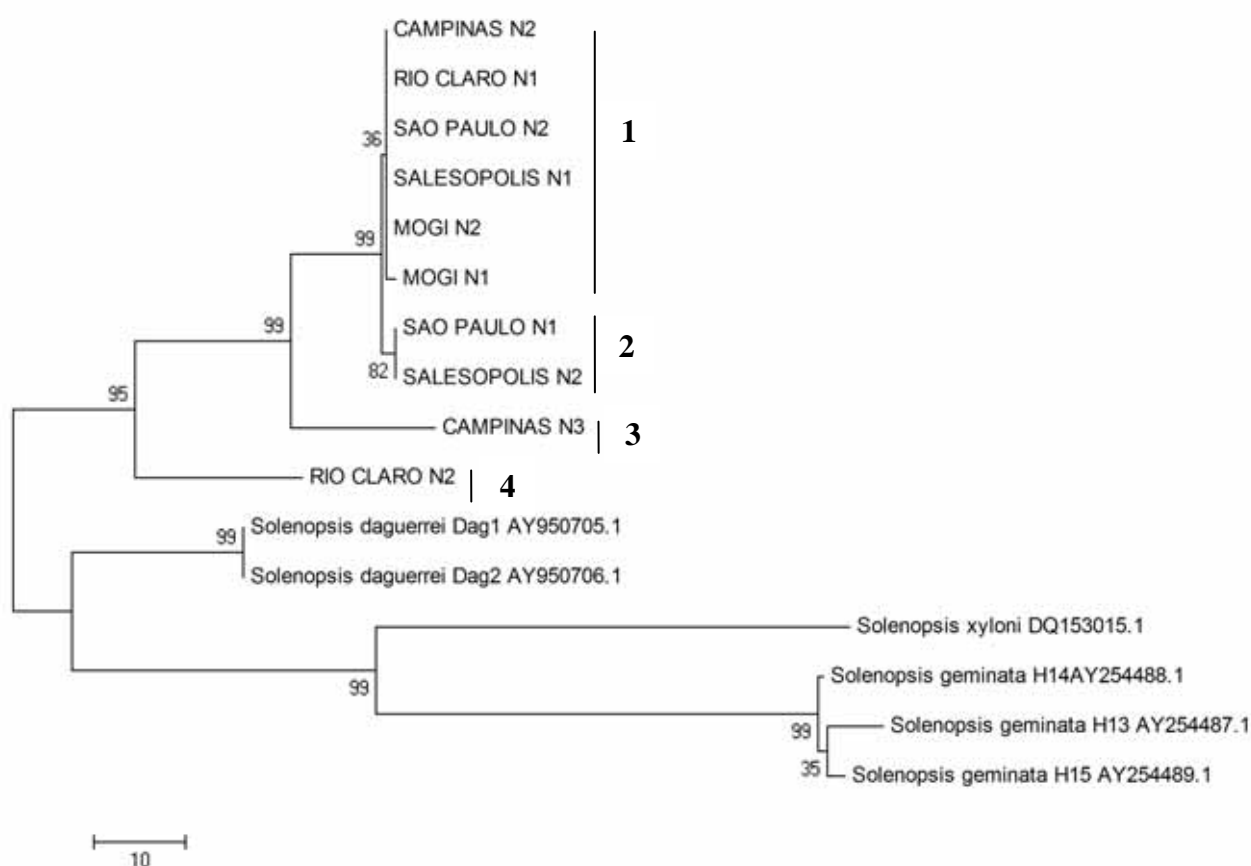


Figura 10: Análise de Máxima Parcimônia com as sequências de mtDNA – COI dos ninhos coletados nas cidades descritas realizada com o software Mega 4.0. As sequências utilizadas para o enraizamento e comparação com grupo externo foram retiradas do GenBank, como mostra os números de identificação a frente das sequências. A análise de bootstrap foi conduzida com 2000 réplicas.

Os trabalhos de Ross e Shoemaker (2005) e Ross et al. (2007) demonstraram que o nível de estruturação regional de *mtDNA* é comum em *S.invicta*, e que a deriva genética ou seleção local pode gerar diferenças que resultam em linhagens diferentes de haplótipos mitocondriais.

Embora a dimensão de amostragem tenha sido menor, os resultados vistos aqui neste estudo também podem ser decorrentes de diversos fatores como indicado por Shoemaker; Ahrens e Ross (2006). Entretanto, seria mais correto dizer que estruturação filogeográfica e formação de espécies crípticas não podem ser evidenciadas por uma amostragem deste porte. Mas, pode-se argumentar que esses agrupamentos existentes entre os dez ninhos indicam linhagens divergentes de haplótipos mitocondriais. Além disso, essa análise pode revelar um cenário de

dispersão de fêmeas, onde possivelmente a linhagem ancestral do grupo 1 teve um maior sucesso na dispersão de suas subseqüentes gerações de fêmeas.

Outro fator importante é referente ao local de coleta dos ninhos. Todos os ninhos foram coletados em áreas urbanas, e isso pode indicar a interferência do homem na dispersão destas linhagens matrilineas. Todas as cidades amostradas estão interligadas por rodovias estaduais, o que provavelmente influenciou na dispersão natural das fêmeas.

Considerando o fato da interferência do homem na dispersão das fêmeas, e a interconexão entre as cidades amostradas por rodovias estaduais, os ninhos de Campinas N2, Rio Claro N1, São Paulo N2, Salesópolis N1, Mogi N2 e Mogi N1 podem ter um mesmo ponto de origem, o que explicaria a junção destes haplótipos em um único grupo. Esses argumentos também podem ser extrapolados para o grupo 2, São Paulo N1 e Salesópolis N2.

4.5 – Análise da Poliginia

A análise de dois conjuntos de primers para inferir poliginia nos dez ninhos de *S. invicta*, revelou que nenhum ninho era poligínico. Esta análise é capaz de identificar o genótipo Bb do gene *GP-9* que é característico de formigas que aceitam outras rainhas em seus ninhos. A análise do *mtDNA* de cinco formigas de cada ninho também demonstrou que não existe haplótipos diferentes nos ninhos analisados, sendo assim, aparentemente os ninhos são governados por uma única rainha reprodutiva.

Embora esses primers sejam capazes de identificar formigas com genótipo poligínico (Bb), talvez eles não sejam capazes de identificar diferentes formas de poliginia como a oliginia, onde rainhas coexistem mas ficam separadas umas das outras em câmaras diferentes no ninho (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). A maioria dos estudos realizados com esses primers foram realizados com populações introduzidas de *S. invicta*.

Apesar de Brasil e a Argentina possuírem vastos territórios e muitos dos trabalhos publicados e hipóteses formuladas sobre a biologia do gênero *Solenopsis* foram realizados com amostras oriundas dos mesmos pontos de coletas. Até o momento não se conhece outras formas de poliginia que possam existir em *S. invicta*, e grande parte dos limites geográficos de sua ocorrência não foram

analisados. Por conta disso, não existe conhecimento sobre outras variantes dos alelos do gene *GP-9*. Ross et al. (2007) argumentaram que as populações brasileiras são geneticamente e evolutivamente diferentes e mostram claramente que são entidades reprodutivamente isoladas e que existe pronunciada diferenciação regional entre as populações brasileiras.

Esses argumentos reforçam a hipótese de que podem existir formas de poliginia onde os primers descritos não conseguem detectar.

4.6 – Análise de microssatélites e inferência de macho

O resultado da análise dos oito locos de microssatélites é mostrado no Apêndice I. As tabelas contêm a informação do genótipo referente a todos os locos para cada formiga e uma inferência dos possíveis machos que compõem a prole de cada ninho. Para cada cidade também existe uma tabela com informações sobre a frequência dos alelos nos oito locos de microssatélites.

A análise dos genótipos revelou que em alguns ninhos existe um problema molecular ou mesmo um erro de genotipagem em determinados locos. Este erro quando encontrado está indicado em amarelo e uma legenda indicativa. A falta da legenda indica que não houveram erros encontrados no ninho. Nos ninhos com mais de um macho parental as cores azul e vermelha foram utilizadas para diferenciar os genótipos.

A tabela 4 do apêndice I, mostra que o ninho 2 de Campinas contém um erro no Locus Sol49, no qual somente um alelo **152** foi encontrado. Este fato pode significar possível erro na genotipagem devido a artefatos de amplificação, conhecidos como Stutters. Neste ninho foi inferido somente o genótipo de um macho, que está representado abaixo da tabela 4. Acredita-se que somente um casal compõe este ninho, uma vez que na descrição da biologia do gênero *Solenopsis* macho e fêmeas são monogâmicos. A tabela 5 contém a frequência de cada alelo nos oito locos de microssatélites.

A tabela 6 do apêndice I, aponta o genótipo de todas as formigas analisadas para os oito locos de microssatélites do ninho 3 de Campinas. Aparentemente nenhum problema foi encontrado nos locos, e foi inferido o genótipo um macho parental representado abaixo da tabela 6. A tabela 7 indica a frequência dos alelos em cada loco analisado.

A tabela 8 do apêndice I, contém os genótipos das formigas analisadas do ninho 1 de Mogi das Cruzes. A análise sobre o locus Sol20 mostra que uma formiga possui um alelo (**123**) que não é encontrado em nenhuma outra que foi analisada no ninho. Possivelmente este alelo deve ser um stutter que interferiu na genotipagem do locus.

No locus Sol42 possivelmente existe um erro no genótipo das formigas analisadas, uma vez que o locus possui 2 alelos (**111** e **119**) mas aparentemente não existem heterozigotos. Cada formiga é homozigota para um ou outro alelo, e esse cenário não é compatível com a análise dos outros sete loci. Essa incompatibilidade entre os loci é evidenciada na análise dos genótipos dos possíveis machos parentais. Caso os genótipos do locus Sol42 fossem considerados, teríamos possivelmente dois machos idênticos em alelos nos outros sete loci e diferentes somente no locus Sol42. Uma possibilidade para este erro seria a presença de alelos nulos (CALLEN et al., 1993; SCHREMPF et al., 2005), que estariam impedindo a verificação correta dos genótipos. Essa hipótese é reforçada quando notamos que em cinco formigas analisadas não foi possível saber o genótipo de um ou ambos os alelos. A tabela 9 contém a frequência dos alelos nos loci analisados.

A tabela 10 apêndice I, indica os genótipos das formigas do ninho 2 de Mogi das Cruzes. No locus Sol18, o alelo **127** aparece apenas uma vez e possivelmente seja um stutter que foi erroneamente genotipado. Aparentemente outros erros não foram encontrados nos outros loci e a análise mostra que a prole possivelmente possui apenas um macho parental. A tabela 11 contém a frequência dos alelos nos loci analisados.

A tabela 12 do apêndice I, contém os genótipos das formigas do ninho 1 de Rio Claro. Nos loci Sol20, Sol42 e Sol49 existem erros de genotipagem ou algum problema no genoma da(s) formiga(s). No locus Sol06 o alelo (**111**) aparece uma única vez e por isso pode ser caracterizado como stutter. Da mesma maneira, no locus Sol42, os dois alelos observados, **99** e **129**, aparecem uma vez cada, indicando a possibilidade de stutters.

No processo de genotipagem os alelos são denominados de acordo com o seu tamanho no genoma. Existe uma diferença de tamanho entre os alelos considerados stutters (**99** e **129**) e os alelos mais frequentes no locus. As diferenças

entre os alelos são: 99 e 115 = 16 pares de base, 99 e 121 = 22 pares de base, 129 e 115 = 14 pares de base, 129 e 121 = 8 pares de base. Todos os microssatélites utilizados neste projeto são dinucleotídicos, logo, cada dois pares de base correspondem uma unidade de medida, sendo assim a diferença entre os alelos são: 8 unidades, 7 unidades, 11 unidades e 4 unidades respectivamente. Os stutters são caracterizados por serem uma unidade de medida menor que os alelos encontrados. Apesar do alelo **99** não ter uma unidade de diferença ele poderia ser considerado como stutter, mas, o alelo **129** não.

O trabalho de Sia; Robertson e Petes (1997), relaciona diversos mecanismos que podem interferir na manutenção de microssatélites, e conseqüentemente o surgimento de novos alelos. Como todos os “**stutters**” estão de acordo com a unidade de medida dos locos de microssatélites utilizados, não se pode descartar a hipótese da instabilidade do genoma que conseqüentemente fez surgir esses novos alelos. A análise minuciosa desses alelos deve ser feita através do sequenciamento, e então verificar sua veracidade.

Não se pode descartar ainda a hipótese de que os primers utilizados para este locus foram inespecíficos e as sequências de DNA **99** e **129** podem ser consequência da amplificação dessas regiões. Essas extrapolações podem também ser levadas para o locus Sol49, o qual exibe três possíveis stutters: **142**, **156** e **162**. Mesmo diante da possibilidade de stutters, o ninho 1 de Rio Claro aparentemente possui um macho parental, o que leva a inferência de somente um casal formador deste ninho. A tabela 13 contém a frequência dos alelos dos locus analisados neste ninho.

Todas essas hipóteses apresentadas para o ninho 1 de Rio Claro podem ser sugeridas para os outros ninhos analisados neste estudo.

A tabela 14 do apêndice I, indica os genótipos das formigas analisadas do ninho 2 de Rio Claro. Nesse ninho foi inferido dois machos parentais, o provável genótipo de ambos está representado abaixo da tabela 14. Os genótipos dos machos parentais foram destacados em azul e vermelho para as formigas 340C1 e 347C1 respectivamente. Cada macho cruza com uma fêmea, então, temos dois possíveis casais em um mesmo ninho. Entretanto esse resultado é inconsistente com a análise de poliginia, uma vez que os dois conjuntos de primers mostraram que todos os ninhos são monogínicos.

Mas, como discutido na seção 4.5 sobre a poliginia, os primers descritos provavelmente não foram eficientes em detectar outra forma de poliginia. É possível que rainhas com o genótipo BB para o gene *GP-9*, coexistem em um mesmo ninho, formando um grupo familiar mais complexo como explicado pela Oliginia.

Outra possibilidade para esse resultado é o cruzamento de uma única fêmea com dois machos, conhecido como poliandria. Essa característica é conhecida em muitos gêneros de formigas (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990), entretanto nenhum relato desta característica foi descrito para *S. invicta*, sendo a monoandria característica desta espécie (TSCHINKEL, 2006). Mas, como dito anteriormente, muitos trabalhos sobre a biologia de *S. invicta* foram realizados com poucas ou com as mesmas amostragens de populações nativas, e em sua grande maioria os trabalhos foram realizados com populações introduzidas. Mais estudos devem ser realizados com populações nativas de *S. invicta* para verificar se essas características até o momento descritas são prevalentes nesta espécie, ou se existem características que não foram descobertas até o momento. A tabela 15 indica a frequência dos alelos dos loci analisados.

