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

**ANÁLISES MOLECULARES DAS FORMIGAS LAVA-PÉS (*Solenopsis* spp.)
(HYMENOPTERA: FORMICIDAE) E DA PRESENÇA DA ENDOBACTÉRIA
*Wolbachia***

CÍNTIA MARTINS

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.

Fevereiro - 2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

CÍNTIA MARTINS

**ANÁLISES MOLECULARES DAS FORMIGAS LAVA-PÉS
(*Solenopsis* spp.) (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) E DA
PRESENÇA DA ENDOBACTÉRIA *Wolbachia***

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

Orientador: Odair Correa Bueno

**Rio Claro
2010**

595.796 Martins, Cíntia
M3862a Análises moleculares das formigas lava-pés (*Solenopsis*
spp.) (Hymenoptera: Formicidae) e da presença da
endobactéria *Wolbachia* / Cíntia Martins. - Rio Claro : [s.n.],
2010
85 f. : il., figs., tabs.

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

1. Formiga. 2. Endossimbiontes. 3. DNA mitocondrial. 4.
Análise filogenética. I. Título.

Agradecimentos:

Agradeço, primeiramente, à minha família pelo apoio durante todos esses anos e especialmente ao meu querido marido pelo apoio, compreensão, dedicação durante essa fase cheia de experimentos e trabalhos aos finais de semana, companheirismo, amizade, e pela calma que me proporcionou nos momentos difíceis de execução dessa dissertação.

Agradeço especialmente ao meu querido orientador, Odair Correa Bueno, pelos ensinamentos e por sua dedicação impecável como orientador, que sempre esteve presente no decorrer desse trabalho, orientando, aceitando minhas discussões tão difíceis de entender e tornando-as compreensíveis e pela confiança em minha capacidade de tornar possível esse desafio que propusemos para essa dissertação.

Agradeço imensamente ao professor Dr. Fernando Portella de Luna Marques, pela ajuda e observações realizadas nas análises filogenéticas desse trabalho.

Agradeço ao meu novo companheiro de laboratório e de área de pesquisa, Rodrigo, que chegou na metade do meu mestrado e trouxe discussões extremamente importantes sobre o assunto, além de muito conhecimento.

Agradeço à querida Ita, por estar sempre muito disposta e animada para tudo. Obrigada pelas coletas realizadas, especialmente por ter viajado para tão longe para realizá-las.

Agradeço especialmente às queridas amigas Aline e Marcela pela amizade, pelas conversas descontraídas e pela ajuda imensa em minhas coletas no sul do país.

Aos demais amigos: Cynara, pela amizade e ótimo astral e pela ajuda imensa nas clonagens. Ao Joaquim pela ajuda nas análises. E aos demais amigos que estão sempre presente e que colaboraram de forma direta ou indireta para a realização desse trabalho.

À Necis, Lú e Olívia que prestaram socorro em vários momentos!

Ao querido professor Dr. José Chaud Netto, pelos ensinamentos na graduação que em parte me fizeram escolher o “caminho da evolução” para estudar por toda minha vida, e pela sua contribuição e excelentes observações em minha banca de qualificação.

Ao Centro de Estudos de Insetos Sociais por sua estrutura e laboratórios que tornaram possível a realização dessa dissertação.

Ao CNPq pelo apoio financeiro concedido.

Ao programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular e especialmente à sua coordenadora professora Dra. Carmem S. F. Christofolletti, pelo apoio e pela participação em minha banca de qualificação.

