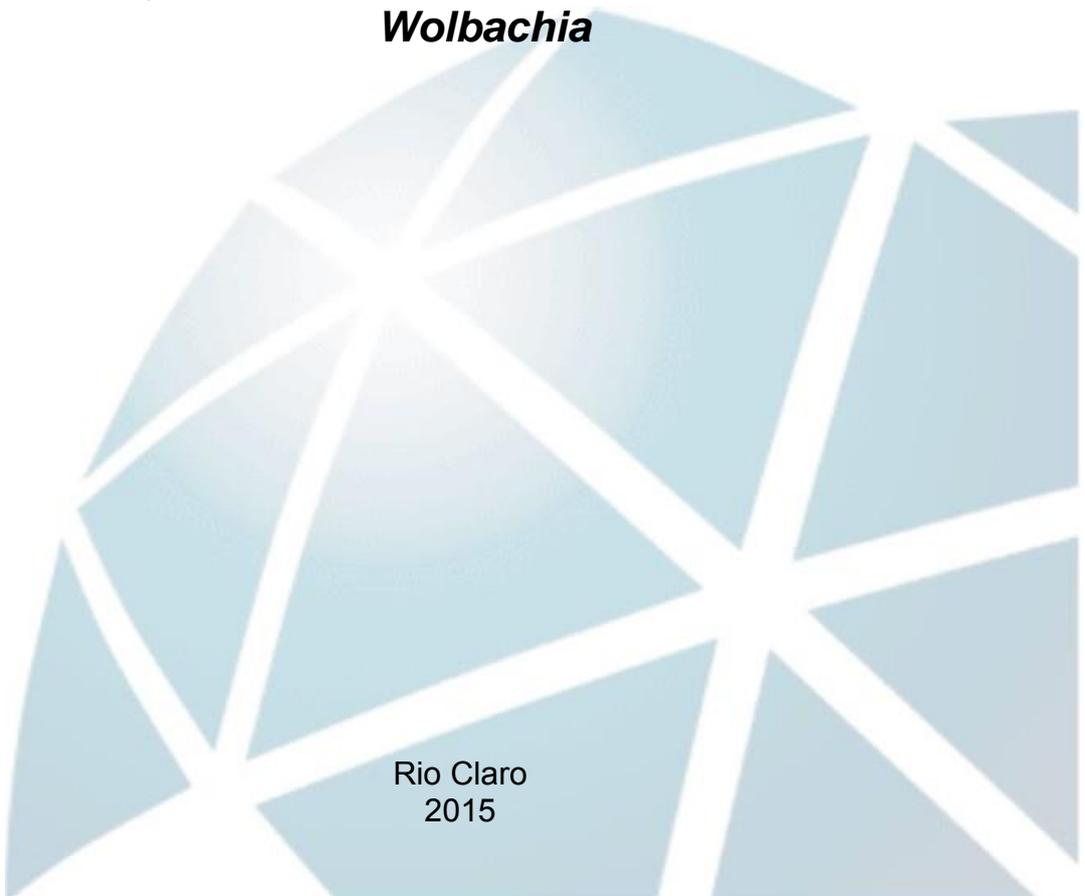

Ciências Biológicas

MARCELLA GIROTO BASTOS

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO GÊNERO
Cephalotes (HYMENOPTERA, FORMICIDAE) E DA
PRESENÇA E FREQUENCIA DO ENDOSSIMBIONTE
*Wolbachia***



Rio Claro
2015

MARCELLA GIROTO BASTOS

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO GÊNERO *Cephalotes* (HYMENOPTERA,
FORMICIDAE) E DA PRESENÇA E FREQUENCIA DO ENDOSSIMBIONTE
Wolbachia

Orientador: Prof. Dr. Odair Correa Bueno

Co-orientadora: Me. Manuela de Oliveira Ramalho Sanchez

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

Rio Claro
2015

595.796 Bastos, Marcella Giroto
B327c Caracterização molecular do gênero *Cephalotes* (Hymenoptera,
Formicidae) e da presença e frequência do endossimbionte *Wolbachia* /
Marcella Giroto Bastos. - Rio Claro, 2015
41 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Odair Correa Bueno
Coorientador: Manuela de Oliveira Ramalho Sanchez

1. Formiga. 2. Cephalotini. 3. Endossimbionte. 4. Filogenia. 5. WSP.
6. Evolução. I. Título.

Dedicatória

Dedico esse trabalho à minha avó Cecilia que como minhas queridas formigas consegue carregar um peso enorme nas costas sem nunca desanimar. Você me inspira vó, obrigada pelo cuidado e carinho desde que nasci. Sem você não teria conseguido.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos que estiveram ao meu lado durante esse tempo de TCC, de graduação, de vida.

Primeiramente agradeço à minha família por todo apoio, amor e dedicação sempre.

Agradeço especialmente meus avós por sempre cuidarem de mim com todo amor do mundo e por nunca deixarem que me faltasse nada.

Agradeço à minha mãe por sempre ter segurado a barra e nunca deixar a peteca cair. Você é uma grande guerreira!

À minha irmãzinha, meu grande orgulho, que faz meu mundo mais cor-de-rosa. Você fez minha vida completa no dia que nasceu e não me imagino mais sem você.

Ao meu companheiro de todas as horas, um agradecimento mais que especial. Com você, seu apoio, amor e amizade eu sou mais forte e sei que vou conquistar todos os meus sonhos! “Você mudou minha vida”.

Agradeço aos meus queridos Anakin, Thomas, Thor, Monica e Birds pela companhia e carinho incondicional.

Agradeço ao mon frère de alma, por sempre estar do meu lado. Sua alma livre me inspira a buscar meus sonhos. “Limitless undying love”.

Agradeço à minha segunda família por me acolherem tão bem sempre. Tenho sorte de ter vocês na minha vida.

Aos amigos, meu agradecimento pela parceria e carinho.

Re, Mille e Aninha, vocês sempre me deixam feliz não importa o que aconteça e iluminam minha vida.

Panteras e Zé, amizade que dura mais de dez anos nunca mais acaba. Vocês são muito especiais e quero vocês sempre comigo.

Aos queridos Di e Rodrigo pela parceria sempre e pelos encontros regados a comida boa e bom papo.

À querida amiga Camila que em pouco tempo se tornou especial e vem me acompanhando nas alegrias e tristezas dessa vida universitária.

À querida Marcelle pelo companheirismo e boa vizinhança nesses últimos anos.

Às meninas da Muvuca que me acolheram em seu dia-a-dia.

À família Bio Logus Jr., que é muito mais que uma empresa júnior, é pensar fora da caixa, é aprender que seus sonhos só dependem de você para virar realidade, é aprender a conviver com o outro e conhecer a si mesmo. Obrigada por fazerem da graduação uma experiência incrível!

Aos Lejers pela experiência e confraternização.

Agradeço aos “falantes da van” pelas conversas, risadas e gordices. Sinto falta de vocês no meu dia-a-dia galera.

Ao pessoal da Casa da Floresta pela experiência e pela sabedoria que dividiram comigo.

Ao pessoal da Vip Fórmulas que fizeram parte do meu dia-a-dia no início da faculdade e com quem tanto aprendi.

À minha turma CBN 11 e também ao CBN 12 que me “acolheu” em tantas disciplinas que já considero como minha classe.

Aos colegas de CEIS pelos papos, risadas, coffees e conhecimento compartilhado. Sem vocês não teria finalizado esse trabalho! Ma Ceccato por todo conhecimento que me proporcionou ao longo desses últimos anos. Tha, que além de companheira de laboratório, me ajudou sempre que podia ao longo desse trabalho. Na Almeida, Na Lorenzon, Na Marin, Socorro, Ita, Vivi, Sandrinha, Amanda, Pam, Alex, Cintia, Ro, Necis, obrigada sempre queridos!

Às queridas Lari e Manu, mestres, mentoras, orientadoras! Vocês me mostraram o que é ser cientista de verdade, amando o seu trabalho e o fazendo sempre da melhor maneira possível! Jamais vou poder agradecer-las adequadamente por toda ajuda, sabedoria e orientação.

Ao pessoal “da abelha”, especialmente ao Sebastião que não só forneceu água para minhas amostras como também fazia o café de cada dia, possibilitando a conclusão desse trabalho.

Aos alunos do laboratório do Professor Mauricio Bacci, especialmente ao Miagui por possibilitar o uso dos equipamentos, bem como, por empréstimo de material quando foi necessário.

À Virginia por tornar possível a análise das amostras ao longo desse ano, manuseando o sequenciador.

Aos membros da banca avaliadora desse trabalho: Dra. Patricia Maltempo, Dr. Odair Bueno e Dr. Alessandro Vieira.

À professora Maria Santana pela identificação das formigas do trabalho.

Ao querido orientador Odair, pela orientação e pela oportunidade de trabalhar com formigas, pelas quais hoje sou apaixonada.

Por fim, agradeço ao financiamento da Fundunesp que fez com que esse trabalho fosse possível.

“Se podemos sonhar, podemos fazer.”
Walt Disney

RESUMO

As formigas do gênero *Cephalotes*, rapidamente identificadas por suas operárias polimórficas de cutícula resistente e cabeça achatada possuem seu sucesso ecológico creditado à sua dieta predominantemente generalista e nidificação em cavidades pré-existentes de troncos de árvores. Possuem hábitos exclusivamente arborícolas e ocorrem nos trópicos e subtropicais do Novo Mundo possuindo ampla distribuição geográfica. O grupo apresenta uma interessante associação com micro-organismos. No presente trabalho foi feita a caracterização molecular e estudo de relações filogenéticas do gênero através da amplificação e sequenciamento de fragmento do gene 28S do DNA Nuclear de três populações localizadas em Rio Claro-SP e São José do Rio Preto-SP de duas espécies de *Cephalotes*: *C. pusillus* e *C. clypeatus*. Também foi feito o levantamento da ocorrência e frequência do endossimbionte *Wolbachia* em sete populações de *Cephalotes* localizadas em São José do Rio Preto-SP, Guaraci-SP, São Carlos-SP, Araraquara-SP, Delfinópolis-MG e Rio Claro-SP; abrangendo três espécies: *C. pusillus*, *C. clypeatus* e *C. atratus*. Esse levantamento foi realizado com a utilização de ferramentas moleculares para a análise do gene codificador da proteína de superfície de membrana do endossimbionte, o wsp. Para análises de filogenia e também do endossimbionte, foi realizada a extração do DNA total de operárias, a amplificação do gene através da técnica de PCR utilizando os primers já estabelecidos e em seguida, as amostras foram sequenciadas pelo método de Sanger. Os resultados obtidos mostraram relações monofiléticas dentro da subfamília Myrmicinae, a qual pertence o gênero *Cephalotes*. As análises do gene 28S trouxeram resultados otimistas no estudo da caracterização molecular do grupo. Os resultados da análise do endossimbionte corroboraram com estudos anteriores com outras espécies do gênero *Cephalotes*, onde ocorreu alta incidência de infecção pela *Wolbachia*. Além disso, foram encontradas duas sequências inéditas nos exemplares analisados. A partir desses dados, análises filogenéticas poderão ser realizadas para inferir a história evolutiva dessa bactéria nas populações de *Cephalotes*.