A tabela 16 do apêndice I, contém os genótipos das formigas analisadas do ninho 2 de Salesópolis. Esse ninho apresenta também a possibilidade de dois machos parentais. As hipóteses do ninho 2 de Rio Claro, tabela 14 do apêndice I também podem ser extrapoladas para esse ninho. Esse ninho apresenta a possibilidade de alelos nulos nos loci Sol6 e Sol55, além de erros de genotipagem no locus Sol49. As hipóteses apresentadas para o ninho 1 de Mogi das Cruzes, tabela 8 do apêndice I e ninho 1 de Rio Claro, tabela 12 do apêndice I, também podem ser extrapoladas para esse ninho. A tabela 17 indica a frequência dos alelos dos loci analisados.

A tabela 18 do apêndice I, contém o genótipo das formigas do ninho 1 de Salesópolis. Esse ninho possui somente um macho parental, e aparentemente nenhum erro ou problema com os loci foi identificado. A tabela 19 indica os alelos dos loci analisados.

A tabela 20 do apêndice I, contém o genótipo das formigas do ninho 2 de São Paulo. A análise de possíveis machos parentais revelou seis genótipos. A tabela foi evidenciada com cores para mostrar as formigas que carregavam os genótipos dos possíveis machos. Esse resultado também é contraditório com a análise de poliginia através de primers descritos. Esse ninho também foi descrito como monogínico,

entretanto, como já foi dito antes, essa pode ser uma forma de poliginia a qual os primers são ineficazes de diagnosticar. Para verificar a veracidade dos alelos observados, nós escolhemos o locus mais polimórfico deste ninho, no caso o Sol55, com sete alelos, e analisamos minuciosamente. Os alelos foram clonados em bactérias competentes através de um kit comercial da Fermentas Life Sciences denominado CloneJET PCR Cloning Kit, e posteriormente foram sequenciados. Esse procedimento foi necessário por dois motivos: (1) Verificar se essas sequências eram realmente alelos, ou eram produtos de anelamento inespecífico dos primers (2) Verificar se esses alelos não eram produtos de híbridos entre *S. invicta* e outras espécies do gênero *Solenopsis*.

Para verificar os produtos de clonagem e sequenciamento, uma sequência do GenBank referente ao locus Sol55 (AF002236.1) foi comparada com as sequências obtidas. O resultado do sequenciamento é mostrado no Anexo II. Todas as sequências obtidas foram confirmadas para regiões de microsatélites de *S. invicta*. A comparação entre as sequências obtidas com a sequência do Genbank revelou somente algumas diferenças nucleotídicas (destacadas em laranja), mas no que concerne a sequência de microsatélite, todas as sequências possuíam as regiões **TC** como descritas por Krieger e Keller, (1997). A sequência do GenBank está nomeada como **GB** para não atrapalhar o alinhamento com outras sequências. As diferenças nucleotídicas existentes entre a região que antecede os microsatélites, podem indicar que sua origem não provém de uma única linhagem familiar, ou seja, provavelmente existem fêmeas que não são relacionadas convivendo no mesmo ninho.

A análise do sequenciamento dos sete alelos do locus Sol55 mostrou que o erro de genotipagem foi de um par de base para mais ou para menos, sendo então suas sequências e respectivos alelos a seguinte: sequência **146** – genotipado como alelo **147**; sequência **150** – genotipado como alelo **149**; sequência **152** – genotipado com alelo **153**; sequência **154** – genotipado como alelo **155**, sequência **158** – genotipado como alelo **157**; sequência **160** – genotipado como alelo **161**; sequência **164** – genotipado como alelo **163**. Além dos sete alelos esperados outro alelo foi encontrado, sua sequência **166**, está destacada em vermelho no alinhamento do anexo II. Esse alelo não foi genotipado em formiga alguma desse ninho, e seu achado foi totalmente inesperado. O DNA de quatro formigas heterozigotas para o locus Sol55 foi utilizado para a separação dos sete alelos, e somente um alelo se

repetia duas vezes sendo ele encontrado em duas formigas diferentes. O trabalho de Sia; Robertson e Petes, (1997), relata alguns mecanismos que podem dar origem a novos alelos nos seres vivos, entretanto a sequência **166** parece ser um processo totalmente diferente. Uma possibilidade para isto é de uma única ou poucas sequências **166** estar no genoma de alguma destas formigas analisadas devido ao processo de “crossing-over”. Provavelmente o baixo número de cópias desta sequência não possibilitou a sua correta genotipagem.

Não se pode descartar que essa sequência encontrada deve ter sido considerada como stutter, uma vez que não se repetiu em outras formigas. Mas o que está claro com estes resultados é que de alguma forma uma das quatro formigas possuía mais que dois alelos em seu genoma.

O trabalho de Krieger et al., (1999) evidencia a possibilidade de operárias triplóides, em decorrência de cruzamento entre rainhas e machos diplóides em ninhos poligínicos. Diante da inesperada sequência **166** que é um alelo de microssatélite do locus Sol55, não podemos descartar a possibilidade de uma das quatro formigas deste ninho ser triplóide. Caso essa possibilidade seja extrapolada para o ninho todo, isto explicaria o grande número de alelos encontrado nos locos analisados. A verificação dos machos parentais levou em consideração a haploplóidia destes, entretanto se um ou mais machos forem diplóides esses dados de possíveis machos estão incorretos e o ninho pode ter menos casais. A tabela 21 contém a frequência dos alelos dos locos analisados.

4.7 - Relacionamento genético (r) intra-colonial

O relacionamento genético entre pares de todos os ninhos foi realizado pelo software Spagedi (HARDY; VEKEMANS, 2002). A média de cada ninho foi calculada e o resultado é indicado na tabela 24 do apêndice I. Os valores observados evidenciam uma contradição entre as análises de microssatélites e o relacionamento genético.

De acordo com o trabalho do Hamilton (1964), o mais alto grau de relacionamento genético entre irmãs plenas, filhas de macho haplóides é 0,75. Entretanto características como a poliginia e a poliandria podem diminuir esse valor de relacionamento genético. O trabalho de Keller (1995), mostra um tabela com baixos valores de relacionamento genético entre rainhas e entre operárias de ninhos

poligínicos. O trabalho de Sumner et al. (2004), evidencia que a poliandria em *Acromyrmex echinator* diminui o relacionamento genético entre operárias do mesmo ninho. A tabela 4-1 do capítulo 4 do livro “The Ants” de Hölldobler e Wilson, (1990), evidencia o grau de relacionamento genético de diversas espécies de formigas de acordo com a sua organização social (monogínica ou poligínica) e o número de cruzamentos. A análise desta tabela revela que em ninhos poligínicos com múltiplos cruzamentos, o nível de relacionamento genético entre operárias não é negativo. O trabalho de Ross et al. (1997), aponta que populações nativas e introduzidas de *S. invicta* possuem níveis de relacionamento genético muito diferentes conforme sua organização social. Ninhos monogínicos obtiveram resultados de relacionamento genético muito similar ao proposto por Hamilton (1964), com valores variando entre $r=0,71$ e $r=0,76$, enquanto que ninhos poligínicos nativos e introduzidos obtiveram valores variando entre $r=0,21$ e $r=0,46$. O trabalho de Goodisman e Hahn (2005) com *Camponotus festinatus* também mostrou valores de relacionamento muito próximos ao proposto por Hamilton (1964), uma vez que esta espécie é monogínica e monoandrica. Valores de relacionamento genético em ninhos poligínicos próximo de zero são encontrados no trabalho de Goodisman e Ross (1997). Os autores atribuem esse baixo valor de relacionamento genético a rainhas não relacionadas que compõem o ninho.

O trabalho de Tsutsui e Suarez (2003) indica que a média de relacionamento genético em populações introduzidas de *Linepithema humile* são muito próximas a zero. O trabalho de Paxton et al. (1996), com a abelha *Andrena jacobii*, aponta baixos valores de relacionamento genético, mas, muitos deles não são significativamente diferente de zero. Os autores também relacionam o baixo valor de relacionamento genético a rainhas não relacionadas que compõem o ninho.

O resultado da análise mostra que o ninho de Campinas N2 e o ninho 2 de São Paulo possuem valores positivos para o relacionamento genético. Entretanto, somente o ninho 2 de Campinas está de acordo com as análises de microssatélites, uma vez que foi inferido que o ninho possuía um casal parental. Sendo assim a média de $r= 0,88$ pode representar este tipo de ninho. O ninho 2 de São Paulo possivelmente possui seis casais parentais, o que está totalmente em desacordo com a média de relacionamento genético ($r= 1$). Como visto pelos exemplos de outros trabalhos, a poliginia diminui o nível de relacionamento de um ninho. O valor igual a 0 para a média de relacionamento genético do ninho 2 de Mogi das Cruzes

também está em desacordo com as análises de microssatélites, uma vez que foi inferido que esse ninho possuía somente uma casal parental.

Os valores negativos da média de relacionamento genético dos outros ninhos analisados estão em desacordo com a análise de microssatélites. Embora os trabalhos citados anteriormente indiquem claramente que a poliginia ou a poliandria diminuem o valor de relacionamento genético dentro de um ninho, os valores não foram expressivamente negativos como os encontrados neste estudo.

A análise sobre microssatélites revelou que os ninhos de Mogi das Cruzes N1 e Salesópolis N2 possuíam algum erro molecular em um ou mais locos de microssatélites. Esses erros poderiam ser decorrentes de alelos nulos que estariam interferindo na genotipagem e conseqüentemente na análise de relacionamento genético. Todas as hipóteses inferidas na análise de microssatélites podem ser consideradas neste resultado de relacionamento genético. Os resultados do relacionamento genético provavelmente são conseqüências dos problemas moleculares inferidos.

O resultado negativo de relacionamento genético também pode ser conseqüência de uma característica comportamental e ecológica. O trabalho de Wenseleers et al. (2010) com abelhas *Melipona scutellaris* aponta que os valores negativos de relacionamento genético é devido a infiltração de operárias estrangeiras nos ninhos analisados. O autor usa o termo “alien” para identificar essas operárias que não são relacionadas, mas que estavam no ninho no momento da amostragem.

Os ninhos de formigas podem ser monodômicos, quando a colônia está em um único local, ou polidômicos, quando a colônia é dividida em um ou mais ninhos cada um com uma rainha (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Provavelmente os ninhos satélites são conectados ao ninho principal e conseqüentemente existe movimento de operárias entre os ninhos. Provavelmente o ato da amostragem de ninhos para este estudo deve ter levado operárias pertencentes aos ninhos satélites, e isto poderia explicar os valores negativos de relacionamento genéticos encontrados. A figura 13 do apêndice III demonstra o movimento de operárias entre os ninhos satélites e o principal. Essa característica pode ser considerada como uma forma de poliginia - Oliginia, já citada anteriormente.

Outra possibilidade para esses valores é que o Software Spagedi não foi eficiente para inferir o relacionamento genético e algum conflito de programação

pode ter interferido nas análises. Mas, embora o programa tenha muitas estimativas para medir o grau de relacionamento genético, a estimativa de Queller e Goodnight (1989) leva em consideração organismos haplodiplóides, como é o caso dos insetos sociais. Essa hipótese de conflito do software é pouco provável, pois o trabalho de Alves et al. (2010), utiliza o mesmo programa para medir o relacionamento em ninhos da abelha *Melipona quadrifasciata* através da estimativa de Queller e Goodnight (1989). Diante desses resultados, pode-se dizer que possivelmente existe algum desvio seja molecular ou comportamental que esteja interferindo nas análises.

Entretanto, os resultados obtidos neste estudo podem estar refletindo uma nova situação na análise do comportamento reprodutivo e social de *S. invicta*. Como dito anteriormente alguns autores demonstram que populações brasileiras dessa formiga são evolutivamente e regionalmente independentes. Esse argumento dá suporte a ideia de que possivelmente muitas características do comportamento social de populações nativas estão incógnitas. Sendo assim, não se pode descartar a hipótese de que esse estudo esteja refletindo um processo comportamental na biologia reprodutiva que até o momento não foi observado.

4.8 - Verificação da infecção pelo endossimbionte *Wolbachia*

A infecção pelo endossimbionte *Wolbachia* variou entre as cidades amostradas. Rio Claro teve ambos os ninhos amostrados infectados pelo endossimbionte. Por outro lado, não foi detectado infecção nos ninhos da cidade de São Paulo. As cidades de Salesópolis, Mogi das Cruzes e Campinas continham um ninho infectado. Cerca de 30 formigas de cada ninho foram analisadas para a detecção de *Wolbachia*.

A porcentagem de infecção dos ninhos analisados foi de 50%. Além disso, o nível de prevalência de *Wolbachia* dentro dos ninhos variou de 10% a 100 % das formigas analisadas (fig. 10).

Ahrens e Shoemaker (2005) pressupõem que a diferença no nível de prevalência *Wolbachia* pode ser decorrente de fatores ambientais, bem como de fatores intrínsecos do hospedeiro.

Em alguns casos como mostrado na figura 10, houve nítida variação na qualidade da amplificação entre as diferentes formigas analisadas. As análises

foram repetidas e o resultado não se alterou. A quantidade de DNA utilizada para as ampliações foi a mesma para todas as amostras.

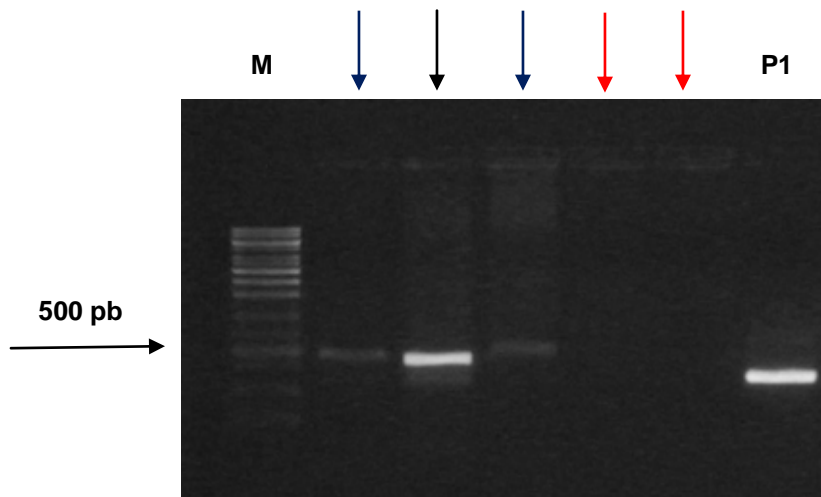


Figura 10: Amplificação do gene *wsp* de *Wolbachia* visualizada em gel de agarose 1%. As setas vermelhas indicam ausência do endossimbionte em formigas, as setas azuis indicam baixa intensidade da banda a seta preta indica alta intensidade da banda. (P1) controle positivo de *Wolbachia*.