Resumo

O gênero *Solenopsis* tem distribuição cosmopolita, mas espécies do grupo *S. saevissima*, são nativas da América do Sul e inclui as conhecidas formigas lava-pés. Elas foram introduzidas de forma acidental em diversas regiões biogeográficas do mundo. No Brasil possuem ampla distribuição, mas têm preferência por áreas de atividade humana. São formigas altamente agressivas e são responsáveis por acidentes que podem levar a choques anafiláticos e à morte. As formigas apresentam associações de diferentes tipos com outros organismos, inclusive com bactérias endossimbiontes como a *Wolbachia*, bactéria intracelular que também infecta as formigas do gênero *Solenopsis*. No presente trabalho, procurou-se caracterizar as populações de lava-pés (*Solenopsis* spp.) de ampla área do território brasileiro, analisando o parentesco dessas populações e inferindo sobre sua filogenia. Além disso, foi investigada a presença, frequência e distribuição do endossimbionte *Wolbachia* em populações de *Solenopsis* spp. no Brasil. A caracterização das lava-pés foi baseada na análise do gene citocromo oxidase I e em estudos filogenéticos. Observou-se desde completa coerência geográfica, até polifilia para as espécies *S. invicta* e *S. saevissima*, o que demonstra claramente a diversidade desse gênero de formigas no Brasil. Existe a possibilidade de ocorrer populações isoladas reprodutivamente, tendo como decorrência processos evolutivos de especiação. Além disso, clados com espécies divergentes agrupadas podem trazer evidências de espécies erroneamente identificadas morfológicamente, presente em bancos de dados. O levantamento da ocorrência de *Wolbachia* foi baseado no gene *wsp* do endossimbionte e análises filogenéticas foram realizadas para inferir a história evolutiva dessas bactérias nas populações de lava-pés do país. Foi encontrada uma grande diversidade de *Wolbachia* no gênero *Solenopsis*, com 51% das colônias analisadas apresentando infecção e a maior incidência em populações do sul do Brasil. Pequena variabilidade foi encontrada entre as diferentes cepas de *Wolbachia* dentro dos supergrupos A e B. Os resultados também sugerem que transmissões horizontais podem estar ocorrendo a partir do parasita social *S. daguerrei*.

Palavras-chave: *Solenopsis* / formigas lava-pés / endossimbiontes / *Wolbachia* / DNA mitocondrial / análise filogenética.

Abstract

The genus *Solenopsis* has a cosmopolitan distribution, but species of *S. saevissima* group are native from South America and include the known fire ant. They were accidentally introduced in several countries of the world. In Brazil they have wide distribution with preference for areas of human activity. Ants are highly aggressive and responsible for accidents that can lead to anaphylactic shock and death. The ants have different associations with other organisms, including bacteria endosymbionts such as *Wolbachia*, intracellular bacteria that also infect the ants of the *Solenopsis* genus. In this study, we sought to characterize the populations of fire ants (*Solenopsis* spp.) in a wide area of Brazil, analyzing the relationship of these populations and inferring their phylogeny. Furthermore, we investigated the presence, frequency and distribution of the endosymbiont *Wolbachia* in those populations of *Solenopsis* spp. in Brazil. The characterization of fire ants was based on analysis of the cytochrome oxidase I gene and on phylogenetic studies. It was observed that there were complete geographical coherence and polyphyly for the species *S. invicta* and *S. saevissima*, which clearly demonstrate the diversity of this genus of ants in Brazil. There is the possibility to occur reproductively isolated populations, leading to evolutionary processes of speciation. Furthermore, clustered clades with divergent species can bring evidences of species wrong morphologically identified, presents in databases. The survey of the occurrence of *Wolbachia* was based on the *wsp* gene of the endosymbiont and the phylogenetic analyses were performed to infer the evolutionary history of these bacteria in the populations of fire ants. There was a great diversity of *Wolbachia* in the genus *Solenopsis*, with 51% of the analyzed colonies presenting infection and the highest incidence was found in populations from southern Brazil. Low variability was found among the different strains of *Wolbachia* within the A and B supergroups. The results also suggest that horizontal transmission may be occurring from the social parasite *S. daguerrei*.

Keywords: *Solenopsis* / fire ants / endosymbionts / *Wolbachia* / mitochondrial DNA / phylogenetic analysis.

SUMÁRIO

| | Página |
|---|--------|
| Introdução | 06 |
| Objetivos | 16 |
| Apresentação | 17 |
| Referências | 18 |
| Artigo 1 | 25 |
| CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE FORMIGAS <i>Solenopsis</i> spp. (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) DO BRASIL, ATRAVÉS DA ANÁLISE DO GENE MITOCONDRIAL CITOCROMO OXIDASE I (COI) | 26 |
| Resumo | 26 |
| Introdução | 26 |
| Objetivos | 29 |
| Material e Métodos | 29 |
| Coleta de espécimes, identificação e preservação do material | 29 |
| Extração de DNA | 30 |
| Reação de polimerização em cadeia (PCR) | 30 |
| DNA mitocondrial | 30 |
| Sequenciamento do DNA | 31 |
| Análises dos resultados | 31 |
| Resultados | 32 |
| Discussão | 34 |
| Considerações finais | 38 |
| Referências | 41 |
| Anexos | 44 |
| Artigo 2 | 54 |
| PRESENÇA E DISTRIBUIÇÃO DO ENDOSSIMBIONTE <i>Wolbachia</i> EM POPULAÇÕES DE <i>Solenopsis</i> spp. (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) DO BRASIL E ARGENTINA E SUA HISTÓRIA EVOLUTIVA | 55 |
| Resumo | 55 |
| Introdução | 55 |
| Material e Métodos | 58 |
| Coleta de espécimes, identificação e preservação do material | 58 |
| Extração de DNA | 59 |
| Reação de polimerização em cadeia (PCR) | 59 |
| DNA mitocondrial | 59 |
| Isolamento de gene da <i>Wolbachia</i> | 60 |
| Clonagem | 61 |
| Sequenciamento do DNA | 61 |
| Forma de análise dos dados | 61 |
| Resultados | 62 |
| Distribuição de <i>Wolbachia</i> no gênero <i>Solenopsis</i> | 63 |
| Rede de variantes de cepas de <i>Wolbachia</i> | 63 |
| Análise do sinal filogenético | 63 |
| Filogenia de <i>Wolbachia</i> das populações analisadas | 64 |
| Discussão | 65 |
| Considerações Finais | 69 |
| Referências | 70 |
| Anexos | 75 |
| Considerações Gerais | 85 |