Palavras-chave: Cephalotini, Wolbachia, Filogenia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. OBJETIVOS.....	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1. Coleta, identificação e conservação das amostras.....	14
3.2. Extração de DNA.....	15
3.3. Reação da polimerase em cadeia (PCR) - DNA Nuclear.....	16
3.4. Reação da polimerase em cadeia (PCR) – <i>Wolbachia</i> – wsp.....	17
3.5. Eletroforese em gel.....	17
3.6. Purificação da PCR e quantificação de DNA.....	18
3.7. Reação de sequenciamento de DNA e purificação dos produtos.....	19
3.8. Bioinformática.....	19
3.9. Análises Filogenéticas.....	19
4. RESULTADOS.....	21
4.1. Caracterização Molecular (DNA Nuclear).....	21
4.1.1. Bioinformática.....	21
4.1.2. Análises Filogenéticas.....	22
4.1.3. Rede de Haplótipos.....	23
4.2. <i>Wolbachia</i>	25
5. DISCUSSÃO.....	28
5.1. Caracterização Molecular.....	28
5.2. <i>Wolbachia</i>	30
6. CONCLUSÃO.....	32
7. REFERÊNCIAS	33

1- INTRODUÇÃO

As formigas estão inseridas em uma única família, a família Formicidae (BROTHERS, 1999). Estão distribuídas por todo o globo, excetuando-se os pólos (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990; BUENO & CAMPOS-FARINHA, 1999), e representam entre 15 a 20% da biomassa animal nas florestas tropicais, além de exercerem papéis chave em diversos ecossistemas (WILSON & HÖLLDOBLER, 2005). É um grupo particularmente importante dentro dos Neotrópicos, com cerca de 4000 espécies descritas da região (ANTWEB, 2015).

As formigas são de interesse particular não só por causa do papel ecológico diante de muitos ecossistemas terrestres, mas também devido ao fato delas possuírem repertórios impressionantes de comportamentos sociais (HOLLDOBLER & WILSON, 1990). Uma das características do sucesso evolutivo das formigas é a habilidade de formarem sociedades complexas com divisão de trabalho entre os indivíduos da colônia. Além destas interações sociais complexas, elas também mostram a capacidade extraordinária para constituir associações com outros organismos tais como outros insetos, plantas, fungos e bactérias (ZIENTZ et al., 2005).

Dentre as subfamílias de Formicidae, a mais prolífica e diversa é a subfamília Myrmicinae. Com aproximadamente 6475 espécies descritas – cerca de metade de todas as espécies de formigas – e muitas outras por serem descobertas, a subfamília Myrmicinae é um clado hiperdiverso que habita a maioria da superfície terrestre, englobando uma amplitude de estilos de vida, incluindo predadores generalistas e especialistas, detritívoros, onívoros, granívoros e herbívoros (KUGLER, 1979; BROWN, 2000).

As formigas Myrmicinae são objetos de estudo de intensa investigação sobre organização da colônia, comunicação, demografia e ecologia (DAVIDSON, 1977; TSCHINKEL, 2006) e apresentam um grande número de exemplos de simbiose com outros organismos (DAVIDSON & MCKEY, 1993; RUSSEL et al., 2009).

Dentro dessa subfamília tão diversa, encontram-se as formigas da tribo Cephalotini, excepcionais no fato de que mantêm microorganismos em seu trato digestivo (JAFFE et. al., 2001).

O gênero *Cephalotes*, da tribo Cephalotini, é essencialmente neotropical, alcançando a região neártica apenas em algumas partes do sul da Florida, Texas e Arizona, Estados Unidos. O gênero é formado por 177 espécies; a maioria polimórfica. A presença de soldados com um disco cefálico arredondado e côncavo (fragmose), usado para bloquear a entrada do ninho, é comum no gênero. Em algumas espécies, a rainha também apresenta este disco cefálico. As colônias são encontradas em troncos e galhos de arbóreas vivas ou mortas. As espécies são onívoras, mas ao que tudo indica o pólen é um importante item alimentar (DE ANDRADE; BARONI-URBANI, 1999).

As formigas-tartaruga, como são conhecidas, em função de sua placa dorsal em forma de casco (PRICE, 2014), são um dos mais diversos gêneros restringidos ao Novo Mundo (BOLTON, 2012) e a maioria das espécies descritas está limitada aos Neotrópicos (DE ANDRADE e BARONI-URBANI, 1999).

A tribo Cephalotini (subfamília Myrmicinae) compreende formigas arbóreas detentoras de peculiaridades biológicas complexas de grande importância na fauna neotropical, que frequentemente tem causado especulações aos mirmecologistas a respeito de sua anatomia única que é associada hábitos alimentares incomuns (HOLLDÖBLER & WILSON, 1990). Além disso, nas formigas desta tribo, existem indícios de que a musculatura circular resistente sirva também para aumentar o contato dos microrganismos com o material contido no lúmen (CAETANO et al., 2002).

Para investigar o potencial papel de microrganismos simbiotes, Russel e colaboradores (2009) fizeram o levantamento de 283 espécies de 18 subfamílias de formigas utilizando técnicas moleculares. O trabalho descobriu uma riqueza de bactérias entre as formigas. Dentre os hospedeiros estudados, estavam as formigas-tartaruga.

A nova técnica de Pirosequenciamento também revelou a presença de pelo menos 19 ordens de bactérias associadas às formigas-tartaruga herbívoras *Cephalotes varians* (KAUTZ et al., 2013), confirmando ser um grupo de formigas que merece ter a relação com simbiose estudada com mais detalhes.

A ocorrência de bactérias intracelulares, as chamadas endobactérias, é comum nos artrópodes. Análises em 63 espécies revelaram que 76% estavam

infectadas (JEYAPRAKASH & HOY, 2000). Extrapolações dessa estimativa sugerem que milhões de espécies de insetos podem estar infectadas por *Wolbachia*, fazendo dessa bactéria um dos principais simbiossiontes dos insetos (SHOEMAKER et al., 2003). Em formigas, de uma maneira geral, por terem expandido rapidamente propiciando interação com diversos táxons, estas podem ter adquirido *Wolbachia* através de diversas formas de parasitóides (DEDEINE et al., 2005).

A *Wolbachia* é uma endobactéria gram-negativa pertencente à Classe Alphaproteobacteria, Ordem Rickettsiales e não pode ser cultivada fora das células do hospedeiro, o que torna os estudos tradicionais de microbiologia um desafio. Entretanto, recentes avanços em métodos moleculares, particularmente o advento da PCR (Reação de Polimerização em Cadeia) e o uso de sequências do DNA, tornaram possível análises mais aprofundadas dessa bactéria. Um exemplo disso é o uso do gene *wsp*, utilizado por Zhou e colaboradores (1998), que codifica uma proteína de membrana da endobactéria para estudos moleculares que contemplam a identificação do endossimbionte no hospedeiro.

As diferentes variações de *Wolbachia* encontradas em formigas do Novo Mundo são mais relacionadas entre si e diferem de outras cepas encontradas em outros grupos de insetos, sugerindo que a bactéria se tornou especialista em formigas (TSUTSUI et al., 2003).

As diferentes cepas de *Wolbachia* são classificadas de acordo com a análise filogenética dos genes 16SrDNA, *wsp* e *ftsZ*, definindo supergrupos A, B, C, D, E e F, sendo A e B cepas encontradas em artrópodes, C e D em nematóides, E e F em Collembola, artrópodes e nematóides (FENN & BLAXTER, 2004). Recentemente, mais grupos foram propostos: G em aranhas (ROWLEY, RAVEN & MCGRAW, 2004) e H em cupins (BORDENSTEIN & ROSENGAUS, 2005). Essas bactérias podem causar alterações reprodutivas em seus hospedeiros de modo a aumentar a transmissão para as gerações subsequentes (BANDI et al., 1998; O'NEILL et al., 1992; STOUTHAMER et al., 1999).

Um estudo de Ramalho (2013) verificou uma alta incidência de infecção de operárias de *Camponotus textor* com múltiplas cepas de *Wolbachia*, o que poderia contribuir também para aumentar a diversidade de haplótipos mitocondriais, uma vez que a incompatibilidade citoplasmática causada por cepas

distintas poderia reduzir o fluxo gênico entre as colônias. A análise de *Wolbachia* pela técnica de MLST permitiu a incorporação de uma cepa inédita ao banco de dados pertencente ao supergrupo A (RAMALHO, 2013).

Martins, Souza e Bueno (2012) analisaram infecção por *Wolbachia* em formigas do gênero *Solenopsis* do Brasil e da Argentina, utilizando o gene *wsp* para realizar o estudo. Além de alta frequência de infecção (51%) também encontraram cepas dos supergrupos A e B. Martins (2014) utilizou a técnica multilocus com as mesmas populações e registrou 15 novas cepas em hospedeiros provenientes do Brasil, não havendo correlação entre distância geográfica e distribuição das cepas do estudo. A autora encontrou indícios de coevolução entre parasito e hospedeiro, mas não ocorrendo em padrão de cofilogenias.

Saux e colaboradores (2004) demonstraram o uso do gene nuclear 28S para tentar entender mais sobre a linhagem monofilética em formigas. Estudos moleculares são uma poderosa ferramenta para inferir as relações evolutivas e implementar mais análises de diversificação (MOREAU, 2014).

Silva (2015) caracterizou molecularmente operárias de *Wasmannia auropunctata* provenientes de 31 localidades do Brasil e da Colômbia também utilizando o gene 28S rDNA e descobriu 12 novos mitótipos e dois haplótipos nucleares inéditos.