4.9 - Análise Similaridade do gene *wsp* de *Wolbachia*

As sequências do gene *wsp* dos ninhos infectados foram alinhadas e comparadas com sequências depositadas no NCBI através da ferramenta BLAST. A figura 11 indica os ninhos infectados por *Wolbachia* de cada cidade analisada, o símbolo (P) que está logo após o nome das cidades juntamente com um número, aponta qual ninho está infectado.

As sequências dos ninhos de Salesópolis, Rio Claro e Campinas tiveram 99% de identidade com a sequência de *Wolbachia* de *S. invicta*, especificamente do grupo A e subgrupo *InvA* (wSinivictaA–AF243435.1).

A sequência obtida de Mogi das Cruzes apresentou 99% de identidade com a sequência de *Wolbachia* de *Acromyrmex insinuator*, especificamente do grupo B (*Wolbachia* endosymbiont B2 of *A. insinuator*-AF472560).

As sequências dos EUA, cedidas pelo professor Dr. Shoemaker, apresentaram 99% de identidade com *Wolbachia* de *S. invicta*, especificamente do grupo B e subgrupo *InvB* (wSinivictaB–AF243436.1). As demais amostras cedidas tiveram 99% de identidade com *Wolbachia* de *S. invicta*, especificamente do grupo A e subgrupo *InvA* (wSinivictaA–AF243435.1). Três amostras pertencentes ao nosso

grupo de pesquisa revelaram 99% de identidade com o tipo A – *InvA*, e outras 2 (duas) amostras tiveram 99% de identidade com o tipo B de *A. insinuator* (fig. 13). Nenhum ninho apresentou mais de uma infecção pelo endossimbionte. O cladograma representado na figura 11 refere-se à análise de Neighbour-joining.

A análise da similaridade revelou que não há distinção entre as sequências de *Wolbachia* de *S. invicta* do subgrupo *InvA*. As amostras de todos os ninhos analisados formam uma politomia com as sequências cedidas pelo Dr. Shoemaker, com as novas sequências obtidas e também com as sequências depositadas no GenBank. Essa falta de resolução é refletida pelo baixo valor de bootstrap. As amostras de *Wolbachia* de *Linepithema humile* (LinH) também estão inseridas no subgrupo *InvA* e as sequências de *S. saevissima* (SS1 e SS2) formam um grupo próximo com as sequências *InvA*. As sequências do grupo A das outras espécies de *Solenopsis* ficam distantes do grupo *InvA* e formam três distintos grupos. Diante desses resultados pode-se dizer que as *Wolbachia* encontradas nos ninhos analisados são muito similares as da Argentina; a distância geográfica não influenciou na diferenciação da *Wolbachia*.

Uma hipótese sobre o compartilhamento do mesmo subgrupo *InvA* por espécies diferentes, seria que esse grupo teria adquirido uma alta capacidade de propagação em diferentes espécies de formigas, e também eliminada a característica de especialização para cada espécie hospedeira, aumentando em número e proporção o ambiente de sobrevivência desse subgrupo. Dedeine et al. (2005) e Van Borm et al. (2003) demonstram que outras espécies dos gêneros *Solenopsis*, *Acromyrmex* e a espécie *Linepithema humile* compartilham o subgrupo *InvA* de *Wolbachia*. Os resultados do presente estudo corroboram a hipótese da perda de especialização e obtenção de alta capacidade de propagação desse subgrupo em formigas. Como descrito por Tsutsui et al. (2003), as cepas de *Wolbachia* de formigas do Novo Mundo são similares entre si, mas diferem de cepas que ocorrem em outros grupos de insetos.

A transmissão horizontal através de parasitas sociais poderia explicar o compartilhamento do subgrupo de *Wolbachia* entre espécies de um mesmo gênero como sugerido por Dedeine et al. (2005). Mas de acordo com Van Borm et al. (2003) o compartilhamento de subgrupos de *Wolbachia* entre gêneros diferentes de formigas pode ser decorrente de parasitóides como as espécies de moscas do gênero *Pseudacteon* ou vespas da Família Diapriidae. Também argumentam que

essa frequente distribuição de subgrupos pode ter sido derivada de uma adaptação fisiológica do endossimbionte em parasitar especificamente formigas. Dale e Moran (2006) argumentam que simbioses facultativos como a *Wolbachia* possuem mecanismos específicos para invasão e estabelecimento em novos hospedeiros.

A infecção por um grupo com características muito próximas ao subgrupo *InvA* poderia explicar a proximidade das sequências *SS1* e *SS2* de *S. saevissima*. Outros grupos de *Wolbachia* do tipo A também são formados no cladograma (fig. 11), o que pode ser resultado de diversos eventos que acompanham a biologia e a história evolutiva das espécies como: transmissão horizontal, transmissão vertical, perda e reintrodução da infecção, estruturação de populações, comportamentos distintos, expansão e irradiação de populações para outros habitats.

A análise do subgrupo *InvB* de *Wolbachia* mostra uma semelhança com os resultados encontrados no subgrupo *InvA*, nos quais diferentes espécies de *Solenopsis* e *Linepithema humile* compartilham praticamente o mesmo endossimbionte. Como citado acima por Dedeine et al. (2005) e Van Borm et al. (2003), diferentes espécies de *Acromyrmex*, *Solenopsis* e *Linepithema humile* compartilham o mesmo subgrupo *InvB* de *Wolbachia*. Os subgrupos *InvA* e *InvB* pertencem ao grupo de cepas específicas de formigas do Novo Mundo (TSUTSUI et al., 2003), o que pode explicar a semelhança na ampla distribuição desses dois subgrupos em formigas. A capacidade de não se especializar em novos hospedeiros pode ter surgido mais de uma vez nas cepas do Novo Mundo. A alta diversidade de espécies simpátricas de formigas encontrada na América do Sul pode ter desencadeado essa característica. O gasto energético para se especializar em cada hospedeiro poderia comprometer a sobrevivência do endossimbionte, e as vantagens de não se especializar seria ampliar exponencialmente seu local de sobrevivência, que é o ambiente intracelular dos hospedeiros. Isto explicaria o compartilhamento dos mesmos subgrupos de *Wolbachia* por diversos grupos de formigas do Novo Mundo.

A aquisição da cepa de *Wolbachia* do tipo B de *Acromyrmex insinuator* é uma observação nova, visto que no trabalho de Van Borm et al. (2003) há o relato de aquisição do subgrupo *InvB* pelas espécies de cortadeiras analisadas. Pode-se observar que foram três locais onde essas sequências apareceram, Mogi das Cruzes P1, Pinciguaba P1 e Registro P1. A espécie *Acromyrmex insinuator* é um parasita social de *Acromyrmex echinaior*, e as duas foram elevadas a categoria de

espécie pela revisão taxonômica de Schultz et al. (1998), e até o presente momento nenhum parasita social *A. insinator* foi encontrado em ninhos de outras espécies de *Acromyrmex*.

O trabalho de Bekkevold; Boomsma (2000) sobre a biologia de *A. insinator* demonstra que esse parasita social utiliza da energia produzida pelo ninho (jardim de fungos) para a produção de formas reprodutivas, que possuem a característica de vôo nupcial. Van Borm et al. (2001) demonstra que as formas reprodutivas de *A. insinator* portam as cepas A e B de *Wolbachia*. Essas informações sobre a biologia do parasita social podem ajudar a entender como houve a transmissão do endossimbionte para *S. invicta*.

Uma hipótese sobre a transmissão horizontalmente de *Wolbachia* de *A. insinator*, seria que uma das formas reprodutivas do parasita social, após o vôo nupcial, caiu sobre um ninho de *S. invicta* e serviu como fonte de alimento.

Outra hipótese sobre essa transmissão seria a presença de parasitóides, como as moscas do gênero *Pseudacteon* ou vespas da Família Diapriidae. Não deve ser descartada a probabilidade do parasita social *A. insinator* entrar em contato com populações simpátricas de *S. invicta*, e ser uma via de transmissão de *Wolbachia*. Outra possibilidade seria que o parasita social de *S. invicta*, *S. daguerrei* ao interagir com populações simpátricas de *A. echinator* ocorre à transmissão da cepa de *Wolbachia* para *S. invicta*. A proximidade da cepa de *S. daguerrei* B1 com as sequências do parasita social *A. insinator* dá suporte ao argumento de interação entre esses gêneros de formigas.

Até o presente momento nenhuma outra espécie de *Acromyrmex* compartilhou a cepa B2 de *Wolbachia* de *A. insinator*. Entretanto a ocorrência de simpatria entre espécies de *Acromyrmex* e *Solenopsis* pode facilitar a transmissão horizontal do endossimbionte. O fato de não haver relatos sobre outras espécies de *Acromyrmex* portando essa cepa de *Wolbachia* não exclui a possibilidade de ela existir. Essa observação de simpatria pode ser extrapolada para os grupos *InvA* e *InvB* onde também há diversas espécies simpátricas portando os mesmos simbiossiontes.

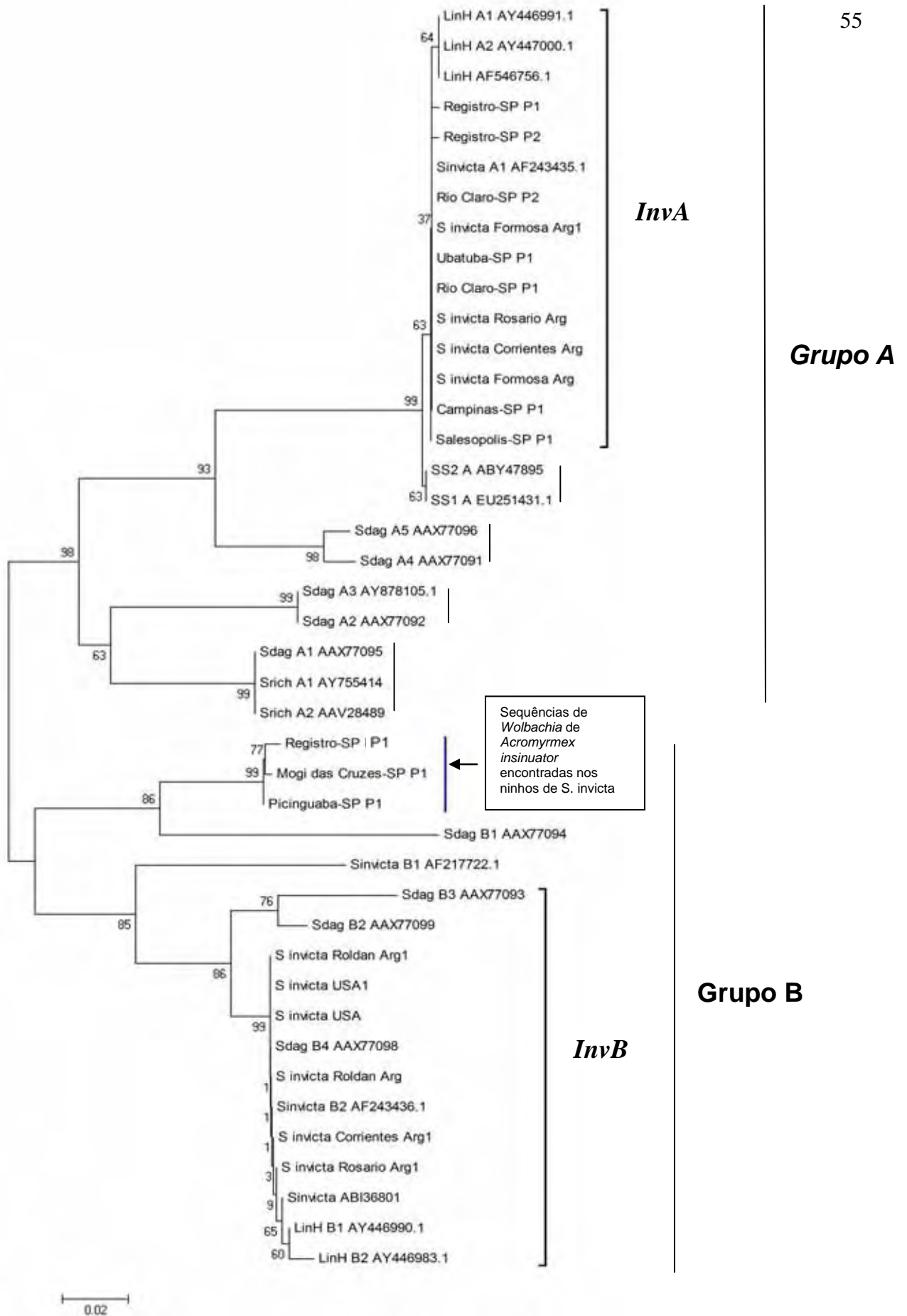


Figura 11: Análise de similaridade do gene *wsp* de *Wolbachia* realizada através do método Neighbour-Joining. As distâncias dos ramos foram calculadas utilizando parâmetro 2 Kimura através do software Mega 4.0. Os valores de bootstrap (2000 réplicas) são mostrados anteriormente ao nodo.

4.10 - Análise do WSP Typing

O resultado da comparação das sequências obtidas de *S. invicta* e o restante das sequências do subgrupo *InvA*, com o banco de dados The *Wolbachia wsp* database está representado pela tabela 2.

As regiões hipervariáveis das sequências de *S. invicta* analisadas neste estudo foram idênticas aos alelos: 42 (HVR1), 43 (HVR2), 198 (HVR3) e 25 (HVR4). As sequências cedidas pelo Doutor Shoemaker e as sequências retiradas do NCBI e EBI tiveram resultados parciais nos dois primeiros alelos e também no último. Os resultados parciais observados podem ser decorrentes de mutações pontuais que existem nas sequências que podem ter interferido na identidade dos alelos. Outra possibilidade é que as sequências não tenham o tamanho adequado para análise, o que pode ser visualizada no alelo 4, onde o resultado parcial mostra diversas possibilidades de alelos.

A análise sobre o alelo 42 da HVR1 revela que foi encontrado em variantes de *Wolbachia* de hospedeiros como formigas do gênero *Pheidole* e também formigas do gênero *Dorymyrmex*. Este alelo é pertencente ao supergrupo A de *Wolbachia* e é compartilhado por todo o subgrupo *InvA* como visto na Tabela 2. O alelo 43 da HVR2 é encontrado nos mesmos hospedeiros e também pertence ao mesmo supergrupo que o alelo 42 da HVR1.

O alelo 198 da HVR3 do *wsp* de *Wolbachia* apresentou correspondência com sequências do banco de dados. Uma análise minuciosa revelou que até o presente momento esse alelo não foi encontrado em nenhum hospedeiro, e isto pode ser resultado da falta de depósitos no banco de dados The *Wolbachia wsp*, pois as sequências retiradas do NCBI e EBI possuem também este alelo. As datas de depósitos no NCBI e EBI de algumas sequências de *Wolbachia* de *S. invicta* possuem quase uma década.