Introdução

As formigas são insetos que devido sua alta capacidade adaptativa, ocorrem em abundância na maioria dos ambientes terrestres e apresentam enorme diversidade. Muitas espécies são de grande importância para o homem, por sua capacidade em desalojar outras espécies, dominar vários tipos de habitats, principalmente sob ação antrópica. Nesse grupo estão as formigas do gênero *Solenopsis*, que inclui as conhecidas formigas lava-pés, com ampla distribuição no território brasileiro, inclusive dentro das zonas urbanas. Elas são altamente agressivas às perturbações da colônia e durante o forrageamento, podendo causar acidentes provocando alergias que, inclusive podem levar a choques anafiláticos e até a morte de seres humanos.

Elas são formigas onívoras e oportunistas, que podem predar tanto vertebrados e invertebrados quanto plantas (VINSON, 1994), além de terem o hábito de complementar sua dieta através da proteção de outros invertebrados sugadores de seiva que secretam gotas açucaradas, como os afídeos (GREEN, 1952).

Os ninhos das formigas lava-pés são construídos diretamente no chão, em áreas abertas e ensolaradas, constituídos basicamente de um monte de terra no interior do qual mantém a colônia, de onde irradiam vários túneis de forrageio (PORTER e TSCHINKEL, 1987).

Historicamente, *Solenopsis* tem sido um grupo taxonômico complicado, pois os trabalhos de revisões de Wilson (1952), Snelling (1963) e Buren (1972) estavam limitados a apenas algumas espécies. Esses autores não examinaram espécies tipo do taxa *Solenopsis* descritas por Forel e Santschi (TRAGER, 1991).

A alta diversidade de *Solenopsis* na América do Sul dificulta a distinção entre espécies devido a um número reduzido de caracteres diagnósticos e da dificuldade de serem distinguidos (PITTS et al., 2005).

Wilson (1952) sugeriu a existência de apenas três espécies de lava-pés, com diversas sinonímias, e considerou que as lava-pés da América do Sul compreendiam a um grande formigueiro híbrido, com diversas variantes de hibridizações regionais em áreas de parapatria.

Trager (1991) fez uma revisão do gênero *Solenopsis* Westwood (Formicidae: Myrmicinae) e catalogou 185 espécies. A maioria dessas espécies é caracterizada por possuir operárias pequenas e monomórficas, que vivem em pequenas colônias e várias delas com ninhos estabelecidos no interior de ninhos de outras espécies de formigas, das quais roubam

comida e cria (THOMPSON, 1989). Estes hábitos deram a essas espécies de *Solenopsis* o nome de “thief ants” (PITTS et al., 2005).

Outras espécies de *Solenopsis* diferem muito dos aspectos anteriores, por possuírem operárias polimórficas, formarem enormes colônias e serem altamente agressivas tanto na defesa do ninho quanto no forrageamento (PITTS et al., 2005). Devido à ferroadada desferida pelas operárias, tais espécies de *Solenopsis* receberam o nome de “fire ants” ou formigas de fogo (PITTS et al., 2005). Elas foram divididas em quatro grupos: *S. virulens*, *S. tridens*, *S. geminata* e *S. saevissima*. O grupo de espécies *S. saevissima* consiste de 13 espécies descritas: *S. interrupta*, *S. invicta*, *S. macdonaghi*, *S. mergergates*, *S. pythia*, *S. quinquecuspis*, *S. richteri*, *S. saevissima*, *S. weyrauchi*, *S. electra*, *S. pusillignis*, *S. daguerrei* e *S. hostilis* (PITTS et al., 2005).