O uso de dados de sequência de DNA, portanto, proporciona a mais promissora possibilidade em começar a revelar as relações entre linhagens de formigas, que irão levar a um melhor entendimento de sua evolução (MOREAU et al., 2006).

2 – OBJETIVOS

Dentro do contexto apresentado, os objetivos do presente trabalho foram: 1) realizar análises moleculares que permitirão um maior entendimento da evolução das espécies do gênero *Cephalotes*, através da caracterização molecular de 3 populações de 2 espécies coletadas de diferentes localidades; e 2) verificar a presença dos microorganismos presentes no organismo de espécies do gênero, em especial o endossimbionte *Wolbachia*.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Coleta, identificação e conservação das amostras

No presente trabalho foram analisadas oito populações e três espécies de formigas do gênero *Cephalotes*. São elas: *C. pusillus*, *C. clypeatus* e *C. atratus* (Figura1). As amostras foram coletadas (cerca de 30 indivíduos por colônia) nas cidades de Rio Claro, São José do Rio Preto, Guaraci, São Carlos e Araraquara; todas pertencentes ao estado de São Paulo e também na cidade de Delfinópolis, no estado de Minas Gerais (Tabela 1).

Os espécimes foram conservados em álcool 80% sob congelamento na temperatura de -20°C, para evitar a degradação do DNA. A identificação foi realizada utilizando a chave dicotômica de Andrade, M. L. & Baroni Urbani, C. (1999) pela Dra. Maria Santina de Castro Morini.

Tabela 1: Espécies do estudo com seus respectivos locais de coleta

População (código)	Espécie	Cidade/Estado	Coordenadas
1	<i>Cephalotes pusillus</i>	Rio Claro/ SP	S 22°23'43.5"/ W 47°32'32.5"
2	<i>Cephalotes clypeatus</i>	São José do Rio Preto/ SP	S 20° 47' 52,3"/ W 49° 22' 07,4"
5	<i>Cephalotes pusillus</i>	Guaraci / SP	S 20°29'25.1"/ W 48°55'49.5"
6	<i>Cephalotes pusillus</i>	São Carlos/ SP	S 21°59'41.9"/ W 47°54'11.2"
7	<i>Cephalotes pusillus</i>	Araraquara/ SP	S 21°48'41.5"/ W 48°11'09.1"
8	<i>Cephalotes pusillus</i>	Delfinópolis/ MG	S 20° 24' 47"/ W 46°40'25"
9	<i>Cephalotes atratus</i>	Delfinópolis/ MG	S 20° 24' 47"/ W 46°40'25"
10	<i>Cephalotes clypeatus</i>	Rio Claro/ SP	S 22°23'43.3"/ W 47°32'40.1"



Figura 1: *C. pusillus*, *C. clypeatus* e *C. atratus*. Fotos de Alex Wild.

3.2 - Extração de DNA

A extração do DNA total foi realizada através da maceração das operárias em eppendorfs de 1,5 mL contendo 50 μ L de solução de lise celular (TNES- Tris 250 mM, NaCl 2M, EDTA 100mM e SDS 2,5%). Cada eppendorf continha uma formiga e no total foram utilizadas dez formigas por população. Depois de feita a maceração, adicionou-se mais 550 μ L de TNES e 3 μ L de proteinase K (20mg/mL). O material foi em seguida incubado em banho térmico por 3 horas na temperatura de 55°C. Terminado esse processo, após as amostras retornarem à temperatura ambiente foi feita a precipitação de proteínas através da adição de 200 μ L de NaCl 5M. As amostras foram então agitadas no vórtex por 20 segundos em alta velocidade e em seguida centrifugadas a 15.000 g por 7 min. O sobrenadante obtido no processo foi transferido para novos tubos de 1,5 mL contendo 600 μ L de isopropanol 100%, para realizar a precipitação do DNA .

Os tubos foram invertidos gentilmente cerca de 50 vezes e em seguida centrifugados a 15.000 g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 600 μ L de etanol 70%, os tubos invertidos gentilmente novamente, dessa vez por cerca de 30 vezes e então foi centrifugado a 15.000 g por 5 min (MARANHÃO & MORAES, 2003). O etanol foi descartado cuidadosamente e as amostras foram centrifugadas a vácuo por 10 min na DNA 120 SpeedVac® da Thermo Savant. O pelet de DNA foi hidratado com 30 μ L de tampão TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH8). A confirmação da extração foi visualizada por eletroforese em um gel de agarose 1%, com tampão Tris-Borato EDTA (TBE 0,5 X).

A eletroforese é uma técnica que faz a separação de frações de moléculas orgânicas de acordo com sua carga elétrica e peso molecular pela migração destas

em um gel durante a aplicação de um potencial elétrico. O gel utilizado foi corado com Gel Red. A visualização foi feita através do sistema de fotodocumentação digital em luz UV num aparelho transiluminador (Figura 2).

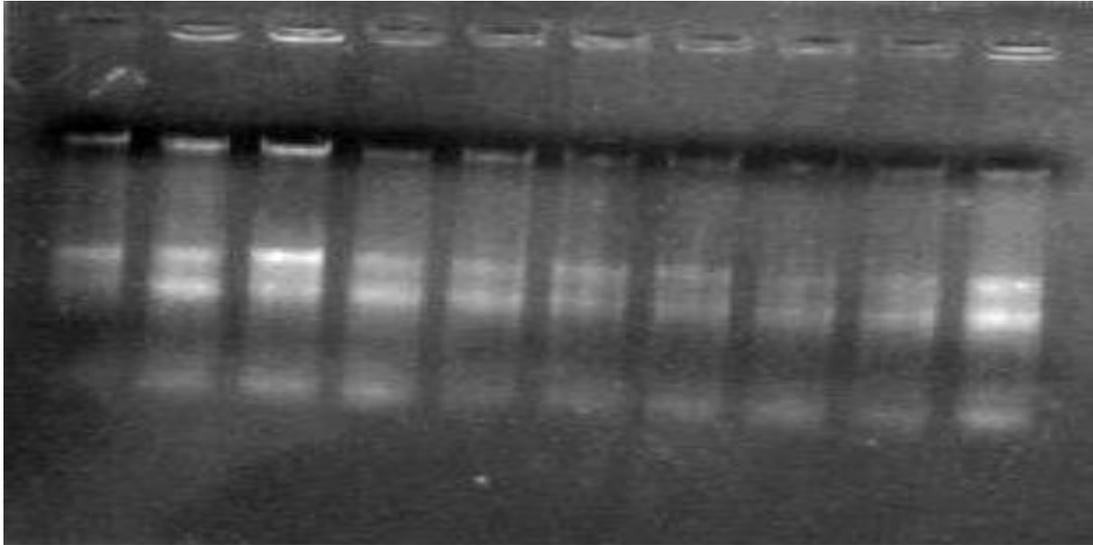


Figura 2: Extração de 10 indivíduos confirmada através de eletroforese. Foto tirada com o aparelho transiluminador que mostra o DNA sob luz UV apresentando fluorescência.

3.3 - Reação da polimerase em cadeia (PCR) - DNA Nuclear

Para realizar essa análise, o gene 28S do DNA Nuclear das formigas foi amplificado. Foram utilizadas três populações nessa etapa: as populações 1 e 10 de Rio Claro-SP (*C. pusillus* e *C. clypeatus*, respectivamente) e a população 2 de São José do Rio Preto-SP (*C. clypeatus*). O procedimento foi realizado em triplicata. As amplificações foram realizadas utilizando solução com volume total de 25 μL contendo 5 μL de 5x Go Taq Reaction Buffer (Promega), 2,0 μL dos primers 28S - 3665F (5' AGAGAGAGTTCAAGAGTACGTG 3') (BELSHAW; QUICKE, 1997) e 28S-4745R (5' ACACACTCCTTAGCGGA 3') (FRIEDRICH & TAUTZ, 1997); 2,5 μL de MgCl_2 (25 mM), 0,5 μL de dNTP, 0,13 μL de Taq DNA polimerase (Promega), 2 μL de DNA e 10,87 μL de H_2O Milli-Q. Após, as amostras foram colocadas no termociclador sendo submetidas aos seguintes ciclos: 1º estágio: 5 min a 94°C; 2º estágio: 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1:30 min a 56°C e 3 min a 72°C; 3º estágio: de 5 min a 70 °C.

3.4 - Reação da polimerase em cadeia (PCR) – *Wolbachia* - wsp

Para verificar se as formigas estavam infectadas com o endossimbionte *Wolbachia*, foi utilizado um par de primers que amplifica um fragmento variável de um gene codificador de proteína de superfície externa de membrana da bactéria, com cerca de 600 pb, o wsp (*Wolbachia Surface Protein*). Os primers são os seguintes: wsp81F (5'TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAAC 3') e wsp691R (5'AAAATTAACGCACTCCA 3') (BRAIG et al., 1998). Seguindo o protocolo de Frost et al. (2010), a análise foi feita utilizando oito indivíduos de cada uma das sete populações: População 2 de São José do Rio Preto-SP, População 5 de Guaraci-SP, População 6 de São Carlos-SP, População 7 de Araraquara-SP, Populações 8 e 9 de Delfinópolis-MG e População 10 de Rio Claro-SP. Também foi utilizada uma amostra de *Camponotus textor* (RAMALHO, 2013) como controle positivo do endossimbionte.

As amplificações foram realizadas utilizando solução com volume total de 25 µL contendo 5 µL de 5x Go Taq Reaction Buffer (Promega), 2 µL dos primers wsp81F (1 µM) e wsp691R (1 µM), 2,5 µL de MgCl₂ (25 mM), 0,5 µL de dNTP, 0,13 µL de Taq DNA polimerase (Promega), 2 µL de DNA e 10,87 µL de H₂O Milli-Q. Após preparo da solução, as amostras foram colocadas no termociclador sendo submetidas aos seguintes ciclos: 1º estágio: 1 min a 94°C; 2º estágio: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C e 1 min a 72°C; 3º estágio: 30 segundos a 94°C e 30 segundos a 59°C.

3.5 - Eletroforese em gel

A confirmação das amplificações foi detectada por eletroforese em gel de agarose 1%, com tampão Tris-Borato EDTA (TBE 0,5 X). O gel foi corado com Gel Red e a visualização foi feita através do sistema de fotodocumentação digital em luz UV num aparelho transiluminador (Figura 3).