A análise do alelo 25 da região hipervariável 4 do *wsp* de *Wolbachia* (HVR4) mostra que é compartilhado por organismos pertencentes a ordens Hymenoptera e Diptera. As formigas do gênero *Solenopsis*, *Camponotus*, *Polyrhachis*, *Pheidole* e *Dorymyrmex* são hospedeiras de *Wolbachia* com esse alelo. As vespas dos gêneros: *Polistes* e *Nasonia* também compartilham esse alelo de *Wolbachia*. No entanto, o banco de dados não contém descrição de organismos pertencentes a Ordem Diptera que compartilham este alelo. Nos três alelos anteriores não há descrição sobre o possível fenótipo que a *Wolbachia* pode causar. Entretanto

quando o alelo 25 da HVR4 é analisado, uma combinação de alelos específicos nas outras regiões hipervariáveis: 1(HVR1), 23 (HVR2), 15 (HVR3) mais o alelo 25 pode produzir o fenótipo de incompatibilidade citoplasmática em vespas do gênero *Nasonia*.

O conjunto de alelos do gene *wsp* de *Wolbachia* encontrados em ninhos de *S. invicta* demonstra claramente que as regiões hipervariáveis estão em estreita relação com os hospedeiros, em particular com formigas. Essa especialização pode facilitar a transmissão de um hospedeiro para o outro que possui fisiologia ou comportamento parecidos. Assim como dito na discussão da similaridade do gene entre as formigas, a simpatria de diversas espécies pode facilitar a disseminação entre formigas. Pode-se afirmar que as sequências obtidas juntamente com as outras que estão no subgrupo *InvA* compartilham pelo menos três alelos. Estes resultados corroboram estudos de Russel et al. (2009) e Tsutui et al. (2003), que demonstram que a *Wolbachia* encontrada em formigas são similares e diferem das encontradas em outros organismos.

A possibilidade de que a transmissão entre espécie simpátricas seja mediada por parasitóides como dípteros (gênero *Pseudacteon*) ou himenópteros (família Diapriidae) é demonstrada pelo compartilhamento do alelo 25 da HVR4. A combinação do alelo 25 da HVR4, juntamente com os outros alelos (42HVR1 e 43HVR2), pode fornecer um padrão adequado para hospedeiros inserido em um sistema ecológico, como formigas e parasitóides. Este padrão possibilitaria a livre disseminação e infecção de *Wolbachia* dentro do sistema, além disso, a transmissão horizontal de organismos que possuem este padrão de *wsp* em conjunto com a recombinação das regiões hipervariáveis pode ter influenciado para a formação e disseminação. Todas essas hipóteses podem ter acontecido em diferentes épocas e culminado no padrão visto nos estudos atuais.

Tabela 2: Caracterização dos alelos compartilhados das regiões hipervariáveis do gene *wsp* do subgrupo *InvA* de *Wolbachia*. O números de acessos são de sequências depositadas no NCBI e EBI.

Nome da sequência	Alelos H1/H2/H3/H4	Parcial H1	Parcial H2	Parcial H3	Parcial H4	Grupo ou Subgrupo de <i>Wolbachia</i>
Campinas SP-P1	42/43/198/25	-	-	-	-	<i>InvA</i>
Registro SP-P1	42/43/198/25	-	-	-	-	<i>InvA</i>
Registro SP-P2	42/43/198/25	-	-	-	-	<i>InvA</i>
Rio Claro SP-P1	42/43/198/25	-	-	-	-	<i>InvA</i>
Rio Claro SP-P2	42/43/198/25	-	-	-	-	<i>InvA</i>
Ubatuba SP-P1	42/43/198/25	-	-	-	-	<i>InvA</i>
Salesópolis SP-P1	42/43/198/25	-	-	-	-	<i>InvA</i>
Formosa – Arg.	-/-/198/-	42	43		205/204/190/189 188	<i>InvA</i>
Formosa – Arg.1	-/-/198/-	42	43		205/204/190/189 188	<i>InvA</i>
Rosário-Arg	-/-/198/-	42	43		205/204/190/189 188	<i>InvA</i>
Corrientes-Arg	-/-/198/-	42	43		205/204/190/189 188	<i>InvA</i>
LinH A AY446991.1	42/43/-/-	-	-	198	190/171/100/25	<i>InvA</i>
Lin H A AY447000.1	42/43/198	-	-	-	205/204/190/189/ 188	<i>InvA</i>
LinH A AF546756	42/43/198/25	-	-	-	-	<i>InvA</i>

Os resultados da comparação entre as sequências obtidas que estão alocadas no grupo *B* e as sequências do subgrupo *InvB* estão representados na tabela 3.

A análise sobre as três primeiras sequências de *Wolbachia* de *S. daguerrei* mostra que cada sequência possui um alelo da HVR1 diferente. A sequência *S. dagB2* possui o alelo 1, esse alelo é compartilhado com organismo das ordens Hymenoptera e Diptera. Nenhum gênero de formiga descrito no banco de dados compartilha este alelo, somente organismos dos gêneros *Aedes*, *Drosophila* e *Nasonia*. No subgrupo *InvA*, alelos compartilhados por outros organismos que não sejam formiga podem indicar uma transmissão horizontal dentro de um sistema

ecológico, o alelo 1 pode ser um indicativo desta transmissão. Esse alelo pode produzir fenótipos como: incompatibilidade citoplasmática e morte de machos.

A sequência SdagB3 possui o alelo 66 na HVR1, esse alelo é compartilhado com gêneros de formigas como: *Pheidole* e *Odontomachus*. Esse alelo não foi correlacionado com nenhum fenótipo causador de distúrbios reprodutivos, entretanto isso não significa que ele não seja causador, mas muito provavelmente as análises realizadas com organismos com esse alelo não foram suficientes para correlacionar com algum distúrbio.

A sequência SdagB4 compartilha o alelo 21 com todas as outras formigas do subgrupo *InvB* e as sequências obtidas neste estudo que estão no grupo B. A tabela 3 mostra que muitas das sequências possuem valores parciais para esta sequência, como dito anteriormente mutações pontuais e o tamanho da sequência pode ter produzido tal resultado. Esse alelo é compartilhado com formigas do gênero *Solenopsis*, *Azteca*, *Wasmannia*, *Myrmica*, *Poliergus* e *Pheidole*. Esse alelo não foi correlacionado com nenhum fenótipo causador de distúrbio reprodutivo, esse fato pode ser devido à falta de estudos.

O fato das sequências de *Solenopsis daguerrei* possuírem grande diversidade de alelos na HVR1 pode ser devido ao seu comportamento de parasita social. Provavelmente esse comportamento promove a infecção por mais de uma cepa de *Wolbachia* e também por mais de uma variante de cada cepa.

Dedeine et al. (2005) encontraram até oito variantes de *Wolbachia* em um único indivíduo de *Solenopsis daguerrei* baseados no gene que codifica a proteína de superfície *wsp*. Algumas dessas sequências estão dispostas na análise WSP Typing, e revelam diferenças. A superinfecção pode ocasionar uma série de recombinações gênicas entre os endossimbiontes dispostos no interior do indivíduo.

Tabela 3: Caracterização dos alelos compartilhados das regiões hipervariáveis do gene *wsp* do subgrupo *InvB* e grupo *B* de *Wolbachia*. O números de acessos são de sequências depositadas no NCBI e EBI.

Nome da sequência	Alelos H1/H2/H3/H4	Parcial H1	Parcial H2	Parcial H3	Parcial H4	Grupo ou Subgrupo de <i>Wolbachia</i>
Sdag B2 AAX77099	1/21/25/21	-	-	-	-	<i>InvB</i>
Sdag B3 AAX77093	66/21/25/21	-	-	-	-	<i>InvB</i>
Sdag B4 AAX77098	21/21/25/21	-	-	-	-	<i>InvB</i>
Sinvicta B2 AF243436	21/21/25/21	-	-	-	-	<i>InvB</i>
Sinvicta ABI36801	21/21/25/-	-	-	-	21	<i>InvB</i>
LinH B2 AY446983.1	-/21/25/-	21	-	-	171/167/25	<i>InvB</i>
LinH B1 AY446990.1	-/21/25/-	21	-	-	178/153/152/37/ 21	<i>InvB</i>
Sinvicta Roldan Arg1	-/21/25/-	21	21	-	178/153/152/37/ 21	<i>InvB</i>
Sinvicta USA1	-/21/25/-	21	21	-	178/153/152/37/ 21	<i>InvB</i>
Sinvicta USA	-/21/25/-	21	21	-	178/153/152/37/ 21	<i>InvB</i>
Sinvicta Roldan Arg	-/21/25/-	21	21	-	178/153/152/37/ 21	<i>InvB</i>
Sinvicta Corrientes Arg1	-/21/25/-	21	21	-	178/153/152/37/ 21	<i>InvB</i>
Sinvicta Rosario Arg1	-/21/25/-	21	21	-	178/153/152/37/ 21	<i>InvB</i>
Mogi das Cruzes SP- P1	21/40/-/-	-	-	48	58/48/41/39	B
Registro SP-P1	-/21/42/-	21	40	-	157/156/199/79 63	B
Picinguaba SP-P1	-/21/42/-	21	40	-	157/156/199/79 63	B

A utilização do MLST seria o meio correto para verificar se realmente essas oito variantes eram diferentes. As três sequências do estudo de Dedeine et al. (2005) analisadas aqui neste estudo e que estão no subgrupo *InvB* mostram uma recombinação da HVR1 com himenópteros e dípteros. A sequência Sdag B4 compartilha os três alelos das HVR1, HVR2 e HVR3 com o restante das sequências de *Wolbachia* do subgrupo *InvB*, o que pode ser um indicativo de transmissão horizontal mediada por parasita social. Além disso, o comportamento de parasita social de *S. daguerrei* pode torná-la como um reservatório e disseminador de novas

variantes de *Wolbachia*, uma vez que diversas recombinações podem acontecer dentro do indivíduo e posteriormente serem transmitidas horizontalmente para seus hospedeiros sociais.

Todas as sequências do subgrupo *InvB* compartilham os alelo 21 da HVR2 e o alelo 25 da HVR3, que são compartilhados com gêneros de formiga como : *Solenopsis*, *Azteca*, *Wasmannia*, *Myrmica* e *Pheidole*. As quatro primeiras sequências tiveram o alelo 21 da HVR4 definido, entretanto no restante das sequências não houve a definição do alelo, apresentando somente um resultado parcial com o mesmo valor para todos os alelos foi mostrado. Das sequências em que o alelo foi definido, pode-se dizer que é o mesmo alelo da HVR2 e conseqüentemente compartilhado pelos mesmos gêneros de formigas.

No subgrupo *InvA*, provavelmente o conjunto de alelos encontrados nas sequências de subgrupo *InvB* estão em estreita relação com formigas, o que garante um sucesso na infecção e disseminação em espécies não relacionadas mas que dividem o mesmo espaço ecológico ou até mesmo estão inseridas dentro de um sistema ecológico.

As sequências obtidas das formigas coletadas de Mogi das Cruzes, Picinguaba e Registro não estão inseridas no subgrupo *InvB*, mas pertencem ao supergrupo ou cepa *B* de *Wolbachia*. Essas sequências compartilham o alelo 21 da HVR1 com as outras sequências do subgrupo *InvB*. Para a HVR2 estas sequências compartilham o alelo 40, de acordo com o banco de dados The *Wolbachia* *wsp*, as formigas dos gêneros: *Polyergus*, *Myrmica* e *Pheidole* compartilham esse alelo e não foi correlacionado qualquer fenótipo de anomalia reprodutiva causado por esse alelo.

A HVR3 exibe dois alelos diferentes para as três sequências; as sequências de Registro e Picinguaba possuem o alelo 42, já a sequência de Mogi das Cruzes possui um valor parcial para o alelo 48. O alelo 42 é também compartilhado por formigas dos gêneros *Polyergus*, *Myrmica* e *Pheidole* e não possuem descrição de fenótipos causadores de distúrbios reprodutivos. Entretanto, o alelo 48 é compartilhado com a ordem Pseudoscorpiones, gênero *Cordylochernes*, o que provavelmente deve ser decorrente de recombinação gênica. É importante lembrar que essas três variantes de *Wolbachia* encontradas em ninhos de *S. invicta* possuem identidade com a *Wolbachia* de *A. insinuator* um parasita social de *Acromyrmex*. Como salientado, esse parasita social assim como *S. daguerrei* pode

ser um reservatório e disseminador de novas combinações de alelos do gene *wsp* decorrentes de recombinações genéticas.

- 5.0 Conclusões

5.1 – Identificação através DNA Barcode

A proposta de identificação pelo DNA Barcode, permitiu a viabilidade deste projeto para as análises posteriores. Haja visto que a identificação morfológica também é uma ferramenta importante, a demanda de trabalho dos taxonomistas especializados não permite a identificação em um tempo viável.

5.2 – Análise filogenética das sequências de *mtDNA*

A análise de *mtDNA* mostra que os grupos encontrados nos dez ninhos analisados podem ser decorrentes de eventos evolutivos que ocorreu na espécie ou mesmo que houve interferência na dispersão natural das fêmeas.

5.3 – Análise de Poliginia

A utilização dos primers selecionados para identificar poliginia mostrou que todos os ninhos são monogínicos. Entretanto, existem formas de poliginia descritas que esses primers não são eficientes em diagnosticar. A análise de mais amostras de populações nativas deve ser conduzida para a verificação da característica de poliginia em *S. invicta*.

5.4 – Análises de Microssatélites e inferências de machos

As análises de microssatélites possibilitaram a inferência de problemas moleculares que ocorreram em algumas formigas ou que ocorreram em um ou mais loci analisados. A análise possibilitou a descoberta de um alelo que não tinha sido genotipado e por conta disso uma hipótese de triploidia foi inferida. Além disso, a análise sobre várias formigas de um mesmo ninho, possibilitou inferir o genótipo do(s) macho(s) parental(is). As análises de microssatélites mostraram também que possivelmente mais de um casal coexiste um mesmo ninho, contrariando os resultados de monoginia. Outra evidência é que alguns alelos considerados stuttes

não se encaixam no padrão de artefatos de amplificação e devem ser analisados posteriormente.

5.5 – Análise de relacionamento genético intracolônia

A análise de relacionamento genético intracolônia revelou que os resultados obtidos neste estudo estão em desacordo com as análises de microssatélites e também com muitos trabalhos publicados com diferentes gêneros de formigas ou abelhas. Através destes resultados de relacionamento genético foi inferido que algum problema molecular ou mesmo ecológico está ocorrendo nos dez ninhos analisados.

5.6 – Infecção por *Wolbachia*

Somente cinco ninhos de *S. invicta* estavam infectados por *Wolbachia*. A análise de infecção intracolônia mostrou que em determinados ninhos existe diferença na prevalência do simbiote.