A espécie *Solenopsis invicta* Buren, 1972 foi disseminada a partir da América do Sul para vários locais do mundo pelo comércio de madeira (TABER, 2000). Atualmente, elas são encontradas nos Estados Unidos, Oeste das Índias, Nova Zelândia, Porto Rico, Austrália, Hong Kong e China (HENSCHAW et al., 2005; TSCHINKEL, 2006).

As espécies *S. richteri* e *S. invicta* foram introduzidas acidentalmente nos Estados Unidos no início do século passado e hoje são consideradas como os principais inimigos do povo americano, causando danos à diversidade local pelo desalojamento das espécies nativas, na agricultura e na saúde pública (WOJCIK et al., 2001). Anualmente, são gastos milhões de dólares na tentativa de controle dessas formigas e mesmo assim, elas continuam a se expandir para novas áreas. Um fator interessante e complicador é que várias espécies na América do Norte, tanto nativas quanto introduzidas, formam híbridos onde ocorrem zonas de contato (SHOEMAKER et al., 1996).

Podem ocorrer espécies crípticas de *S. invicta* e, provavelmente, também em outras espécies do gênero. Este fato foi constatado pelas divergências observadas nas análises de DNA mitocondrial (SHOEMAKER et al., 2003b) e pelas diferenças entre frequências alélicas observadas através de aloenzimas, em populações geográficas distintas (ROSS et al., 1997). Estudos anteriores com aloenzimas realizados por Ross e Trager (1990) já tinham revelado a existência de espécies crípticas, morfologicamente indistinguíveis de *S. quinquecuspis*, próxima de *S. invicta*. Essas informações levaram Ross e Shoemaker (2005) a realizarem análises genéticas da delimitação de espécies de lava-pés na América do Sul, partindo do princípio que *S. invicta* e *S. richteri* estão isoladas reprodutivamente, contrastando com resultados anteriores onde verificaram regiões nos EUA de formação de híbridos entre as espécies (SHOEMAKER et al., 1996). Além disso, foi proposta a ocorrência de espécies

cripticas para *S. invicta* e *S. richteri*, que indicam que o grupo está em um processo de radiação e que divergências morfológicas não estão levando ao isolamento reprodutivo e divergência genética neutra nesse processo.

A análise filogenética realizada por Shoemaker et al. (2006) para o grupo de espécies *Solenopsis saevissima*, baseada em sequências do DNA mitocondrial de amostras provenientes da América do Sul (parte do Brasil e da Argentina) permitiu inferir que o grupo deve ser monofilético, mas verificaram a ocorrência de linhagens com DNA mitocondrial divergente na mesma espécie, como na invasora *S. invicta*, possivelmente decorrente de uma recente hibridização interespecífica.

Ross et al. (2009) analisando 68 marcadores genéticos para distinguir diferentes linhagens de *S. saevissima*, cujas coletas realizadas no Brasil (94 amostras de *S. saevissima* e espécies relacionadas), encontraram uma variedade de níveis de divergência e distinção evolutiva entre populações regionais. Diante disso, propuseram que duas populações amplamente distribuídas estão ligadas por níveis substanciais de fluxo gênico recente. Outros agrupamentos encontrados são evolutivamente independentes ou na trajetória de se tornarem independentes e que várias dessas linhagens são parapátricas com outras populações, o que sugere que barreiras intrínsecas de pré-acasalamento e pós-acasalamento de fluxo gênico estejam ocorrendo. Os dados genéticos sugerem ainda que diferenciações regionais de *S. saevissima* estejam ocorrendo devido a hibridização interespecífica com outras espécies regionais que ocorrem em simpatria ou parapatria, incluindo *S. geminata*.

Considerando-se que a América do Sul é o principal centro de ocorrência das formigas lava-pés, dois aspectos importantes devem ser considerados: a região do Pantanal Sul-Americano é considerado o núcleo de dispersão de *S. invicta*, e as demais regiões do Brasil são dominadas pela *S. saevissima* (AHRENS et al., 2005a; ROSS E SHOEMAKER, 2005; SHOEMAKER et al., 2006; ROSS et al., 2009).