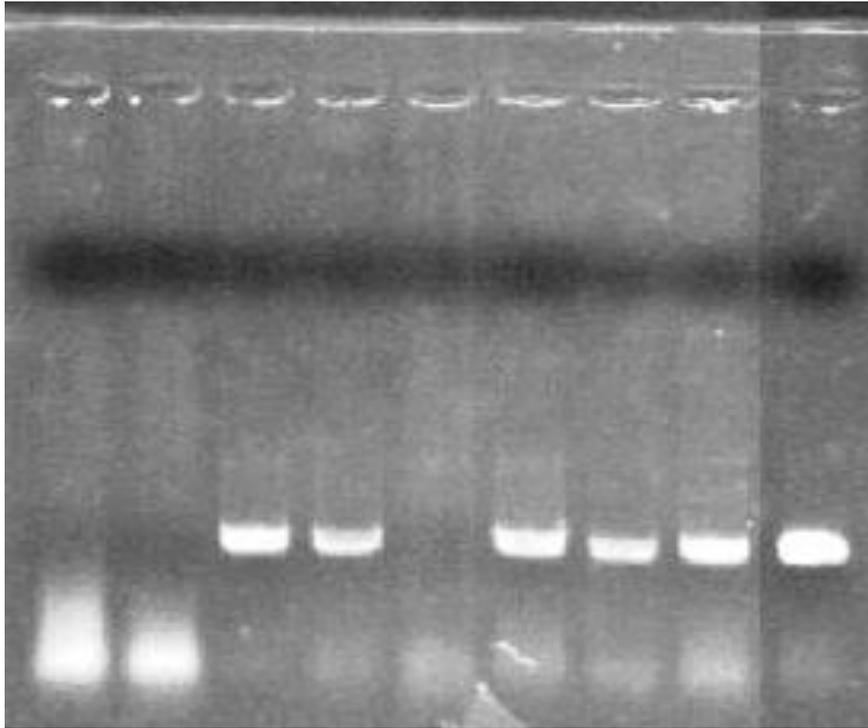


Figura 3: PCR de 8 indivíduos de *Cephalotes* e uma amostra de *Camponotus textor* utilizada como controle positivo confirmada através de eletroforese. Foto tirada com o aparelho transiluminador que mostra o DNA sob luz UV apresentando fluorescência. É possível observar que dos 8 indivíduos testados, 5 apresentaram infecção por *Wolbachia*, portanto, 62,5% dessa população apresenta infecção pelo endossimbionte.

3.6 - Purificação da PCR e quantificação de DNA

A purificação da PCR foi realizada utilizando o kit GFX PCR e Gel Band Purification Kit (GE Healthcare), seguindo as recomendações do fabricante para preparo das soluções. Após a purificação, as amostras foram submetidas à quantificação da concentração de DNA utilizando um aparelho NanoDrop 2000 ThermoScientific – Uniscience. Foi padronizado que somente as amostras que tivessem uma quantificação igual ou superior a 10ng/μL seriam sequenciadas, sendo que amostras com quantificação inferior passariam por novo processo de amplificação utilizando a técnica de PCR.

3.7 – Reação de sequenciamento de DNA e purificação dos produtos

Para realizar a reação de sequenciamento, foi necessário preparar duas soluções, uma para cada primer, utilizando com DNA na concentração de 20 ng/ μ L. Foi adicionado 2 μ L de Save Money 5X Sequencing Buffer, 0,3 μ L de Big Dye, 1 μ L de cada primer e H₂O Milli-Q para obter um volume final de 10 μ L, além de volume de DNA calculado para que a amostra apresentasse a concentração ideal (20 ng/ μ L). As amostras foram então colocadas no termociclador, onde foi utilizado programa específico pré-determinado. Após, foi feita a purificação da reação adicionando 1,2 μ L de acetato de sódio e de EDTA as amostras. Para a precipitação do DNA utilizou-se álcool. Após completa secagem do álcool das amostras, elas então seguiram para o sequenciamento no 3130 Genetic Analyzer automated sequencer (Applied Biosystems).

3.8 - Bioinformática

As sequências obtidas foram analisadas separadamente e editadas manualmente com o uso do programa BioEdit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999). Algumas bases foram excluídas no final e início do fragmento antes da realização das análises para evitar erros posteriores. Em seguida, as sequências foram alinhadas de modo a minimizar as diferenças entre elas utilizando o aplicativo ClustalW Multiple Alignment (HIGGINS et al., 1992). Foi criada para cada população uma sequência consenso e essa foi comparada as de outras espécies de *Cephalotes* depositadas no banco de dados (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e para a identificação de similaridade, utilizou-se o programa BLASTN.

3.9 – Análises Filogenéticas

As sequências consenso das populações de *Cephalotes* foram encaminhadas ao programa MEGA (KUMAR et al., 2004) para análise usando o modelo Kimura e rodando bootstrap com 1000 replicatas, o que gerou a árvore filogenética através da análise de *neighbor joining* (SAITOU; NEI, 1987). Para compor o grupo externo da análise foram adicionadas algumas sequências do gene 28S de outras espécies que

estão depositadas no GenBank e obtiveram similaridade. Também foi gerada uma rede de haplótipos com o programa Network 4510, usando o método *median-joining* (BANDELT; FORSTER; RÖHL, 1999).

4 – RESULTADOS

4.1– Caracterização Molecular (DNA Nuclear)

4.1.1 – Bioinformática

Todas as amostras obtiveram quantificação superior a 10ng/μL e foram então sequenciadas. Em seguida, foram analisadas no BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) no NCBI (National Center for Biotechnology Information) e comparadas a outras espécies no GenBank, apresentando em todos os casos alta similaridade com exemplares do gene 28S depositados no banco de dados. São eles: *Cephalotes atratus*, da Costa Rica e *Cephalotes texanus* dos Estados Unidos, códigos de acesso KJ859900.1 e KJ859901.1, respectivamente. (Figura 4).

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Cephalotes texanus voucher CAS:ENT.0106141 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	899	899	100%	0.0	99%	KJ859901.1
<input type="checkbox"/> Cephalotes atratus voucher CAS:ENT.0106296 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	899	899	100%	0.0	99%	KJ859900.1
<input type="checkbox"/> Strumigenys bioilevi voucher CAS:ENT.0106237 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	895	895	100%	0.0	98%	KJ860023.1
<input type="checkbox"/> Strumigenys ambatrix voucher CAS:ENT.0140727 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	895	895	100%	0.0	98%	KJ860022.1
<input type="checkbox"/> Rovidis notortholenes voucher CAS:ENT.0002259 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	895	895	100%	0.0	98%	KJ860011.1
<input type="checkbox"/> Rovidis longiseta voucher CAS:ENT.0120396 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	895	895	100%	0.0	98%	KJ860010.1
<input type="checkbox"/> Rhopalothrix isthmica voucher CAS:ENT.0235905 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	895	895	100%	0.0	98%	KJ860003.1
<input type="checkbox"/> Ochetomyrmex neopolitus voucher CAS:ENT.0106223 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	895	895	100%	0.0	98%	KJ859977.1
<input type="checkbox"/> Myrmica kotokui voucher CAS:ENT.0106286 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	895	895	100%	0.0	98%	KJ859967.1
<input type="checkbox"/> Crematogaster kelleri voucher CAS:ENT.0498885 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	895	895	100%	0.0	98%	KJ859905.1
<input type="checkbox"/> Adlerzia froquatti voucher CAS:ENT.0227591 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	895	895	100%	0.0	98%	KJ859875.1
<input type="checkbox"/> Pyramica hoplites 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	895	895	100%	0.0	98%	EF013056.1
<input type="checkbox"/> Messor andrei 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	895	895	100%	0.0	98%	EF013009.1
<input type="checkbox"/> Basiceros manni 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	895	895	100%	0.0	98%	EF012971.1
<input type="checkbox"/> Aphaenogaster albisetosa 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	895	895	100%	0.0	98%	EF012965.1
<input type="checkbox"/> Tetramorium taylori voucher CAS:ENT.0106297 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	890	890	100%	0.0	98%	KJ860048.1
<input type="checkbox"/> Tetramorium severini voucher CAS:ENT.0494149 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	890	890	100%	0.0	98%	KJ860046.1
<input type="checkbox"/> Talaridris mandibularis voucher CAS:ENT.0235384 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	890	890	100%	0.0	98%	KJ860038.1

Figura 4: Pode se observar a proximidade de 99% de identidade com o gene 28S de *C. texanus* e *C. atratus*, com o e-value de 0. Outras espécies de formigas apareceram na lista de proximidades, mas não com valores de identidade e e-value como aqueles citados acima.

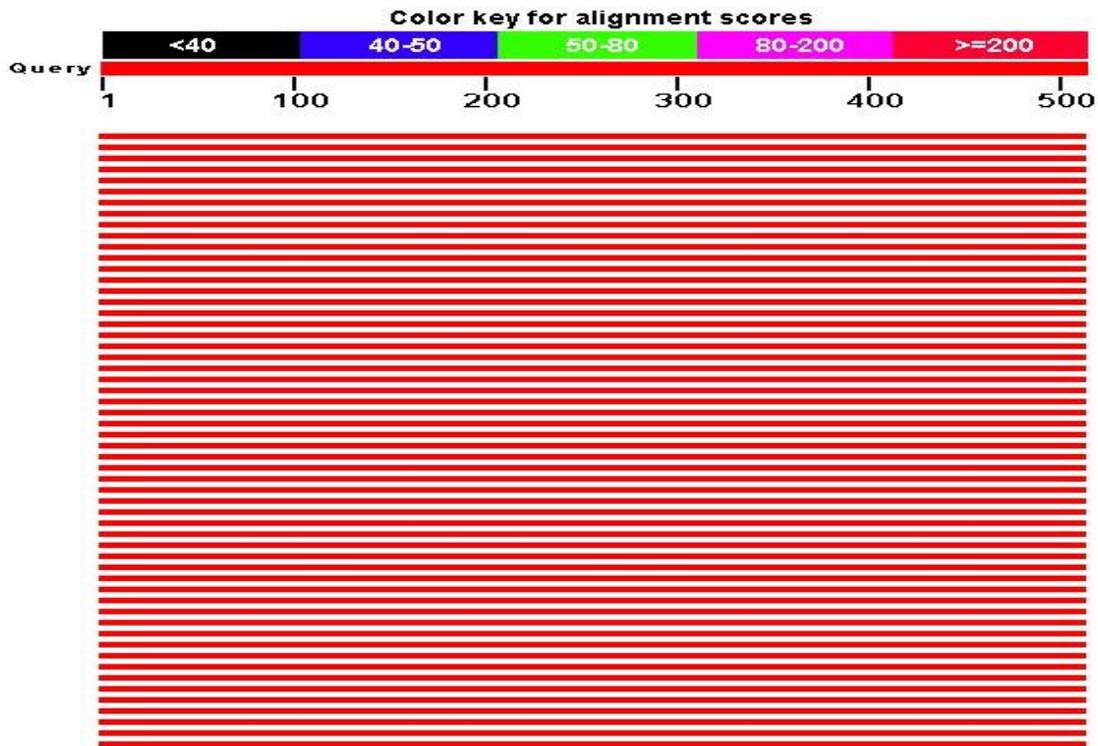


Figura 5: Gráfico gerado no NCBI com a ferramenta BLAST. Ele mostra a confiabilidade dos resultados obtidos (Figura 4), evidenciando a varredura de uma vasta região do gene nuclear 28S.