5.7 – Similaridade das sequências de *wsp* de *Wolbachia*

A análise da similaridade das sequências de *wsp* mostrou os que ninhos analisados de *S. invicta* compartilham cepas de *Wolbachia* com formigas oriundas de localidades distantes bem como com espécies e gêneros diferentes de formigas. A análise corroborou os estudos anteriores que argumentam que a sequência *Wolbachia* encontrada é diferente da encontrada em outros insetos e também é diferente da encontrada no Velho Mundo. A transmissão horizontal de *Wolbachia* de *A. insinator* encontrada em três ninhos de *S. invicta* evidencia que a simpatria de diferentes espécies pode disseminar mais facilmente o simbiote.

5.8 – Análise de WSP TYPING

O compartilhamento dos alelos das regiões hipervariáveis do gene *wsp* com outros gêneros de formigas reforça a hipótese da perda de especialização de *Wolbachia* de formigas. A transmissão horizontal mediada por dípteros e outros

gêneros de Himenópteros (vespas) é reforçada pelo compartilhamento de alelos das HVRs de *wsp*. A similaridade dos conjuntos de alelos analisados evidencia a especialidade de *Wolbachia* em formigas. Essa especialização pode garantir a expansão de *Wolbachia* em ambiente que possuem diversos gêneros de formigas simpátricos.

4.11 – Microssatélites e *Wolbachia*

Aparentemente nenhuma relação entre a infecção pelo simbionte *Wolbachia* e os problemas moleculares encontrados nos microssatélites existe. É provável que a dinâmica do simbionte não se sobreponha sobre a dinâmica do hospedeiro. Por conta disso as investigações sobre os microssatélites e investigações sobre a *Wolbachia* deste estudo devem ser analisadas separadamente.

Referências:

- AHRENS, M. E.; SHOEMAKER, D. Evolutionary history of *Wolbachia* infections in the fire ant *Solenopsis invicta*. **BMC Evolutionary Biology** . v. 5, p .35, 2005.
- AHRENS, M. E.; ROSS, K. G.; SHOEMAKER, D. D. Phylogeographic structure of the fire ant *Solenopsis invicta* in its native south American range: roles of the natural barriers and habitat connectivity. **Evolution**. v. 59, p. 1733-1743, 2005.
- ALVES, D. A. First discovery of a rare polygyne colony in the stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Apidae, Meliponini). **EDP Science**. p. 1-3, 2010.
- AVISE, J. C , **Molecular Markers, Natural History and Evolution**.Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 2004.
- BALDO, L.; HOTOPP, J. C. D.; JOLLEY, K. A.; BORDENSTEIN, S. R.; BIBER, S. A.; CHOUDHURY, R. R.; HAYASHI, C.; MAIDEN, M. C. J; TETTELIN, H.; WERREN, J. Multilocus Sequence Typing System for the Endosymbiont *Wolbachia pipientis*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 72, p. 7098-7110, 2006.
- BALDO, L.; LO, N.; WERREN, J. H. Mosaic Nature of *Wolbachia* Surface Protein. **Journal of Bacteriology**. v.187, p. 5406-5418, 2005.
- BALLARD, J. W. O.; WHITLOCK, M.C. The incomplete natural history of mitochondria. **Molecular Ecology**. v. 13, p. 729-744, 2004.
- BARR, A.R. Cytoplasmic incompatibility in natural populations of mosquito, *Culex pipiens*. **Nature**. v. 283, p. 71–72, 1980.
- BEKKEVOLD, D.; BOOMSMA, J. J. Evolutinary transition to a semelparous life history in the socially parasitic ant *Acromyrmex insinuator*. **J. Evol. Biol.**, v. 13, p. 615-623, 2000.
- BOUWMA, A. M.; AHRENS, M. E.; DEHEER, C. J. SHOEMAKER, D. D. Distribution and prevalence of *Wolbachia* in introduced populations of the fire ant *Solenopsis invicta*. **Insect Molecular Biology**. v. 15, p. 89-93, 2006.

BUREN, W. F. **Revisionary** studies on the taxonomy of the imported fire ants. **Journal of the Georgia Entomological Society**. v. 7, p. 1–26, 1972.

CALLEN, D.F.; THOMPSON, A.D.; SHEN, Y.; PHILLIPS, H.A.; RICHARDS, R.I.; MULLEY, J.C.; SUTHERLAND, G.R. Incidence and origin of “null” alleles in the (AC)_n microsatellite markers. **American Journal of Human Genetics**. v. 52, p. 922-927, 1993.

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

COSTA-RIBEIRO, M. C. V.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; FAILLOUX, A-B. Higher genetic variation estimated by microsatellites compared to isoenzyme markers in *Aedes aegypti* from Rio de Janeiro. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 101, p. 917-921, 2006.

DALE, C; MORAN, N. A. Molecular interactions between bacterial symbionts and their hosts. **Cell**. v. 126, p. 453-465, 2006.

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

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

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

GOODISMAN, M. A. D.; HAHN, D. Breeding system, colony structure, and genetic differentiation in the *Camponotus festinatus* species complex of carpenter ants. **Evolution**. v. 59, p. 2185–2199, 2005.

GOODISMAN, M. A. D.; ROSS, K. G. Relationship of queen number and queen relatedness in multiple-queen colonies of the fire ant *Solenopsis invicta*. **Ecological Entomology**. v. 22, p. 150-157, 1997.

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

HAMILTON, W. D. The genetical evolution of social behaviour I. **J. Theor. Biol.** v. 7, p. 1-16, 1964.

HARDY, O. J; VEKEMANS, X. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology Notes.** v. 2, p. 618-620, 2002.

HENSHAW, M. T.; KUNZMAN, N; VANDERWOUDE, C. SANETRA, M; CROZIER, R. H. Population genetics and history of the introduced fire ant *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera:Formicidae), in Australia. **Australian Journal of Entomology.** v. 44, p. 37-44, 2005.

HERBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; WAARD, J. R. Biological identification through DNA barcode. **The Royal Society.** v. 270, p. 313-321, 2003.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON. E. O. **The ants.** Springer: Berlin. 1990.

HUBER, K.; LOAN, L. L.; HOANG, T. H.; TIEN, T. K.; RODHAIN, F.; FAILLOUX, A-B. Temporal genetic variation in *Aedes aegypti* populations in Ho Chi Minh City (Vietnam). **Heredity.** v. 89, p. 7–14, 2002.

KELLER, L. Social life: the paradox of multiple-queen colonies. **Tree.** v. 10, p. 355-360, 1995.

KRIEGER, M. J. B; KELLER, L. Polymorphism at dinucleotide microsatellite loci in fire ant *Solenopsis invicta* populations. **Molecular Ecology.** v. 6, p. 997–999, 1997

KRIEGER, M. J. B.; ROSS, K. G.; CHANG, C. W. Y.; KELLER, L. Frequency and origin of triploidy in the fire ant *Solenopsis invicta*. **Heredity.** . v. 82, p. 142–150, 1999

KRIEGER, M. J. B; ROSS, K. G. Molecular evolutionary analyses of the odorant-binding protein gene Gp-9 in fire ants and other *Solenopsis* species. **Mol. Biol. Evol.** v. 22, p. 2090- 20103, 2005.

LEEUVEN, T.V.; VANHOLME, B.; POTTELBERG, S. V.; NIEUWENHUYSE, P. V.; NAUEN, R.; TIRRY, L.; DENHOLM, I. Mitochondrial heteroplasmy and the evolution of insecticide resistance: Non-Mendelian inheritance in action. **PNAS.** v. 15, p. 5980–5985, 2008.

LOFGREN, C. S.; BANKS, W. A.; GLANCEY, B. M. Biology and control of imported fire ants. **Annual Reviews**. v. 20, p. 1-30. 1975

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

MARTINS, C. Análises moleculares das formigas lava-pés (*Solenopsis* spp.) (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) e da presença da endobactéria *Wolbachia*. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.

MEYER, A.; KNOWLES, L. L.; VERHEYEN, E. Widespread geographical distribution of mitochondrial haplotypes in rockdwelling cichlid fishes from Lake Tanganyika. **Mol. Ecol.** v. 5, p. 341-350, 1996.

MORRISON, L. W.; PORTER, S. D.; DANIELS, E. ; KORZUKHIN, M. D. Potential global range expansion of the invasive fire ant, *Solenopsis invicta*. **Biological Invasions**. v. 6, p. 183–191, 2004.

PAMILO, P.; GERTSCH, P.; THORÉN, P.; SEPPÄ, P. Molecular population genetics of social insects. **Annu. Rev. Ecol. Syst.** v. 28, p. 1–25, 1997.

PAXTON, R. J.; THORÉN, P. A.; TENGÖ, J.; ESTOUP, A.; PAMILO, P. Mating structure and nestmate relatedness in a communal bee, *Andrena jacobii* (Hymenoptera, Andrenidae), using microsatellites. **Molecular Ecology**. v. 5, p. 511-519, 1996.

PITTS, J.P.; MCHUGH, J.V.; ROSS, K.G. Cladistic analysis of the fire ants of the *Solenopsis saevissima* species-group (Hymenoptera:Formicidae). **Zoologica Scripta**. v. 34, p. 493-505, 2005.

PORTER, S. D.; TSCHINKEL, W. R. Fire ant thermal preferences: behavioral control of growth and metabolism. **Behav. Ecol. Sociobiol.** v. 32, p. 321-329, 1993.

PORTER, S. D.; TSCHINKEL, W. R. Foraging in *Solenopsis invicta* (Hymnoptera: Formicidae): Effects of wheather and season. **Environmental Entomology**. v. 16, p. 802-808, 1987.

QUELLER, D. C.; GOODNIGHT, K. F. Estimating relatedness using genetics markers. **Evolution**. v. 43, p. 258-275, 1989.

RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. N. The barcode of life data system (www.barcodinglife.org). **Molecular Ecology Notes**. p. 1-10, 2007.

REUTER, M.; PEDERSEN, J.S. ; KELLER, L. Loss of Wolbachia infection during colonisation in the invasive Argentine ant *Linepithema humile*. **Heredity**. v. 94, p. 364–369, 2005.

ROSS, K. G.; GOTZEK, D.; ASCUNCE, M. S.; SHOEMAKER, D. D. Species delimitation: a case study in a problematic ant taxon. **Syst. Biol.** v. 59, p. 162-184, 2010.

ROSS, K. G.; KRIEGER, M. J. B.; KELLER, L.; SHOEMAKER, D. D. Genetic variation and structure in native populations of the fire ant *Solenopsis invicta*: evolutionary and demographic implications. **Biological Journal of the Linnean Society**. v. 92, p. 541–560, 2007.

ROSS, K. G.; KRIEGER, M. J. B.; SHOEMAKER, D. D. Alternative genetic foundations for a key social polymorphism in fire ants. **Genetics**. v. 165, p. 1853–1867, 2003.

ROSS, K. G.; KRIEGER, M. J. B.; SHOEMAKER D. D.; VARGOS E. L.; KELLER, L. Hierarchical Analysis of Genetic Structure in Native Fire Ant Populations: Results From Three Classes of Molecular Markers. **Genetics**. v. 147, p. 643-655, 1997.

ROSS, K.G; SHOEMAKER, D. D. Species delimitation in native South American fire ants. **Molecular Ecology** . v. 14, p. 3419–3438, 2005.

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

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

SCHREMPF, A.; REBER, C.; TINAUT, A.; HEINZE, J. Inbreeding and local mate competition in the ant *Cardiocondyla batesii*. **Behav. Ecol. Sociobiol.** V.57, p. 502–510, 2005.

SCHULTZ, T. R.; BEKKEVOLD, D.; BOOMSMA, J. J. *Acromyrmex insinuator* new specie: an incipient social parasite of fungus-growing ants. **Insectes Sociaux.** v. 45, p. 457-471, 1998.

SIA, E. A.; JINKS-ROBERTSON, S.; PETES, T.D. Genetic control of microsatellite stability. **Mutation Research.** V. 383, p. 61-70, 1997.

SLATKIN, M. A. Measure of Population Subdivision Based on Microsatellite Allele Frequencies. **Genetics.** v. 139, p. 457-462, 1995.

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

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

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

STOUTHAMER, R.; BREEUWER, J. A. J.; HURST, G. D. D. *Wolbachia pipientis*: Microbial manipulator of arthropod reproduction. **Annu. Rev. Microbiol.** v. 53, p. 71-102, 1999.

SUMMER, S.; HUGHES, W. O. H.; PEDERSEN, J. S.; BOMSMA, J. Ant parasite queens revert to mating singly. **Nature.** v. 428, p. 35-36, 2004.

SUNNUCKS, PAUL. Efficient genetic markers for population biology. **Tree.** v.15, p. 199-203, 2000.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M; KUMAR, S. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution.** v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TRAGER, J. C. A revision of the fire ants, *Solenopsis geminate* group (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae). **Journal of the New York Entomological Society**. v. 99, p. 141–198, 1991.

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

TSCHINKEL, W. R. **The fire ants**. The Belknap Press of Harvard University Press: Cambridge, Massachusetts and London, England. 2006.

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

TSUTSUI, N. D.; SUAREZ, A. V. The colony structure and population biology of invasive ants. **Conservation Biology**. v. 17, p. 48-58, 2003.

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

VALLES, S. M.; PORTER, S. D. Identification of polygyne and monogyne fire ant colonies (*Solenopsis invicta*) by multiplex PCR of *Gp-9* alleles. **Insectes Soc.** v. 50, p. 199–200, 2003.

VAN BORM, S.; WENSELEERS, T.; BILLEN, J. BOOMSMA, J. J. Cloning and sequencing of *wsp* encoding gene fragments reveals a diversity of co-infecting *Wolbachia* strains in *Acromyrmex* leafcutter ants. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 26, p. 102-109, 2003.

VAN BORM, S.; WENSELEERS, T.; BILLEN, J. BOOMSMA, J. J. *Wolbachia* in leafcutter ants: a widespread symbiont that may induce male killing or incompatible matings. **J. Evol. Biol.** v. 14, p. 805-814, 2001.

WENSELEERS, T.; ALVES, D. A.; FRANCOY, T. M.; BILLEN, J.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. **Biol. Lett.** p. 1-4, 2010.

WERREN, J.H. Biology of *Wolbachia*. **Annu. Rev. Entomol.** v. 42, p. 587–609, 1997.

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

WERREN, J.H; WINDSOR, D.M. *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium? **Proc. R. Soc. London B Biol. Sci.** v. 267, p. 1277–1285, 2000.

WILSON, E.O. O complexo *Solenopsis saevissima* na América do Sul (Hymenoptera : Formicidae) . **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 50, p. 49-68, 1952.

WOJCIK, D. P.; ALLEN, C. R.; BRENNER, R. J.; FORYS, E. A.; JOUVENAZ, D. P.; LUTZ, R. S. Red imported Fire ants: Impact of biodiversity. **American entomologist**. v. 47, p. 16-23, 2001.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T.. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**. v. 11, p. 1-16, 2002.