A ocorrência de endobactérias, bactérias intracelulares, é comum nos artrópodes, pois análises em 63 espécies revelaram que 76% estavam infectados (JEYAPRAKASH e HOY, 2000). Extrapolações dessa estimativa sugerem que milhões de espécies de insetos podem estar infectadas por *Wolbachia*, fazendo dessa bactéria um dos principais simbiontes dos insetos (SHOEMAKER et al., 2003a). Ela foi detectada em vários gêneros de formigas (JEYAPRAKASH e HOY, 2000; SHOEMAKER et al., 2000; KELLER et al., 2001; VAN BORM et al., 2003).

A *Wolbachia* é uma endobactéria gram-negativa da Classe Alphaproteobacteria, Ordem Rickettsiales e não pode ser cultivada fora das células do hospedeiro, o que torna os

estudos tradicionais de microbiologia um desafio; porém, 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.

A *Wolbachia* pode causar alterações reprodutivas em seus hospedeiros, nas quais se incluem a incompatibilidade citoplasmática entre descendentes e espécies relacionadas, indução de partenogênese, feminilidade de machos genéticos e morte de machos (WERREN, 1997; WERREN et al., 2008).

Como elas atuam na reprodução dos insetos hospedeiros podem aumentar a taxa relativa de transmissão de linhagens infectadas (O'NEILL et al., 1992; BANDI et al., 1998; STOUTHAMER et al., 1999). Sua ocorrência em populações naturais pode ser um fator importante em termos de controle, existindo grande interesse na possível utilização desta endobactéria como controle biológico (AESCHILIMANN, 1990; BEARD et al., 1993; STOUTHAMER, 1993; GIRIN, 1995).

A transmissão de *Wolbachia* pode ocorrer verticalmente (quando a fêmea transmite para sua prole) através do citoplasma do óvulo (WERREN, 1997; STOUTHAMER et al., 1999); porém, várias linhas independentes de estudos mostram claramente que a *Wolbachia* pode ser transmitida horizontalmente, tanto dentro quanto entre espécies hospedeiras (O'NEILL et al., 1992; VAVRE et al., 1999; DEDEINE et al., 2005; AHRENS e SHOEMAKER, 2005).

A *Wolbachia* pode alterar profundamente os padrões de reprodução do hospedeiro, e provavelmente um dos mais importantes efeitos é o de influenciar a determinação do sexo no hospedeiro, documentado para vários insetos solitários (HURST et al., 1999; HURST e JIGGINS, 2000). Não é conhecido se a *Wolbachia* possui influência similar na reprodução de insetos sociais como as formigas, abelhas e vespas (WENSELEERS et al., 1998; CHAPUISAT e KELLER, 1999; KELLER et al., 2001). Atualmente, não existem dados na literatura sobre os efeitos da *Wolbachia* na reprodução de formigas.

Análise de *Wolbachia* presente na espécie de formiga *Formica truncorum* revelou que todas as populações estudadas estavam infectadas por *Wolbachia*, indicando que essa espécie de formiga está com a bactéria fixada na população ou próxima de ser fixada (WENSELEERS et al., 2002). Verificaram que a *Wolbachia* pode ter um possível efeito deletério nessa espécie, além de uma provável perda da infecção nas operárias adultas, uma vez que elas possuem baixa taxa de infecção (45%) comparada com pupas (87%) e em rainhas virgens (94%).

A ocorrência da endobactéria *Wolbachia* em populações de lava-pés foi verificada em populações nativas e introduzidas em outros países (SHOEMAKER et al., 2000; SHOEMAKER et al., 2003b; BOUWMA et al., 2006). Shoemaker et al. (2000) encontraram dois tipos de linhagens de *Wolbachia* (A e B), além de alta taxa de variação na frequência da infecção entre regiões diferentes nos locais de origem, e também uma concordância filogenética entre o DNA mitocondrial de *S. invicta* e o tipo de infecção de *Wolbachia* (A ou B).

Na América do Sul foram analisadas populações de partes do Brasil e do nordeste da Argentina (SHOEMAKER et al., 2000; 2003a; AHRENS et al., 2005), não levando em consideração a completa distribuição desse gênero de formiga no território brasileiro.

Inicialmente, não foram encontradas infecções por *Wolbachia* em populações de *Solenopsis* introduzidas nos EUA (SHOEMAKER et al. 2000, 2003b); porém, Bouwma et al. (2006) em um extenso estudo de 10 populações geográficas introduzidas nos EUA encontraram *Wolbachia* em duas populações, na região sul do Mississippi, com diferentes variantes infectando colônias poligínicas e monogínicas. A ocorrência de *Wolbachia* nessas populações pode ser devido ao fato de ter ocorrido uma ou mais introduções recentes de *S. invicta* infectadas com *Wolbachia*.