4.1.2 – Análises Filogenéticas

Para compor a árvore filogenética, resultante da análise *neighbor joining* (SAITOU; NEI, 1987) (Figura 6) foram adicionadas outras sequências do gene 28S de diferentes espécies depositadas no GenBank, utilizando como critério uma maior similaridade com as amostras estudadas: *Cephalotes texanus* dos Estados Unidos (código de acesso: KJ859901), *Cephalotes atratus* da Costa Rica (código de acesso: KJ859900), *Crematogaster kelleri* da ilha de Madagascar (código de acesso: KJ859905), *Monomorium ferodens* da ilha de Madagascar (código de acesso: KJ859952), *Strumigenys ludovici* da ilha de Madagascar (código de acesso: KJ860031) e *Strumigenys gundlachi* da Venezuela (código de acesso: KJ860030).

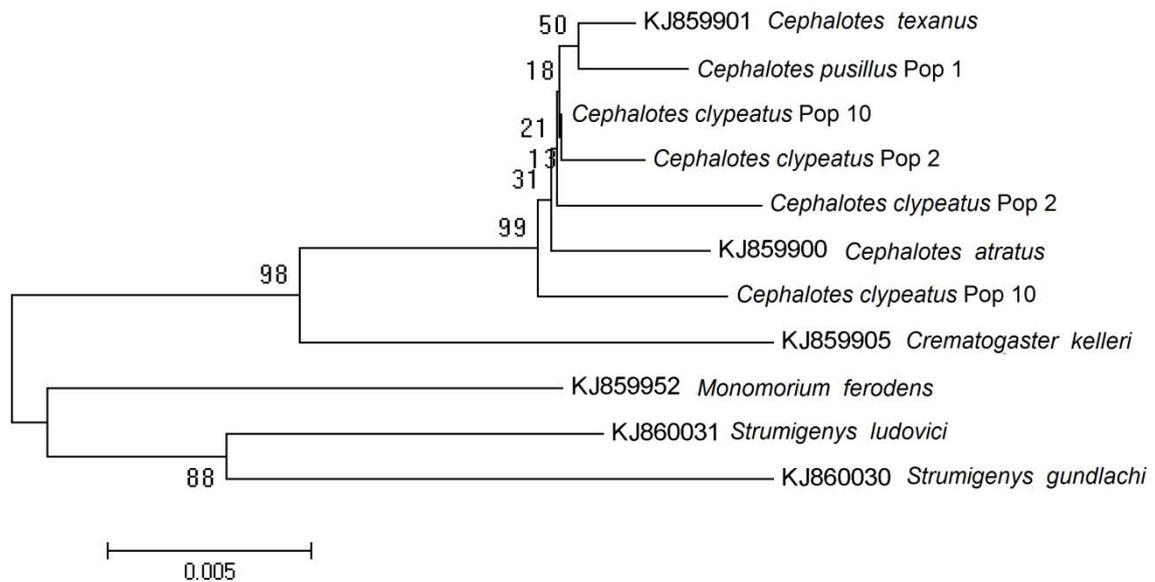


Figura 6: Árvore filogenética de *neighbor joining* elaborada a partir do gene 28S de populações de *Cephalotes*. Sequências com similaridade foram adicionadas do banco de dados para compor o grupo externo. Os números nos ramos representam os valores de bootstrap.

Ao analisar a árvore podemos ver que ela foi dividida em dois clados: um contendo os grupos externos com *Monomorium ferodens*, *Strumigenys ludovici* e *Strumigenys gundlachi*, todas pertencentes à subfamília Myrmicinae (WARD, 2015; MOREAU, 2006) e outro clado com um excelente valor de bootstrap (98) agrupando *Crematogaster kelleri* com as demais *Cephalotes*, sendo que as populações do estudo ficaram agrupadas juntamente com outras *Cephalotes* previamente depositadas no banco de dados. Ao analisar a filogenia podemos observar que as espécies mais relacionadas com as de estudo são justamente *C. texanus* e *C. atratus*, como foi possível verificar anteriormente com o uso da ferramenta BLAST.

4.1.3 – Rede de Haplótipos

As três populações analisadas: População 1 de *Cephalotes pusillus* e Populações 2 e 10 de *Cephalotes clypeatus*, além das amostras depositadas no GenBank formaram 11 haplótipos (Figura 7). H_1 corresponde à população de *Strumigenys ludovici*, H_2 a *Strumigenys gundlachi*, H_3 a *Monomorium ferodens*, H_4 a *Crematogaster kelleri*, H_5 a *Cephalotes texanus*, H_6 a *Cephalotes atratus*,

H_7 a *Cephalotes pusillus* Pop 1, H_8 a *Cephalotes clypeatus* Pop 10, H_9 a *Cephalotes clypeatus* Pop 10, H_10 a *Cephalotes clypeatus* Pop 2 e H_11 a *Cephalotes clypeatus* Pop 2.

É possível observar que os haplótipos H_1, H_2 e H_3 estão isolados num ramo, pois pertencem ao grupo externo. Já H_4 apresenta-se em outro ramo, distante dos três primeiros citados. Os haplótipos H_5 e H_6 pertencem ao mesmo gênero e ficaram distantes. Se tratando dos haplótipos referentes aos exemplares do estudo *C. pusillus* e *C. clypeatus* (H_7 e H_8), estes se mostraram distantes, sendo que se trata de populações coletadas em localidades muito próximas na cidade de Rio Claro-SP, e ainda, H_8 ficou distante dos outros exemplares de *C. clypeatus*. Os haplótipos H_9, H_10 e H_11 estão isolados em outro ramo. Trata-se das populações estudadas de *C. clypeatus*.

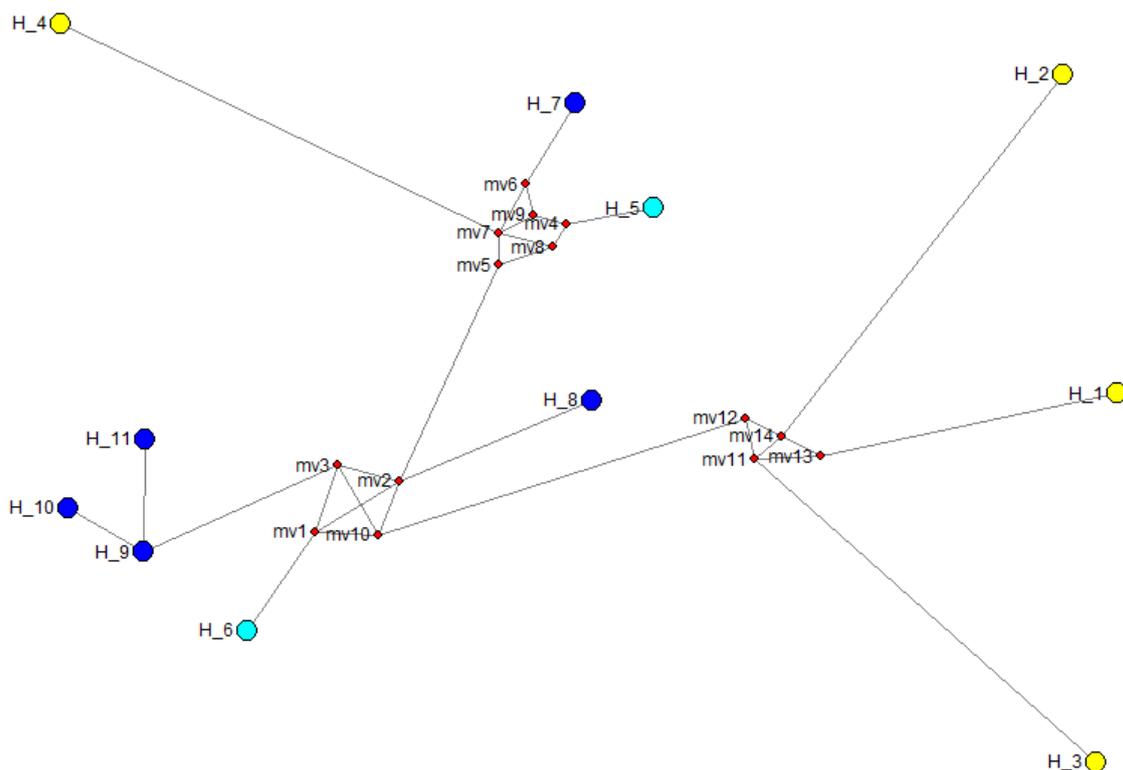


Figura 7: Rede de haplótipos gerada com as populações de *Cephalotes* sp. analisadas e grupo externo do GeneBank do gene 28S. H_1 corresponde a uma população de *Strumigenys ludovici*, H_2 a *Strumigenys gundlachi*, H_3 a *Monomorium ferodens*, H_4 a *Crematogaster kelleri*, H_5 a *Cephalotes texanus*, H_6 a *Cephalotes atratus*, H_7 a *Cephalotes pusillus* Pop 1, H_8 a *Cephalotes clypeatus* Pop 10, H_9 a *Cephalotes clypeatus* Pop10, H_10 a *Cephalotes clypeatus* Pop 2, H_11 *Cephalotes clypeatus* Pop 2. mv1 a mv14, indicam possíveis ancestrais hipotéticos; as linhas que ligam os haplótipos representam nucleotídeos divergentes entre eles.

4.2– *Wolbachia*

Através da amplificação do gene *wsp* foi possível evidenciar a presença e frequência de *Wolbachia* nas populações de formigas. A presença de *Wolbachia* foi observada em todas as populações analisadas de *Cephalotes* spp., variando na porcentagem de infecção (Figura 8).