ZHOU, W.; ROUSSET, F.; O'NEILL, S. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. **Proc. R. Soc. Lond. B**. v. 265, p. 509-515, 1998.

Apêndice I

Tabela 4: Caracterização dos alelos dos oito loci de microssatélites de formigas *S. invicta* da cidade de Campinas ninho 2.

ID	Locus sol11	Locus sol18	Locus sol20	Locus sol6	Locus sol42	Locus sol52	Locus sol55	Locus sol49								
117C1	153	153	125	127	125	125	113	123	119	129	190	194	157	171	160	162
118C1	153	153	125	127	125	125	113	123	119	129	190	194	157	171	156	162
119C1	153	153	127	127	125	127	113	113	119	129	190	194	157	171	156	162
120C1	153	153	127	127	125	125	113	123	113	119	190	194	157	171	156	162
121C1	153	153	127	127	125	127	113	113	113	119	190	194	157	171	160	162
122C1	153	153	127	127	125	127	113	113	113	119	190	194	157	171	160	162
123C1	153	153	127	127	125	127	113	123	119	129	190	194	157	171	160	162
124C1	153	153	125	127	125	125	113	123	113	119	190	194	157	171	160	162
125C1	153	153	127	127	125	127	113	123	119	129	190	194	157	171	156	162
126C1	153	153	127	127	125	125	113	123	113	119	190	194	157	171	160	162
300C1	153	153	127	127	125	127	113	113	113	119	190	194	157	171	160	162
301C1	153	153	127	127	125	127	113	123	119	129	190	194	157	171	156	162
302C1	153	153	127	127	125	127	113	123	119	129	190	194	157	171	160	162
303C1	153	153	127	127	125	127	113	113	113	119	190	194	157	171	160	162
304C1	153	153	127	127	125	127	113	113	119	129	190	194	157	171	156	162
305C1	153	153	127	127	125	127	113	113	113	119	190	194	157	171	160	162
306C1	153	153	127	127	125	127	113	123	119	129	190	194	157	171	160	162
307C1	153	153	125	127	125	125	113	113	113	119	190	194	157	171	160	162
308C1	153	153	127	127	125	127	113	113	113	119	190	194	157	171	160	162
309C1	153	153	127	127	125	127	113	113	119	129	190	194	157	171	156	162
310C1	153	153	127	127	125	127	113	123	113	119	190	194	157	171	156	162
311C1	153	153	125	127	125	125	113	123	113	119	190	194	157	171	156	162
312C1	153	153	127	127	125	125	113	123	119	129	190	194	157	171	160	162
313C1	153	153	127	127	125	125	113	123	113	119	190	194	157	171	156	162
314C1	153	153	127	127	125	127	113	123	119	129	190	194	157	171	160	162
315C1	153	153	127	127	125	127	113	123	113	119	190	194	157	171	156	162
316C1	153	153	125	127	125	125	113	123	119	129	190	194	157	171	152	160
317C1	153	153	127	127	125	125	113	123	113	119	190	194	157	171	156	162
318C1	153	153	127	127	125	125	113	113	119	129	190	194	157	171	160	162
319C1	153	153	127	127	125	125	113	113	119	129	190	194	157	171	156	162

Possível genótipo Paterno

Locus sol11	Locus sol18	Locus sol20	Locus sol6	Locus sol42	Locus sol52	Locus sol55	Locus sol49		
153	127	125	113	119	190	194	157	171	162

Tabela 5: Número e frequência dos alelos dos oito loci de microssatélites do ninho 2 da cidade de Campinas

Locus	Qtd Alelos	Alelos e (frequência)			
Locus11	1	153 (1.0)			
Locus18	2	125 (0.1)	127 (0.9)		
Locus20	2	125 (0.72)	127 (0.28)		
Locus6	2	113 (0.7)	123 (0.3)		
Locus42	3	113 (0.25)	119 (0.5)	129 (0.25)	
Locus52	2	190 (0.5)	194 (0.5)		
Locus55	2	157 (0.5)	171 (0.5)		
Locus49	4	152 (0.01)	156 (0.21)	160 (0.29)	162 (0.49)


 A sinalização com a cor Amarela indica algum problema molecular ou mesmo algum problema de genotipagem ocorrendo no(s) locus.

Tabela 6: Caracterização dos alelos dos oito loci de microssatélites de formigas *S. invicta* da cidade de Campinas ninho 3.

ID	Locus sol11		Locus sol18		Locus sol20		Locus sol06		Locus sol42		Locus sol52		Locus sol55		Locus sol49	
127CJ1	153	157	125	125	129	129	111	115	113	113	190	190	151	155	138	152
128CJ1	153	153	125	125	129	131	111	141	109	113	190	190	151	161	138	152
129CJ1	153	153	125	125	129	129	111	115	109	113	190	190	151	155	138	162
130CJ1	153	157	125	125	129	131	111	141	113	113	190	190	151	161	138	152
131CJ1	153	153	125	125	129	129	111	115	113	113	190	190	151	161	138	162
132CJ1	153	157	125	125	129	129	111	141	113	113	190	190	151	155	138	152
133CJ1	153	153	125	125	129	129	111	115	113	113	190	190	151	155	138	152
134CJ1	153	157	125	125	129	129	111	115	113	113	190	190	151	161	138	152
135CJ1	153	157	125	125	129	129	111	141	109	113	190	190	151	155	138	162
136CJ1	153	157	125	125	129	131	111	115	113	113	190	190	151	161	138	152
320CJ1	153	153	125	125	129	129	111	115	113	113	190	190	0	0	138	162
321CJ1	153	153	125	125	129	131	111	115	113	113	190	190	151	155	138	162
322CJ1	153	157	125	125	129	131	111	141	113	113	190	190	151	155	138	162
323CJ1	153	153	125	125	129	131	111	115	113	113	190	190	151	155	138	152
324CJ1	153	157	125	125	129	129	111	141	109	113	190	190	151	161	138	162
325CJ1	153	157	125	125	129	131	111	115	109	113	190	190	151	161	138	152
326CJ1	153	153	125	125	129	129	111	141	113	113	190	190	151	161	138	152
327CJ1	153	153	125	125	129	131	111	141	113	113	190	190	151	155	138	152
328CJ1	153	153	125	125	129	129	111	141	113	113	190	190	151	161	138	162
329CJ1	153	153	125	125	129	129	111	141	113	113	190	190	151	155	138	162
330CJ1	153	157	125	125	129	129	111	115	109	113	190	190	151	161	138	162
331CJ1	153	157	125	125	129	129	111	141	113	113	190	190	151	161	138	152
332CJ1	153	157	125	125	129	129	111	115	113	113	190	190	151	161	138	162
333C1	153	157	125	125	129	131	111	141	109	113	190	190	151	161	138	152
334CJ1	153	157	125	125	129	131	111	115	109	113	190	190	151	155	138	152
335CJ1	153	153	125	125	129	131	111	115	113	113	190	190	151	161	138	162
336C1	153	157	125	125	129	129	111	115	109	113	190	190	151	161	138	162
337C1	0	0	0	0	0	0	0	0	109	113	190	190	151	161	138	162
338C1	153	157	125	125	129	131	111	141	109	113	190	190	151	161	138	162
339C1	153	153	125	125	129	129	111	115	109	113	190	190	151	161	138	152

Possível genótipo Paterno

Locus sol11	Locus sol18	Locus sol20	Locus sol06	Locus sol42	Locus sol52	Locus sol55	Locus sol49
153	125	129	111	113	190	151	138

Tabela 7: Número e frequência dos alelos dos oito loci de microssatélites do ninho 3 de Campinas.

Locus	Qtd de Alelos	Alelos e (Frequência)		
Locus11	2	153 (0.72)	157 (0.28)	
Locus18	1	125 (1.0)		
Locus20	2	129 (0.79)	131 (0.21)	
Locus06	3	111 (0.5)	115 (0.27)	141 (0.23)
Locus42	2	109 (0.20)	113 (0.80)	
Locus52	1	190 (1.0)		
Locus55	3	151 (0.5)	155 (0.20)	161 (0.30)
Locus49	3	138 (0.5)	152 (0.27)	162 (0.23)

Tabela 8: Caracterização dos alelos dos oito loci de microssatélites de formigas *S. invicta* da cidade de Mogi das Cruzes ninho 1.

ID	Locus sol11		Locus sol18		Locus sol20		Locus sol06		Locus sol42		Locus sol52		Locus sol-55		Locus sol49	
200C1	149	165	127	127	129	129	111	115	119	119	190	190	155	161	160	160
201C1	149	165	127	127	129	129	111	115	119	119	190	190	155	155	160	160
202C1	149	165	127	127	127	129	111	115	111	111	190	190	155	161	160	160
203C1	149	165	127	127	129	129	111	115	0	0	190	190	155	161	160	160
204C1	149	165	127	127	127	129	111	115	119	0	190	190	155	161	160	180
205C1	149	165	127	127	129	129	111	115	0	0	190	190	155	161	160	160
206C1	149	165	127	127	0	0	111	115	111	111	190	190	155	161	160	180
207C1	149	165	127	127	127	129	111	115	111	111	190	190	155	161	160	160
208C1	149	165	127	127	129	129	111	115	111	111	190	190	155	155	160	160
209C1	149	165	127	127	127	129	111	115	111	111	190	190	155	161	160	180
210C1	149	165	127	127	129	129	111	115	119	119	190	190	155	155	160	180
211C1	149	165	127	127	127	129	111	115	111	111	190	190	155	155	160	180
212C1	149	165	127	127	127	129	111	115	119	119	190	190	155	161	160	180
213C1	149	165	127	127	127	129	111	115	119	119	190	190	155	155	160	160
214C1	149	165	127	127	127	129	111	115	119	119	190	190	155	155	160	160
215C1	149	165	127	127	127	129	111	115	119	119	190	190	155	161	160	180
217C1	149	165	127	127	127	129	111	115	119	119	190	190	155	155	160	160
218C1	149	165	127	127	129	129	111	115	111	111	190	190	155	161	160	180
219C1	149	165	127	127	127	129	111	115	111	111	190	190	155	155	160	180
27C1	149	165	127	127	129	129	111	115	0	0	190	190	155	155	160	180
29C1	149	165	127	127	127	129	111	115	111	111	190	190	155	161	160	180
32C1	149	165	127	127	129	129	111	115	119	119	190	190	155	161	160	160
33C1	149	165	127	127	127	129	111	115	119	119	190	190	155	161	160	180
46C1	149	165	127	127	129	129	111	115	111	111	190	190	155	155	160	160
47C1	149	165	127	127	129	129	111	115	119	119	190	190	155	161	160	160
48C1	149	165	127	127	123	127	111	115	0	0	190	190	155	161	160	180
49C1	149	165	127	127	129	129	111	115	119	119	190	190	155	155	160	160

Possível genótipo Paterno

Locus sol11		Locus sol18		Locus sol20		Locus sol06		Locus sol42		Locus sol52		Locus sol-55		Locus sol49	
149	165	127	127	129	111	115	119	119	190	190	155	160			
							111	111							

Tabela 9: Número e frequência dos alelos dos oito loci de microssatélites do ninho 1 de Mogi das Cruzes.

Locus	Qtd de Alelos	Alelos e (Frequência)			
Locus11	2	149 (0.5)	165 (0.5)		
Locus18	1	127 (1.0)			
Locus20	3	123 (0.02)	127 (0.27)	129 (0.71)	
Locus06	2	111 (0.5)	115 (0.5)		
Locus42	2	111 (0.44)	119 (0.56)		
Locus52	1	190 (1.0)			
Locus55	2	155 (0.70)	161 (0.30)		
Locus49	2	160 (0.75)	180 (0.25)		


 A sinalização com a cor Amarela indica algum problema molecular ou mesmo algum problema de genotipagem ocorrendo no(s) locus.

Tabela 10: Caracterização dos alelos dos oito loci de microssatélites de formigas *S. invicta* da cidade de Mogi das Cruzes ninho 2.

ID	Locus sol11		Locus sol18		Locus sol20		Locus sol06		Locus sol42		Locus sol52		Locus sol55		Locus sol49	
220c1	159	159	125	125	123	129	115	123	119	121	190	190	155	155	162	170
221c1	159	159	125	125	0	0	123	123	119	121	190	190	155	163	158	162
222c1	159	159	125	125	129	133	115	123	119	119	190	190	155	163	158	162
223c1	159	159	125	125	123	129	115	123	119	121	190	190	155	155	162	170
224c1	159	159	125	125	123	129	115	123	119	119	190	190	155	155	162	170
225c1	159	159	125	125	129	133	115	123	119	119	190	190	155	163	162	170
226c1	159	159	125	125	129	133	115	123	119	121	190	190	155	163	158	162
227c1	159	159	125	125	123	129	123	123	119	119	190	190	155	155	158	162
228c1	159	159	125	125	129	133	123	123	119	119	190	190	155	155	162	170
229c1	159	159	125	125	129	133	123	123	119	121	190	190	155	163	162	170
230c1	159	159	125	125	129	133	115	123	119	121	190	190	155	163	162	170
231c1	159	159	125	125	129	133	0	0	119	121	190	190	155	163	158	162
232c1	159	159	125	125	129	133	123	123	119	121	190	190	155	163	162	170
233c1	159	159	125	125	123	129	123	123	119	119	190	190	0	0	158	162
234c1	159	159	125	127	123	129	123	123	119	119	190	190	155	163	158	162
235c1	159	159	125	125	129	133	115	123	119	119	190	190	155	155	158	162
236c1	159	159	125	125	123	129	123	123	119	119	190	190	155	163	158	162
237c1	159	159	125	125	129	133	123	123	119	119	190	190	155	163	158	162
238c1	159	159	125	125	129	133	123	123	119	119	190	190	155	163	158	162
239c1	159	159	125	125	123	129	123	123	119	119	190	190	155	163	158	162
61c1	159	159	125	125	129	133	115	123	119	119	190	190	155	155	162	170
62c1	159	159	125	125	129	133	123	123	119	119	190	190	155	155	162	170
63c1	159	159	125	125	123	129	123	123	119	121	190	190	155	155	162	170
64c1	159	159	125	125	123	129	123	123	119	121	190	190	155	155	162	170
65c1	159	159	125	125	129	133	123	123	119	121	190	190	155	163	162	170
66c1	159	159	125	125	129	133	115	123	119	119	190	190	155	155	158	162
67c1	159	159	125	125	129	133	115	123	119	119	190	190	155	163	158	162
68c1	159	159	125	125	123	129	115	123	119	119	190	190	155	163	158	162
69c1	159	159	125	125	123	129	123	123	119	119	190	190	155	163	158	162
70c1	159	159	125	125	129	133	123	123	119	121	190	190	155	155	158	162

Possível genótipo Paterno

Locus sol11	Locus sol18	Locus sol20	Locus sol06	Locus sol42	Locus sol52	Locus sol55	Locus sol49
159	125	129	123	119	190	155	162

Tabela 11: Número e frequência dos alelos dos oito loci de microssatélites do ninho 2 de Mogi das Cruzes.