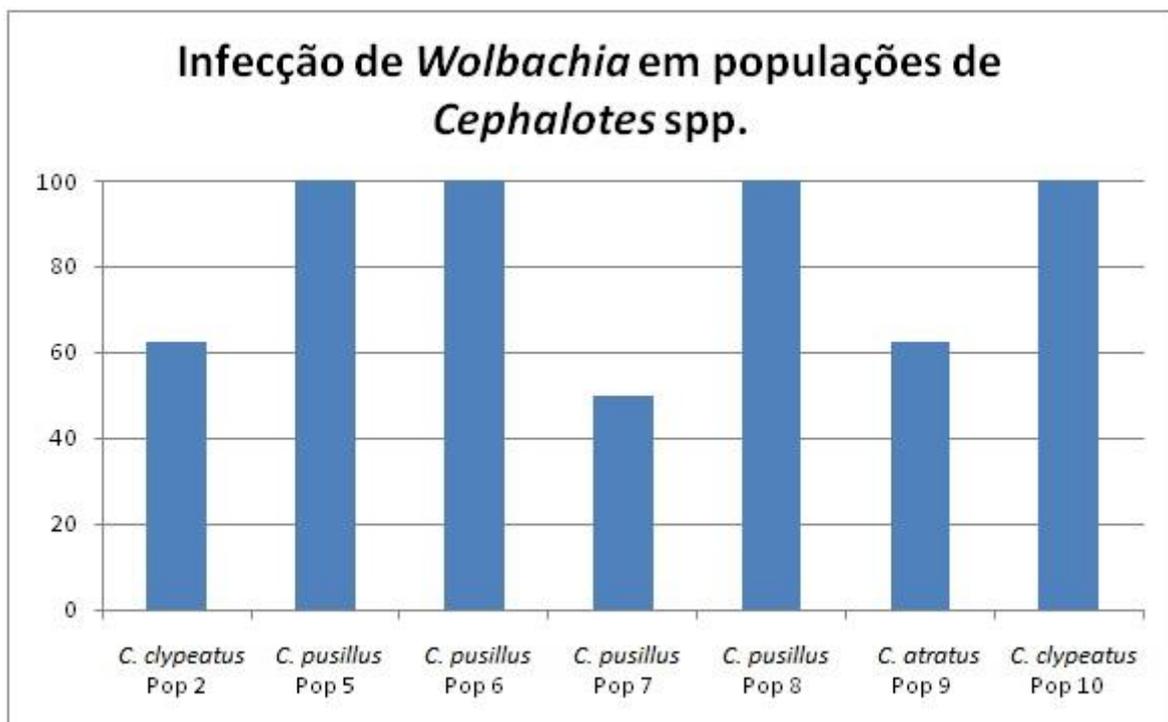


Figura 8: Porcentagem de infecção de *Wolbachia* em populações de *Cephalotes* spp. Note que todas as populações analisadas apresentaram indivíduos infectados.

Ao analisar os eletroferogramas das amostras notou-se a presença de múltiplos picos nas bases (Figura 9), evidenciando múltipla infecção por indivíduo. Ou seja, a formiga em questão possui mais de uma cepa de *Wolbachia*.

Das sete populações analisadas, cinco apresentaram múltipla infecção. São elas: *C. pusillus* de Guaraci-SP, São Carlos-SP e Araraquara-SP (Populações 5, 6 e 7, respectivamente); *C. atratus* de Delfinópolis-MG (População 9) e *C. clypeatus* de Rio Claro-SP (População 10).

Se tratando de resultados envolvendo infecções múltiplas, não é possível avançar nas pesquisas utilizando apenas as técnicas de PCR e sequenciamento de Sanger (1977).

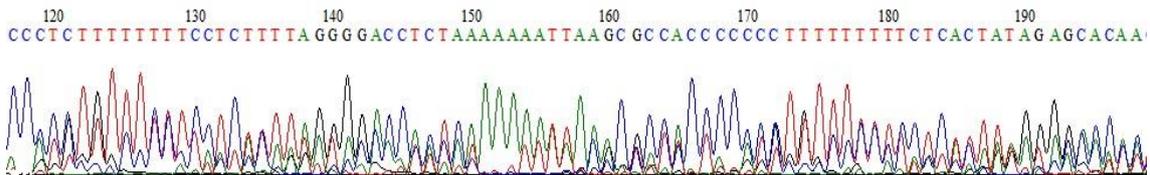


Figura 9: Eletroferograma de uma população de *Cephalotes pusillus* com múltipla infecção por *Wolbachia*.

Duas populações, no entanto, apresentaram infecção do tipo simples, ou seja, indivíduos infectados apenas por uma cepa de *Wolbachia*. São elas: *C. clypeatus* de São José do Rio Preto-SP (População 2) e *C. pusillus* de Delfinópolis-MG (População 8). As sequências foram analisadas no banco de dados PubMLST (www.pubmlst.org), e o programa mostrou similaridade com outras sequências depositadas. Descobriu-se uma sequência nova na População 2 de *C. clypeatus* com similaridade com a cepa depositada wsp351 (Figura 10). Após o sequenciamento foi constatado que trata-se de diferentes tipos de *Wolbachia* em cada população.

A sequência não obteve o tamanho necessário para a correta identificação. No entanto, ainda sim podemos observar 89 nucleotídeos diferentes em relação à sequência wsp351.

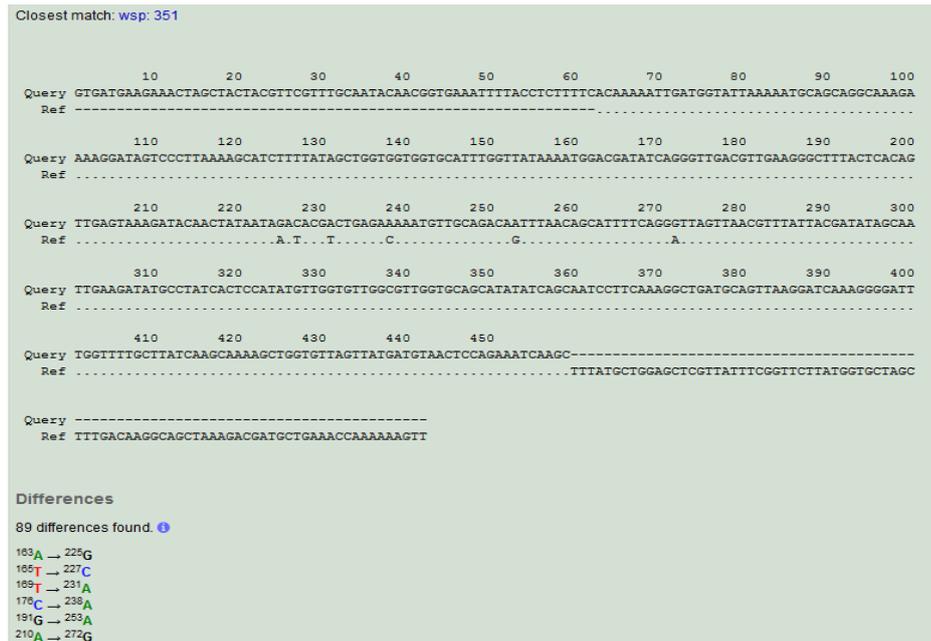


Figura 10: Alinhamento da sequência da População 2. A sequência não obteve o tamanho necessário para a correta identificação. No entanto, ainda sim podemos observar nucleotídeos diferentes em relação à sequência wsp351.

Já a Pop 8 ficou com um tamanho ideal para criar um perfil e ao alinhar com o banco de dados também voltou uma sequência inédita, dessa vez apenas com dois nucleotídeos diferentes do exemplar com maior similaridade, o wsp59 (Figura 11).

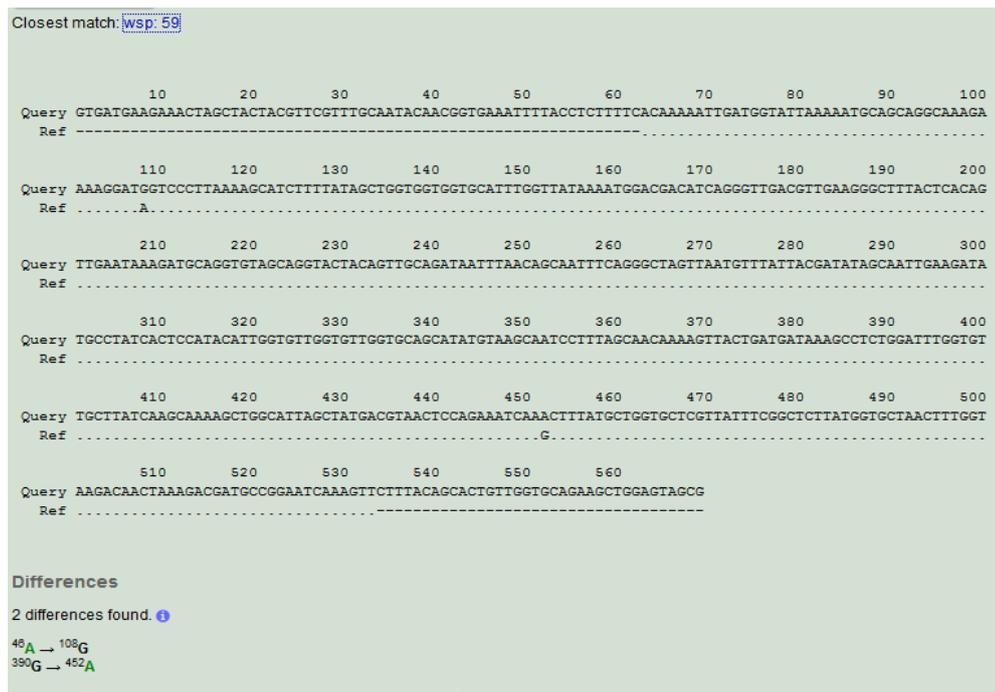


Figura 11: Alinhamento da sequência da Pop 8. Podemos observar que apresenta dois nucleotídeos diferentes em relação à sequência wsp59.

5– DISCUSSÃO

5.1 – Caracterização molecular

O presente trabalho tinha como um de seus objetivos caracterizar molecularmente espécies do gênero *Cephalotes*. Tanto a análise filogenética como a rede de haplótipos apresentaram o mesmo resultado, indicando alta confiabilidade dos resultados.

Ao analisar as sequências de Rio Claro-SP (*C. pusillus* e *C. clypeatus*) e São José do Rio Preto-SP (*C. clypeatus*) e compará-las com outras previamente depositadas no banco de dados GenBank encontrou-se alta similaridade com outras espécies de *Cephalotes*: *C. texanus* dos Estados Unidos e *C. atratus* da Costa Rica. A árvore filogenética encontrada apresentou altos valores de bootstrap e foi dividida em dois clados: um contendo as espécies *Monomorium ferodens*, *Strumigenys ludovici* e *Strumigenys gundlachi* como grupo externo; e outro com 98 de bootstrap que agrupou *Crematogaster kelleri* e as demais *Cephalotes*. Dentro deste clado, ficou clara a divisão de *Crematogaster kelleri* das demais *Cephalotes*, que se agruparam sob um valor de 99 de bootstrap, indicando que o gênero *Cephalotes* é monofilético, de acordo com o gene nuclear 28S. Dentro do clado de *Cephalotes*, porém, não foi obtido altos valores de bootstrap o que significa que não foi possível a distinção a nível espécie dos exemplares em questão.

Embora as análises feitas a partir da amplificação e sequenciamento do gene nuclear 28S tenham auxiliado no entendimento sobre a filogenia do gênero *Cephalotes*, estudos envolvendo outros genes tornam-se necessários para melhor compreender tal filogenia, uma vez que apenas o 28S não foi o suficiente para entender a nível de espécie. O uso de genes mitocondriais, por exemplo, pode ser uma boa alternativa. Price (2014) trabalhou com várias espécies de *Cephalotes* e ao sequenciar o gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI), comumente usado em estudos filogenéticos de formigas (MOREAU, 2006); obteve 1066pb, indicando que estudos posteriores utilizando genes mitocondriais podem ser de grande utilidade.

Em relação aos haplótipos que compõem o grupo externo, H_1, H_2 e H_3 encontram-se isolados num ramo e distantes de H_4, o que também foi observado na árvore filogenética, o que traz credibilidade para toda a análise. O haplótipo H_7

de *C. pusillus* apresenta-se mais relacionado com a *C. texanus*, enquanto o haplótipo H_6 de *C. atratus* apresenta proximidade do grupo formado pelos exemplares de *C. clypeatus*. Apenas o haplótipo H_8, referente a uma população de *C. clypeatus* se mostrou afastada dos outros haplótipos da mesma espécie, sendo que H_9, H_10 e H_11 que também são de *C. clypeatus* ficaram agrupados, mesmo que de locais diferentes (Rio Claro-SP e São José do Rio Preto-SP). A proximidade dos haplótipos H_9, H_10 e H_11 de exemplares de *Cephalotes clypeatus* mostra credibilidade da análise, visto que também foi mostrado na árvore filogenética, onde a espécie foi observada num grande clado de valor 99 de bootstrap, indicando relação entre elas. No entanto, o distanciamento do haplótipo H_8, também de *C. clypeatus* reforça a necessidade de estudos envolvendo mais genes, visto que o 28S não é o mais indicado pra esse tipo de estudo.

Ficou evidente que a rede de haplótipos apresentou proximidade por gênero e espécie e também por região geográfica. No caso do ramo das *Cephalotes clypeatus* ficou claro o agrupamento em nível de espécie. No caso de proximidade por região geográfica podemos ver os espécimes coletados em Madagascar *Strumigenys ludovici* e *Strumigenys gundlachi*, o que também indica proximidade por gênero. Já o haplótipo de *Crematogaster kelleri* também coletado em Madagascar mostrou-se distante dos outros exemplares do mesmo local. Não existe uma explicação muito bem estabelecida na literatura para tentar entender o ocorrido, pois estudos filogenéticos com a subfamília Myrmicinae apresentam resultados inconsistentes entre si (BRADY et al., 2006; MOREAU et al., 2006). Devido a essas inconsistências nos resultados dos trabalhos, Ward (2015) fez um estudo sobre as myrmicinae, analisando 11 genes nucleares, para uma maior confiabilidade de dados e combinou análises filogenéticas com análises biogeográficas. Concluiu que repetidas dispersões e radiações da subfamília devem ser levadas em conta como chave da evolução do grupo.

De maneira geral, a rede de haplótipos formada se mostrou congruente com a árvore filogenética, dando mais suporte aos dados aqui apresentados. Foi elucidado através da mesma árvore e também da rede de haplótipos, a alta similaridade que as populações desse estudo possuem com grupos de *Cephalotes* e também com outros grupos da sub-família Myrmicinae, depositados no GenBank.

5.2 – *Wolbachia*

Quando a fêmea transmite a *Wolbachia* para sua prole (através do citoplasma do óvulo) chamamos de infecção vertical (WERREN, 1997; STOUTHAMER et al., 1999); se a transmissão foi feita entre indivíduos de uma mesma espécie ou mesmo espécies hospedeiras diferentes chamamos de infecção horizontal (O'NEILL et al., 1992; VAVRE et al., 1999; DEDEINE et al., 2005; AHRENS & SHOEMAKER, 2005).

O alto índice de infecção observado pode ser explicado pelo fato dessa endobactéria ser transmitida através da fêmea infectada para a sua prole (transmissão vertical). Além disso, as formigas do gênero *Cephalotes* são em sua maioria generalistas, o que facilita o contato com outros grupos, inferindo, portanto, uma possível transmissão por interações ecológicas realizadas entre as formigas e outros artrópodes, a transmissão horizontal (WEST et al., 1998).

As espécies estudadas apresentam dieta generalista, se alimentando desde nectários extraflorais, secreções açucaradas oriundas de homópteros, frutas caídas no solo, fezes de aves, animais mortos, outros insetos e pólen (CORN, 1980).

Cephalotes clypeatus, por exemplo, alimenta-se inclusive de carcaça animal, como demonstrou Moretti (2006) em estudo na Universidade Estadual de Campinas utilizando carcaça de *Mus musculus* (RODENTIA, MURIDAE). As formigas foram observadas alimentando-se dos exudatos, tecidos da carcaça e de larvas de dípteros que se encontravam na carcaça (MORETTI, 2006).

Das sete populações de *Cephalotes* analisadas para o gene *wsp*, cinco apresentaram múltiplos picos no eletroferograma, o que caracteriza infecção múltipla, ou seja, o indivíduo está infectado por mais de uma cepa de *Wolbachia*. Segundo Werren (1997) indica contaminação vertical, tendo um indivíduo ancestral adquirido o endossimbionte e em seguida, passado durante as gerações subsequentes.

Apenas com a técnica de PCR e sequenciamento de Sanger (1977) não é possível distinguir essas cepas. Para poder realizar a análise das cepas presentes no indivíduo em questão seria necessário utilizar ferramentas moleculares diversas como, por exemplo, clonagem ou a técnica de Multilocus Sequence Typing (MLST), que utiliza cinco genes estáveis presentes no genoma da *Wolbachia* (PARASKEVOPOULOS et al., 2006; BALDO et al., 2005). Outras metodologias

para resolver essa questão estão sendo estudadas, como por exemplo: separação artificialmente das cepas por transinfecção (ZABALOU et al., 2004; MERÇOT; POINSOT, 1998), tratamento com antibiótico (DEDEINE et al., 2001; KOUKOU et al., 2006), cultura de células (O'NEILL et al., 1997), ou ainda a recente abordagem de Análise de Intersecção de Alelo (AIA) (ARTHOFER et al., 2011).

Como demonstrado nos resultados, duas populações apresentaram infecção simples e o sequenciamento por Sanger (1977) foi então realizado. Uma das sequências não teve um tamanho ideal que possibilitasse correta identificação, mesmo assim foi possível observar diversos nucleotídeos diferentes quando comparada com a sequência wsp 351. A segunda sequência apresentou tamanho ideal para identificação e foi possível observar diferença de 2 nucleotídeos em comparação com a wsp 59. Essa sequência foi encontrada em formigas do gênero *Polyergus* (Subfamília Formicinae) e *Myrmica* (Subfamília Myrmicinae), essa última sub-família sendo a qual pertence o gênero *Cephalotes*. A sequência wsp 59 mostrou-se, portanto, não exclusiva do gênero *Cephalotes* e de sua subfamília, sugerindo que mais estudos poderão levar a um maior entendimento da história evolutiva da subfamília Myrmicinae e também do endossimbionte, bem como a relação entre eles.

Os resultados aqui levantados corroboram com estudos anteriores, como por exemplo, o estudo de Kautz e colaboradores (2013) que evidenciaram a infecção por *Wolbachia* em *Cephalotes varians*. Os autores utilizaram o método de pirosequenciamento e amplificaram o gene 16S rRNA através do uso de primers universais para eubactérias.

Além disso, as duas sequências analisadas se tratam de sequências inéditas. Esses dados sugerem que ao dar continuidade no presente trabalho existe a possibilidade de descoberta de uma nova cepa de *Wolbachia*.

6- CONCLUSÃO

Os resultados das análises filogenéticas obtidos através da amplificação e sequenciamento do gene 28S mostrou resultados importantes e que podem ser utilizados para maior entendimento da história evolutiva do gênero *Cephalotes* e até mesmo da subfamília Myrmicinae, a qual o gênero pertence.

Entretanto, fica evidente que apenas o uso do gene 28S não pode responder todas as questões referentes à evolução e filogenia do gênero, uma vez que os dados obtidos não são suficientes para evidenciar diferenciação em nível de espécie. Faz-se necessário o uso de análises envolvendo genes mitocondriais para completar os estudos, visto que esses são muito utilizados entre os geneticistas para identificação de espécies (BENZIE et al., 2002).

Os resultados da análise de infecção por *Wolbachia* obtidos nesse estudo corroboraram com estudos anteriores que mostraram que o gênero apresenta a endobactéria (KAUTZ et al., 2013).

No presente estudo a amplificação e sequenciamento do gene *wsp* permitiu observar a múltipla infecção em cinco populações de *Cephalotes*. No entanto, duas populações apresentaram infecção simples, e ao analisá-las foi possível observar a descoberta de duas sequências inéditas. Ficou evidente a necessidade de estudos futuros para entender melhor a filogenia e as relações desse endossimbionte nas populações de *Cephalotes*. Também fica evidente o cenário promissor do presente trabalho, e dar continuidade nas análises do estudo possivelmente trará a descoberta de uma nova cepa.