Locus	Qtd de Alelos	Alelos e (Frequência)			
Locus11	1	159	(1.0)		
Locus18	2	125	127	(0.98) (0.02)	
Locus20	3	123	129	133	(0.20) (0.5) (0.30)
Locus06	2	115	123	(0.21) (0.79)	
Locus42	2	119	121	(0.8) (0.2)	
Locus52	1	190	(1.0)		
Locus55	2	155	163	(0.71) (0.29)	
Locus49	3	158	162	170	(0.28) (0.5) (0.22)


 A sinalização com a cor Amarela indica algum problema molecular ou mesmo algum problema de genotipagem ocorrendo no(s) locus.

Tabela 12: Caracterização dos alelos dos oito locus de microssatélites de formigas *S. invicta* da cidade de Rio Claro ninho 1.

ID	Locus sol11	Locus sol18	Locus sol20	Locus sol06	Locus sol42	Locus sol52	Locus sol55	Locus sol49								
100C1	153	153	125	127	131	131	113	115	121	121	190	190	155	155	152	152
101C1	153	153	127	127	131	131	113	115	115	121	190	190	155	155	152	152
102C1	153	153	125	127	131	131	115	115	115	121	190	190	155	155	152	152
103C1	153	153	127	127	131	131	113	115	115	121	190	190	155	155	152	152
104C1	153	153	125	127	131	131	113	115	121	121	190	190	155	155	152	152
105C1	153	153	127	127	129	131	113	115	115	121	190	190	155	155	152	152
106C1	153	153	125	127	131	131	113	115	121	121	190	190	155	155	152	152
107C1	153	153	127	127	129	131	113	115	121	121	190	190	155	155	142	152
108C1	153	153	125	127	131	131	115	115	121	121	190	190	155	155	142	152
109C1	153	153	125	127	131	131	115	115	115	121	190	190	155	155	152	152
110C1	153	153	125	127	129	131	113	115	115	121	190	190	155	155	152	152
111C1	153	153	127	127	131	131	113	115	115	121	190	190	155	155	152	152
112C1	153	153	127	127	131	131	113	115	115	121	190	190	155	155	152	152
113C1	153	153	127	127	129	131	113	115	121	121	190	190	155	155	152	152
114C1	153	153	127	127	131	131	115	115	121	121	190	190	155	155	152	152
115C1	153	153	127	127	131	131	115	115	115	121	190	190	155	155	152	152
116C1	153	153	127	127	131	131	115	115	0	0	0	0	0	0	152	152
81C1	153	153	127	127	131	131	113	115	115	121	190	190	155	155	152	152
82C1	153	153	127	127	129	131	115	115	0	0	0	0	0	0	152	152
83C1	153	153	127	127	129	131	115	115	121	121	190	190	155	155	152	152
84C1	153	153	125	127	129	131	113	115	115	121	190	190	155	155	152	152
85C1	153	153	125	127	129	131	113	115	115	121	190	190	155	155	152	152
86C1	153	153	127	127	131	131	113	115	115	121	190	190	155	155	152	152
87C1	153	153	125	127	129	131	115	115	115	121	190	190	155	155	152	152
88C1	153	153	125	127	129	131	115	115	121	121	190	190	155	155	152	152
89C1	153	153	125	127	131	131	115	115	115	121	190	190	155	155	152	152
96C1	153	153	125	127	129	131	111	115	99	129	190	190	155	155	156	156
97C1	153	153	125	127	131	131	113	115	121	121	190	190	155	155	152	152
98C1	153	153	127	127	129	131	115	115	121	121	190	190	155	155	156	162
99C1	153	153	125	127	131	131	115	115	121	121	190	190	155	155	152	152

Possível genótipo Paterno

Locus sol11	Locus sol18	Locus sol20	Locus sol06	Locus sol42	Locus sol52	Locus sol55	Locus sol49
153	127	131	115	121	190	155	152

Tabela 13: Número e frequência dos alelos dos oito locus de microssatélites do ninho 1 de Rio Claro.

Locus	Qtd de Alelos	Alelos e (Frequência)			
Locus11	1	153 (1.0)			
Locus18	2	125 (0.25)	127 (0.75)		
Locus20	2	129 (0.2)	131 (0.8)		
Locus06	3	111 (0.02)	113 (0.27)	115 (0.71)	
Locus42	4	99 (0.02)	115 (0.27)	121 (0.70)	129 (0.01)
Locus52	1	190 (1.0)			
Locus55	1	155 (1.0)			
Locus49	4	142 (0.03)	152 (0.90)	156 (0.05)	162 (0.02)


 A sinalização com a cor Amarela indica algum problema molecular ou mesmo algum problema de genotipagem ocorrendo no(s) locus.

Tabela 14: Caracterização dos alelos dos oito loci de microssatélites de formigas *S. invicta* da cidade de Rio Claro ninho 2.

ID	Locus sol11		Locus sol18		Locus sol20		Locus sol06		Locus sol42		Locus sol52		Locus sol55		Locus sol49	
340C1	153	155	125	127	129	129	111	115	115	115	190	194	153	155	138	138
341C1	153	155	125	127	129	133	115	115	115	115	190	194	153	155	138	138
342C1	153	155	125	127	129	133	109	115	115	121	190	194	153	155	138	152
343C1	153	155	125	127	129	133	111	115	115	115	190	194	153	157	138	138
344C1	153	155	125	127	129	133	109	115	115	115	190	194	153	155	138	152
345C1	153	155	125	127	129	133	109	115	115	121	190	190	153	155	138	152
346C1	153	155	125	127	129	133	109	115	115	121	190	190	153	155	138	138
347C1	153	153	125	127	129	133	109	111	113	115	190	190	155	171	152	152
348C1	153	155	125	127	129	129	109	115	115	121	190	194	153	155	138	138
349C1	153	153	125	127	129	133	109	111	113	121	190	190	157	171	138	152
350C1	153	155	125	127	129	129	111	115	115	115	190	194	153	157	138	138
351C1	153	155	125	127	129	133	111	115	115	121	190	190	153	157	138	138
352C1	153	155	125	127	129	129	109	115	115	121	190	190	153	155	138	138
353C1	153	155	125	127	129	133	109	115	115	121	190	190	153	155	138	138
354C1	153	155	125	127	129	129	109	115	115	115	190	194	153	155	138	152
355C1	153	153	125	127	129	133	109	111	113	115	190	190	155	171	152	152
356C1	153	155	125	127	129	129	111	115	115	115	190	194	153	155	138	138
357C1	153	155	125	127	129	133	109	115	115	121	190	194	153	155	138	138
358C1	153	153	125	127	133	133	111	111	0	0	0	0	0	0	152	152
359C1	153	155	125	127	129	133	111	115	115	115	190	190	153	157	138	152
71C1	153	153	125	127	129	133	111	111	113	115	190	194	157	171	138	152
72C1	153	155	125	127	129	129	111	115	115	115	190	190	153	157	138	138
73C1	153	153	125	127	133	133	111	111	113	121	190	190	155	171	152	152
74C1	153	155	125	127	129	133	109	115	115	115	190	194	153	155	138	138
75C1	153	155	125	127	129	129	111	115	115	121	190	190	153	157	138	152
77C1	153	155	125	127	129	133	111	115	115	121	190	194	153	157	138	152
78C1	153	155	125	127	129	133	109	115	115	115	190	190	153	157	138	152
79C1	153	155	125	127	129	129	111	115	115	121	190	190	153	155	138	138
80C1	153	153	125	127	129	133	109	111	113	115	190	190	0	0	138	152

Possíveis genótipos Paternos

Locus sol11	Locus sol18		Locus sol20	Locus sol06	Locus sol42	Locus sol52	Locus sol55	Locus sol49
153	125	127	129	115	115	190	153	138
153	125	127	133	111	113	190	171	152

Tabela 15: Número e frequência dos alelos dos oito loci de microssatélites do ninho 2 de Rio Claro.

Locus	Qtd de Alelos	Alelos e (Frequência)			
Locus11	2	153 (0.63)	155 (0.37)		
Locus18	2	125 (0.5)	127 (0.5)		
Locus20	2	129 (0.63)	133 (0.37)		
Locus06	3	109 (0.25)	111 (0.35)	115 (0.40)	
Locus42	3	113 (0.10)	115 (0.67)	121 (0.23)	
Locus52	2	190 (0.76)	194 (0.24)		
Locus55	4	153 (0.40)	155 (0.31)	157 (0.19)	171 (0.10)
Locus49	2	138 (0.67)	152 (0.33)		

Tabela 16: Caracterização dos alelos dos oito loci de microssatélites de formigas *S. invicta* da cidade de Salesópolis ninho 2.

ID	Locus sol11	Locus sol18	Locus sol20	Locus sol6	Locus sol42	Locus sol52	Locus sol55	Locus sol49								
157C1	135	149	125	127	123	127	115	115	105	119	190	190	155	161	162	164
159C1	135	153	125	127	123	127	111	111	105	119	190	190	155	161	162	164
160C1	135	153	125	127	123	127	111	111	105	119	190	194	145	145	162	164
161C1	135	153	125	127	123	131	115	115	105	119	190	190	145	145	158	162
162C1	135	149	125	127	123	127	115	115	105	119	190	190	145	155	158	162
163C1	143	149	125	129	125	127	111	111	105	119	190	194	145	145	164	164
164C1	135	153	125	127	123	127	111	111	105	119	190	194	161	161	162	164
165C1	135	149	125	127	123	127	111	111	105	119	190	190	155	161	158	162
166C1	135	149	125	127	123	131	111	111	105	119	190	194	145	145	162	164
240C1	143	153	125	129	125	127	115	115	105	119	190	190	145	145	158	164
241C1	135	149	125	127	123	127	115	115	105	119	190	190	161	161	158	162
242C1	135	153	125	127	123	127	111	111	105	119	190	190	161	161	158	162
243C1	143	153	125	129	125	127	111	111	105	119	190	194	161	161	164	164
244C1	135	153	125	127	123	127	111	111	105	119	190	194	145	145	158	162
245C1	135	149	125	127	123	131	115	115	105	119	190	190	161	161	162	164
246C1	135	153	125	127	123	131	115	115	105	119	190	194	161	161	158	162
247C1	143	149	125	129	125	127	115	115	105	119	190	194	145	145	158	164
248C1	135	149	125	127	123	131	111	111	105	119	190	190	145	145	158	162
249C1	135	153	125	127	123	131	115	115	105	119	190	194	161	161	158	162
250C1	135	153	125	127	123	131	111	111	105	119	190	190	155	161	162	164
251C1	143	153	125	129	125	131	115	115	105	119	190	190	145	145	158	164
252C1	135	149	125	127	123	131	115	115	105	119	190	190	145	155	164	164
253C1	135	149	125	127	123	127	111	111	105	119	190	190	145	145	162	164
254C1	135	153	125	127	123	127	115	115	105	119	190	190	161	161	162	164
255C1	135	153	125	127	123	127	111	111	105	119	190	194	145	145	162	164
256C1	135	149	125	127	123	131	111	111	105	119	190	194	145	145	162	164
257C1	135	153	125	127	123	131	115	115	105	119	190	190	155	161	158	162
258C1	135	149	125	127	123	131	111	111	105	119	190	194	161	161	158	162
259C1	135	149	125	127	123	127	115	115	105	119	190	190	145	145	162	164

Possíveis genótipos Paternos

Locus sol11	Locus sol18	Locus sol20	Locus sol6	Locus sol42	Locus sol52	Locus sol55	Locus sol49
135	127	123	115	115	105	119	190
143	129	125	115	115	105	119	190

Tabela 17: Número e frequência dos alelos dos oito loci de microssatélites do Salesópolis ninho 2.

Locus	Qtd de Alelos	Alelos e (Frequência)			
Locus11	4	135 (0.41)	143 (0.09)	149 (0.25)	153 (0.25)
Locus18	3	125 (0.5)	127 (0.41)	129 (0.09)	
Locus20	4	123 (0.42)	125 (0.08)	127 (0.29)	131 (0.21)
Locus6	2	111 (0.51)	115 (0.49)		
Locus42	2	105 (0.5)	119 (0.5)		
Locus52	2	190 (0.80)	194 (0.20)		
Locus55	3	145 (0.48)	155 (0.12)	161 (0.40)	
Locus49	3	158 (0.24)	162 (0.40)	164 (0.36)	


 A sinalização com a cor Amarela indica algum problema molecular ou mesmo algum problema de genotipagem ocorrendo no(s) locus.

Tabela 18: Caracterização dos alelos dos oito loci de microssatélites de formigas *S. invicta* da cidade de Salesópolis ninho1.

ID	Locus sol11	Locus sol18	Locus sol20	Locus sol6	Locus sol42	Locus sol52	Locus sol55	Locus sol49								
405C1	149	153	123	125	127	129	115	117	113	113	190	194	157	165	156	160
406C1	135	149	123	125	125	129	115	117	113	113	190	194	155	157	156	160
407C1	149	153	125	127	125	129	113	117	113	119	190	194	157	165	156	156
408C1	135	149	123	125	127	129	115	117	113	113	190	194	155	157	156	160
409C1	149	153	125	127	127	129	113	117	113	113	190	194	157	165	156	160
410C1	135	149	125	127	125	129	113	117	113	119	190	194	157	165	156	160
411C1	135	149	123	125	125	129	113	117	113	119	190	194	157	165	156	156
412C1	149	153	125	127	127	129	113	117	113	119	190	194	157	165	156	160
413C1	149	153	125	127	127	129	113	117	113	113	190	194	157	165	156	156
414C1	135	149	123	125	127	129	115	117	113	119	190	194	157	165	156	156
415C1	149	153	123	125	125	129	113	117	113	113	190	194	157	165	156	156
416C1	135	149	125	127	127	129	115	117	113	113	190	194	157	165	156	160
417C1	135	149	125	127	125	129	115	117	113	113	190	194	157	165	156	160
418C1	149	153	125	127	125	129	115	117	113	119	190	194	155	157	156	156
419C1	135	149	123	125	125	129	113	117	113	113	190	194	155	157	156	156
420C1	149	153	123	125	127	129	115	117	113	113	190	194	155	157	156	160
421C1	149	153	125	127	125	129	113	117	113	113	190	194	155	157	156	156
422C1	149	153	123	125	127	129	115	117	113	113	190	194	155	157	156	156
423C1	149	153	125	127	127	129	113	117	113	119	190	194	157	165	156	156
424C1	135	149	123	125	125	129	113	117	113	119	190	194	155	157	156	156
425C1	135	149	123	125	127	129	115	117	113	113	190	194	157	165	156	160
426C1	149	153	123	125	125	129	113	117	113	113	190	194	155	157	156	156
427C1	149	153	123	125	127	129	113	117	113	113	190	194	157	165	156	156
428C1	149	153	125	127	125	129	113	117	113	113	190	194	155	157	156	156
429C1	135	149	123	125	127	129	115	117	113	113	190	194	157	165	156	156
431C1	0	0	127	127	129	129	111	115	113	113	190	194	155	157	156	156
432C1	0	0	123	125	125	129	115	117	113	113	190	194	157	165	156	160
433C1	135	149	123	125	125	129	113	117	113	113	190	194	155	157	156	156

Possível genótipo Paterno

Locus sol11	Locus sol18	Locus sol20	Locus sol6	Locus sol42	Locus sol52	Locus sol55	Locus sol49	
149	125	129	117	113	190	194	157	156

Tabela 19: Número e frequência dos alelos dos oito loci de microssatélites do ninho 1 de Salesópolis

Locus	Qtd de Alelos	Alelos e (Frequência)		
Locus11	3	135 (0.23)	149 (0.5)	153 (0.27)
Locus18	3	123 (0.28)	125 (0.5)	127 (0.22)
Locus20	3	125 (0.25)	127 (0.25)	129 (0.5)
Locus06	3	113 (0.29)	115 (0.21)	117 (0.5)
Locus42	2	113 (0.85)	119 (0.15)	
Locus52	2	190 (0.5)	194 (0.5)	
Locus55	3	155 (0.21)	157 (0.5)	165 (0.29)
Locus49	2	156 (0.80)	160 (0.20)	

Tabela 20: Caracterização dos alelos dos oito lócus de microssatélites de formigas *S. invicta* da cidade de São Paulo ninho 2.