7 – REFERÊNCIAS

AntWeb. Disponível em <https://www.antweb.org>. Acesso em 17 de Setembro de 2015.

AHRENS, M. E.; SHOEMAKER, D. **Evolutionary history of Wolbachia infections in the fire ant *Solenopsis invicta*.** BMC Evolutionary Biology. v. 5, p. 35. 2005b.

ARTHOFER, W.; STEINER, F. M.; SCHLICK-STEINER, B. C. **Rapid and cost-effective screening of newly identified microsatellite loci by high-resolution melting analysis.** Molecular genetics and genomics, v. 286, n. 3-4, p. 225-235, 2011.

Banco de dados PubMLST. Disponível em <https://www.pubmlst.org>. Acesso em 23 de Setembro de 2015.

BANDELT, H. J.; FOSTER, P.; RÖHL, A. **Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies.** Molecular Biology and Evolution, v. 16, p. 37-48, 1999.

BANDI, C. et al. **Phylogeny of Wolbachia in filarial nematodes.** Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Science. v. 265, p. 2407-2413. 1998.

BALDO, L.; LO, N.; WERREN, J. H. **Mosaic nature of the *Wolbachia* surface protein.** Journal of Bacteriology. v. 187, p. 5406-18. 2005.

BENZIE, J. et al. **Mitochondrial DNA variation in Indo-Pacific populations of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*.** Molecular Ecology, v.11, p.2553– 2569. 2002.

BOLTON, B. **An online catalog of the ants of the World.** Disponível de <http://www.antcat.org>. 2012

BORDENSTEIN, S. & ROSENGAUS, R. B. **Discovery of a novel *Wolbachia* supergroup in Isoptera.** Current microbiology, v. 51, n. 6, p. 393-398, 2005.

BRADY, S. G. et al. **Evaluating alternative hypotheses for the early evolution and diversification of ants.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 103, n. 48, p. 18172-18177, 2006.

BRAIG, H. R. et al. **Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia*.** The Journal of Bacteriology, v. 180, p. 2373-2378, 1998.

BROTHERS, D. J. **Phylogeny and evolution of wasps, ants and bees (Hymenoptera, Chrysidoidea, Vespoidea and Apoidea).** Zoologica Scripta, v. 28, n. 1-2, p. 233-250, 1999.

BROWN, W. L. Jr. **Diversity of ants.** Ants Standard Methods for Measuring and Monitoring Biodiversity (ed. by D. Agosti, J.D.Majer, L.E. Alonso and T.R. Schultz), pp. 45–79. Smithsonian Institution Press, Washington, DC. . 2000.

BUENO, O.C. & CAMPOS-FARINHA, A.E. de C. **As formigas domésticas.** In: MARICONI, F.A.M. (Coord). Insetos e outros invasores de residências. Piracicaba: FEALQ. p.135-180, 1999.

CAETANO, F. H.; JAFFÉ, K.; ZARA, F. J. **Formigas: Biologia e Anatomia.** 1. ed. Rio Claro: Editora Topázio, 131 p. 2002.

CORN, M. L. **Polymorphism and polyethism in the neotropical ant *Cephalotes Atratus* (L.).** Insectes Sociaux Volume 27, Issue 1 , pp 29-42, 1980.

DAVIDSON, D. W. **Species diversity and community organization in desert seed-eating ants.** Ecology, p. 712-724, 1977.

DAVIDSON, D. W.; MCKEY, D. **Ant-plant symbioses: stalking the Chuyachaqui.** Trends in ecology & evolution, v. 8, n. 9, p. 326-332, 1993.

DE ANDRADE, M. L.; BARONI-URBANI, C. **Diversity and adaptation in the ant genus *Cephalotes*, past and present (Hymenoptera, Formicidae)**. Stuttgarter Beitrage Naturkunde Ser. B (Geol. Palaontol.) 271, 1–889. 1999.

DEDEINE, F. et al. **Removing symbiotic *Wolbachia* bacteria specifically inhibits oogenesis in a parasitic wasp**. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 98, n. 11, p. 6247-6252, 2001.

DEDEINE, F. et al. **Social parasitism in fire ants (*Solenopsis* spp.): a potential mechanism for interespecies transfer of *Wolbachia***. Molecular Ecology. v.14, p.1543-1548, 2005.

FENN, K.; BLAXTER, M. **Are filarial nematode *Wolbachia* obligate mutualist symbionts?** Trends in ecology & evolution, v. 19, n. 4, p. 163-166, 2004.

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

FROST, C. L. et al. **Multiple gains and losses of *Wolbachia* symbionts across a tribe of fungus growing ants**. Molecular Ecology, v. 19, p. 4077–4085, 2010.

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

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

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

JAFFE, K. et al. **Sensitivity of ant (*Cephalotes*) colonies and individuals to antibiotics implies feeding symbiosis with gut microorganisms**. Canadian Journal of Zoology, 79(6): 1120-1124, 10.1139/z01-079. 2001.

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

KAUTZ, S. et al. **Surveying the microbiome of ants: comparing 454 pyrosequencing with traditional methods to uncover bacterial diversity**. Applied and environmental microbiology, v. 79, n. 2, p. 525-534, 2013.

KOUKOU, K. et al. **Influence of antibiotic treatment and Wolbachia curing on sexual isolation among *Drosophila melanogaster* cage populations**. Evolution, v. 60, n. 1, p. 87-96, 2006.

KUGLER, C. **Evolution of the sting apparatus in themyrmicine ants**. Evolution, 33, 117–130. 1979.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. **MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment**. Briefings in bioinformatics, v. 5, n. 2, p. 150-163, 2004.

MARANHÃO, A. Q.; MORAES, L. M. P. **Extração e purificação de DNA**. In: AZEVEDO, M. O. et al. (Org)s. Técnicas básicas em biologia molecular, Brasília: UnB,. 72 p. 2003.

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

MARTINS, C.; SOUZA, R. F.; BUENO, O. C. **Presence and distribution of the endosymbiont *Wolbachia* among *Solenopsis* spp. (Hymenoptera: Formicidae) from Brazil and its evolutionary history.** Journal of invertebrate pathology, v. 109, n. 3, p. 287-296, 2012.

MERÇOT, H.; POINSOT, D. ***Wolbachia* transmission in a naturally bi-infected *Drosophila simulans* strain from New-Caledonia.** Entomologia experimentalis et applicata, v. 86, n. 1, p. 97-103, 1998.

MOREAU, C. S. et al. **Phylogeny of the Ants: Diversification in the Age of Angiosperms.** Science Vol. 312 no. 5770 pp. 101-104. 7 April 2006.

MOREAU, C. S. **A practical guide to DNA extraction, PCR, and gene-based DNA sequencing in insects.** Field Museum of Natural History, Department of Science and Education, Integrative Research Center, 1400 South Lake Shore Drive, Chicago, Illinois, 60605, USA. HALTERES, Volume 5, 32-42, 2014.

MORETTI, T. C. & RIBEIRO, O. B. ***Cephalotes clypeatus* Fabricius (Hymenoptera: Formicidae): hábitos de nidificação e ocorrência em carcaça animal.** Neotrop. Entomol. [online]. vol.35, n.3, pp. 412-415. ISSN 1678-8052. 2006.

O'NEILL, S. L. et al. **16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects.** Proceedings of the National Academy of Science. v. 89, p. 2699-2702. 1992.

O'NEILL, S. L. et al. **Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction.** Oxford University Press, 1997.

PARASKEVOPOULOS, C. et al. **Toward a *Wolbachia* multilocus sequence typing system: discrimination of *Wolbachia* strains present in *Drosophila* species.** Current microbiology, v. 53, n. 5, p. 388-395, 2006.

PRICE S. L. et al. **Renewed diversification is associated with new ecological opportunity in the Neotropical turtle ants.** Journal of Evolutionary Biology, 2014.

RAMALHO, M. O. **Análises moleculares e da presença de endobactérias de *Camponotus textor* Forel, 1899 (Hymenoptera, Formicidae)**. 2013. 99 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Biologia Celular e Molecular)
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Rio Claro, 2013.

ROWLEY, S.M.; RAVEN, R. J.; MCGRAW, E. A. ***Wolbachia pipientis* in Australian spiders**. Current microbiology, v. 49, n. 3, p. 208-214, 2004.

RUSSELL, J. A. et al. **Bacterial gut symbionts are tightly linked with the evolution of herbivory in ants**. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 106, n. 50, p. 21236-21241, 2009.

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

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. **DNA sequencing with chain termination inhibitors**. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SAUX, C.; FISHER, B. L.; SPICER, G. S. **Dracula ant phylogeny as inferred by nuclear 28S rDNA sequences and implications for ant systematics (Hymenoptera: Formicidae: Amblyoponinae)**. Molecular Phylogenetics and Evolution, v. 33, n. 2, p. 457-468, 2004.

SHOEMAKER, D. D. et al. **Distribution and prevalence of Wolbachia infections in native populations of the fire ant *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae)**. Population Ecology. v. 32, p. 1329-1336. 2003a.

SILVA, L. M. R. **Análises moleculares de populações de *Wasmannia auropunctata* ROGER, 1863 (HYMENOPTERA, FORMICIDAE) e da presença de endossimbiontes**. 44 f. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas - Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2015.

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

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

TSUTSUI, N. D. et al. **The distribution and evolutionary history of *Wolbachia* infection in native and introduced populations of the invasive argentine ant *Linepithema humile*.** Molecular Ecology, v. 12, p.3057-3068, 2003.

VAVRE, F. et al. **Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations.** Molecular Biology and Evolution. v.16, p. 1711-1723, 1999.

WARD, P. S. et al. **The evolution of myrmicine ants: phylogeny and biogeography of a hyperdiverse ant clade (Hymenoptera: Formicidae).** Systematic Entomology, v. 40, n. 1, p. 61-81, 2015.

WEST, S. A. et al. ***Wolbachia* in two insect host–parasitoid communities.** Molecular Ecology, v. 7, n. 11, p. 1457-1465, 1998.

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

WILSON, E. O.; HÖLLDOBLER, B. **The rise of the ants: a phylogenetic and ecological explanation.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 102, n. 21, p. 7411-7414, 2005.

ZABALOU, S. et al. ***Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility as a means for insect pest population control.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 101, n. 42, p. 15042-15045, 2004.

ZIENTZ, E. et al. **Insights into the microbial world associated with ants**. Archives of microbiology, v. 184, n. 4, p. 199-206, 2005.

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