ID	Lócus sol11	Lócus sol18	Lócus sol20	Lócus sol6	Lócus sol42	Lócus sol52	Lócus sol55	Lócus sol49	
180C1	153	153 125	125 131	131 111	119 115	123 190	194 149	155 162	162
181C1	153	153 125	127 127	131 111	119 115	121 190	194 155	157 156	162
182C1	153	153 123	127 129	131 109	117 99	99 190	190 149	149 156	162
184C1	153	153 127	129 131	131 113	119 121	131 190	190 149	161 152	158
185C1	153	153 123	127 127	131 113	115 121	123 190	194 149	153 156	160
186C1	153	153 127	129 131	131 113	119 99	131 190	190 157	161 152	158
187C1	153	153 123	127 129	131 109	119 99	121 190	190 147	149 156	162
188C1	153	153 125	127 131	131 109	111 115	121 190	194 149	155 162	162
189C1	153	153 127	129 127	131 113	119 99	131 190	190 149	161 152	158
260C1	153	153 125	125 125	131 109	115 115	123 190	190 149	153 156	156
261C1	153	153 127	129 131	131 113	119 99	131 190	190 149	161 158	162
262C1	153	153 123	127 127	129 109	119 99	99 190	190 147	163 152	162
263C1	153	153 125	127 131	131 109	111 115	121 190	194 155	157 162	162
264C1	153	153 125	125 125	127 115	119 115	121 190	190 153	157 156	162
265C1	153	153 123	127 127	129 109	117 99	121 190	190 147	163 152	162
266C1	153	153 123	127 127	129 109	117 99	121 190	190 147	163 152	162
267C1	153	153 125	127 125	127 115	119 115	123 190	190 149	153 156	156
268C1	153	153 125	127 127	131 111	119 115	121 190	194 155	157 160	162
269C1	153	153 123	127 129	131 109	119 99	121 190	190 147	163 156	162
270C1	153	153 123	127 127	131 113	115 121	123 190	194 149	153 156	160
271C1	153	153 125	125 125	127 115	119 115	121 190	190 153	157 156	162
272C1	153	153 127	129 131	131 109	113 121	131 190	190 149	161 152	158
273C1	153	153 125	125 127	131 109	111 115	121 190	194 155	157 156	162
274C1	153	153 125	127 125	131 115	119 115	121 190	190 149	153 156	156
275C1	153	153 127	129 127	131 109	113 99	131 190	190 149	161 152	158
276C1	153	153 125	127 125	127 115	119 115	121 190	190 153	157 156	162
277C1	153	153 125	127 131	131 111	119 115	123 190	194 149	155 156	162
278C1	153	153 127	129 127	131 113	119 99	131 190	190 149	161 156	158
279C1	153	153 127	129 127	131 109	113 99	131 190	190 157	161 156	158

Possíveis genótipos Paternos

Lócus sol11	Lócus sol18	Lócus sol20	Lócus sol6	Lócus sol42	Lócus sol52	Lócus sol55	Lócus sol49
153	125	131	111	115	190 194	155	162
153	123	131	109	99	190	149	156
153	127	131	113	131	190	161	158
153	123	127 131 113	115 121 123	190 194	149 153	156 160	
153	125	125	115	115	190	153	156
153	123	127	109	99	190	147 163	152 162

Tabela 21: Número e frequência dos alelos dos oito lócus de microssatélites do ninho 2 de São Paulo

Lócus	Qtd de Alelos	Alelos e (Frequência)							
Lócus11	1	153 (1.0)							
Lócus18	4	123 (0.14)	125 (0.31)	127 (0.41)	129 (0.14)				
Lócus20	4	125 (0.11)	127 (0.28)	129 (0.10)	131 (0.51)				
Lócus6	6	109 (0.22)	111 (0.12)	113 (0.18)	115 (0.13)	117 (0.05)	119 (0.30)		
Lócus42	5	99 (0.24)	115 (0.22)	121 (0.30)	123 (0.10)	131 (0.14)			
Lócus52	2	190 (0.85)	194 (0.15)						
Lócus55	7	147 (0.08)	149 (0.30)	153 (0.14)	155 (0.12)	157 (0.16)	161 (0.14)	163 (0.06)	
Lócus49	5	152 (0.14)	156 (0.32)	158 (0.14)	160 (0.05)	162 (0.35)			

Tabela 22: Caracterização dos alelos dos oito loci de microssatélites de formigas *S. invicta* da cidade de São Paulo ninho 1.

ID	Locus sol11		Locus sol18	Locus sol20	Locus sol6	Locus sol42	Locus sol52	Locus sol55	Locus sol49								
	149	153															
190C1	149	153	127	127	127	131	111	123	113	123	194	194	153	157	158	162	
191C1	149	153	127	127	127	131	131	111	123	113	123	194	194	157	163	158	162
192C1	149	153	127	127	127	131	131	111	123	113	123	194	194	153	157	152	158
193C1	149	153	127	127	127	131	131	111	123	113	123	190	194	157	163	152	158
194C1	149	153	127	127	127	131	117	123	113	123	190	194	157	163	158	162	
195C1	149	153	125	127	131	131	117	123	113	123	190	194	153	157	152	158	
196C1	149	153	125	127	131	131	111	123	113	123	190	194	153	157	158	162	
197C1	149	153	125	127	131	131	111	123	113	115	190	194	157	163	152	158	
198C1	149	153	125	127	131	131	117	123	113	115	194	194	153	157	152	158	
199C1	149	153	125	127	127	131	117	123	113	115	194	194	157	163	152	158	
280C1	149	153	127	127	127	131	111	123	113	115	194	194	153	157	158	162	
281C1	149	153	125	127	127	131	111	123	113	115	194	194	153	157	158	162	
282C1	149	153	125	127	131	131	111	123	113	115	190	194	153	157	152	158	
283C1	149	153	125	127	127	131	117	123	113	123	194	194	153	157	152	158	
284C1	149	153	127	127	127	131	111	123	113	115	190	194	157	163	158	162	
285C1	149	153	125	127	131	131	117	123	113	123	190	194	157	163	152	158	
286C1	149	153	125	127	127	131	117	123	113	115	190	194	153	157	152	158	
287C1	149	153	127	127	127	131	111	123	113	123	190	194	153	157	152	158	
288C1	149	153	127	127	131	131	111	123	113	123	194	194	157	163	152	158	
289C1	149	153	127	127	131	131	117	123	113	115	190	194	157	163	158	162	
290C1	149	153	125	127	127	131	111	123	113	123	194	194	157	163	152	158	
291C1	149	153	127	127	127	131	117	123	113	123	194	194	157	163	152	158	
292C1	149	153	127	127	131	131	111	123	113	115	194	194	157	163	152	158	
293C1	149	153	125	127	131	131	111	123	113	123	190	194	153	157	158	162	
294C1	149	153	125	127	127	131	111	123	113	115	190	194	153	157	158	162	
295C1	149	153	125	127	127	131	117	123	113	123	194	194	157	163	158	162	
296C1	149	153	125	127	131	131	111	123	113	115	194	194	157	163	158	162	
297C1	149	153	127	127	127	131	117	123	113	115	190	194	157	163	158	162	
298C1	149	153	125	127	131	131	111	123	113	115	194	194	157	163	152	158	
299C1	149	153	127	127	127	131	117	123	113	123	194	194	153	157	152	158	

Possível Genótipo Paterno

Locus sol11		Locus sol18	Locus sol20	Locus sol6	Locus sol42	Locus sol52	Locus sol55	Locus sol49
149	153	127	131	123	113	194	157	158

Tabela 23: Número e frequência dos alelos dos oito loci de microssatélites do ninho 1 de São paulo

Locus	Qtd Alelos	Alelos e (Frequência)		
Locus11	2	149 (0.5)	153 (0.5)	
Locus18	2	125 (0.27)	127 (0.73)	
Locus20	2	127 (0.27)	131 (0.73)	
Locus6	3	111 (0.3)	117 (0.2)	123 (0.5)
Locus42	3	113 (0.5)	115 (0.24)	123 (0.26)
Locus52	2	190 (0.23)	194 (0.77)	
Locus55	3	153 (0.23)	157 (0.5)	163 (0.27)
Locus49	3	152 (0.28)	158 (0.5)	162 (0.22)

Tabela 24: Média de relacionamento (r) intracolônia nos dez ninhos analisados.

Ninhos	Média de r (Queller e Goodnight, 1989)± (SE)
Campinas ninho 2	$r = 0,88 \pm (0.00)$
Campinas ninho 3	$r = -0,88 \pm (0.00)$
Mogi ninho 1	$r = -0,39 \pm (0.18)$
Mogi ninho 2	$r = 0 \pm (0.00)$
Rio Claro ninho1	$r = -0,50 \pm (0.00)$
Rio Claro ninho 2	$r = -0,61 \pm (0.00)$
Salesópolis ninho 2	$r = -0,11 \pm (0.00)$
Salesópolis ninho 1	$r = -0,42 \pm (0.00)$
São Paulo ninho 2	$r = 1 \pm (0.00)$
São Paulo ninho1	$r = -0,66 \pm (0.00)$

Apêndice II

Apêndice III

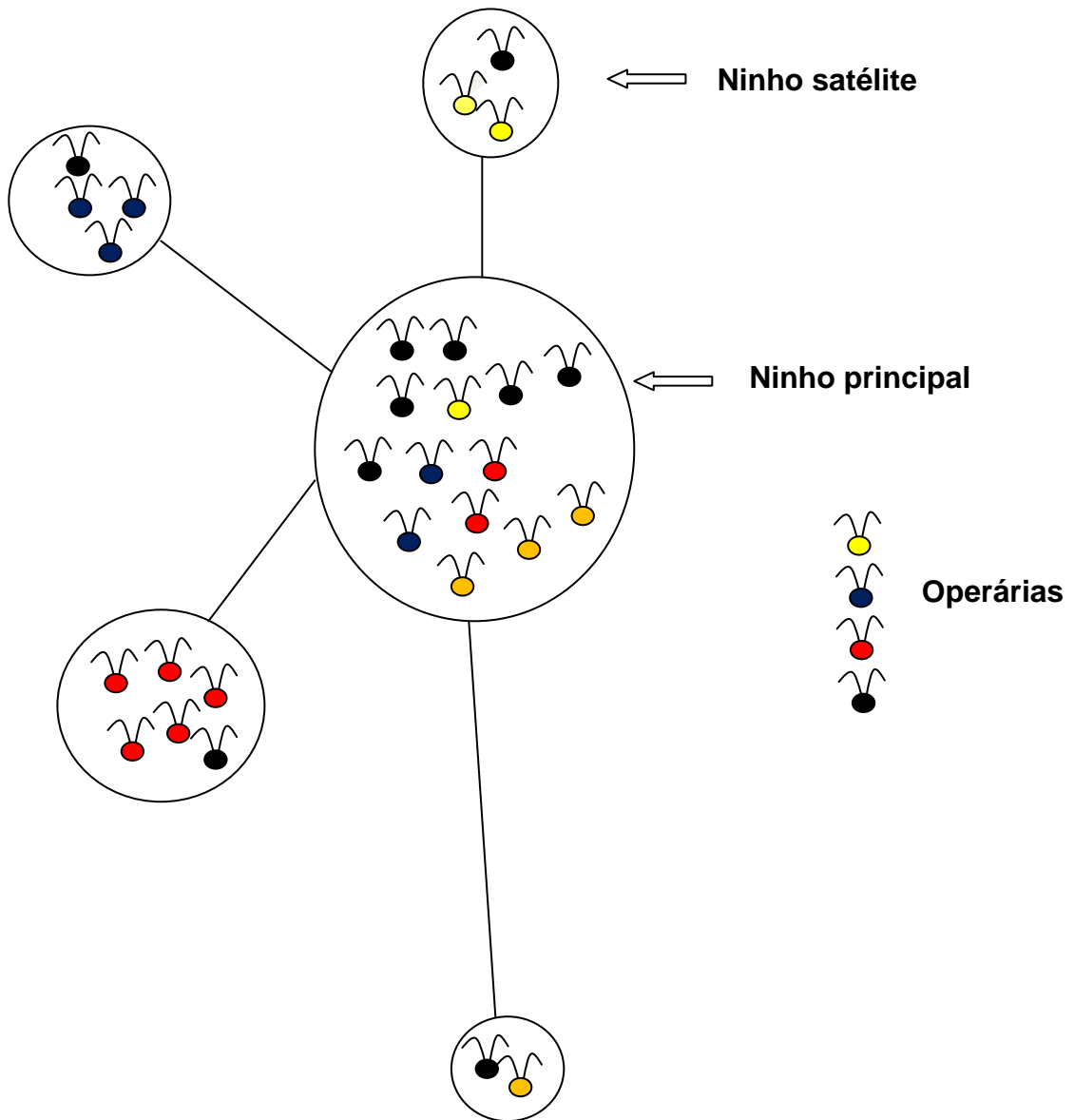


Figura 13: Esquema de ninho principal e ninhos satélites. A cor das operárias indica o movimento das operárias entre o ninho principal e os ninhos satélites.