Infecções por *Wolbachia* são comuns em populações nativas de *S. invicta* e *S. richteri*, mas aparentemente ausente em populações introduzidas nos EUA, permitindo formular a hipótese de que a ausência de infecção dessas formigas pode ser a causa do sucesso dessas invasões (SHOEMAKER et al., 2000; 2003a).

Análises filogenéticas baseadas no gene do ciclo celular (*ftsZ*) da endobactéria *Wolbachia* nos artrópodes, revelaram a divisão da endobactéria em duas linhagens (A e B) (WERREN et al., 1995). Mais tarde, Zhou et al. (1998) utilizando o gene *wsp*, que codifica uma proteína externa de membrana da endobactéria chegaram a mesma divisão em dois grupos, mas sugeriram que dentro de cada grupo existem vários clados que não tinham sido observados nas análises anteriores. Sugeriram a existência de oito grupos em potencial dentro do grupo A e quatro dentro do grupo B. Análises posteriores da presença de *Wolbachia* realizadas em nematóides revelaram dois clados adicionais (C e D) (BANDI et al., 1998). Esses clados tem sido chamados desde então de “supergrupos” (LO et al., 2007). Recentemente, outros supergrupos foram propostos, incluindo o supergrupo E em Collembola (CZARNETZKI et al., 2004; VANDEKERCKHOVE et al., 1999), F em artrópodes e nematóides (CASIRAGHI et al., 2005), G em aranhas (ROWLEY et al., 2004) e H em cupins (BORDENSTEIN et al., 2005).

Nas últimas décadas, o uso da PCR e de técnicas de sequenciamento tem revelado um grande número de bactérias com afinidade filogenética com *Wolbachia pipientis*. Apesar de formarem um clado monofilético com *W. pipientis*, muitas dessas linhagens não descritas possuem diferenças significativas no gene 16S, quando comparada com a linhagem tipo (mais de 3%). Devido às incertezas se essas bactérias podem representar diferentes espécies, a maioria dos pesquisadores se refere a essas linhagens apenas como *Wolbachia*. Lo et al. (2007) baseados em resultados de filogenias e dados sobre recombinações, propuseram que bactérias com afinidades filogenéticas a *W. pipientis* fossem formalmente incluídas nessa espécie, desde as bactérias pertencentes aos supergrupos A a H, até aquelas que apresentam distância genética similar à linhagem tipo. Essa foi uma decisão tomada em uma recente conferência internacional sobre *W. pipientis* (Heron Island, Austrália, agosto de 2004); porém, os autores não adotaram essa nomenclatura, referindo-se a *Wolbachia pipientis* como apenas *Wolbachia* (WERREN et al., 2008).

A relação entre os vários supergrupos de *Wolbachia* não é bem compreendida, basicamente devido à falta de um “outgroup” apropriado para enraizar as árvores inferidas (LO et al., 2002). O grupo mais relacionado contém membros de um clado que inclui os gêneros *Anaplasma* e *Ehrlichia*, que possuem identidade de 90% do gene 16S rRNA com *W. pipientis*. Gupta e Mok (2007) realizaram uma extensiva análise filogenética do grupo das alphaproteobactérias e também confirmaram a proximidade de *Wolbachia pipientis* com *Anaplasma* e *Ehrlichia*.

Esses fatos foram apontados por Shimodaira e Hasegawa (1999), através de análises estatísticas específicas para distinguir hipóteses concorrentes, não encontrando “outgroup” mais provável. Devido a estes fatos, Lo et al. (2007) defendem a idéia de ser mais prudente considerar todas as cepas como membros de *Wolbachia*.

O efeito fenotípico mais comum ligado à infecção por *Wolbachia* é a incompatibilidade citoplasmática, que se dá quando uma fêmea não infectada cruza com um macho infectado, ocasionando a produção de pouca ou nenhuma progênie como resultado de cariogamia abortiva. Devido aos outros tipos de possíveis cruzamentos produzirem número de progênie normal, o efeito principal da incompatibilidade citoplasmática é de reduzir a produção de descendentes fêmeas não infectadas comparada com fêmeas infectadas. Essa vantagem reprodutiva para produção de fêmeas infectadas resulta na dispersão da *Wolbachia* numa determinada população (TURELLI e HOFFMANN, 1991) e com isso, outros genomas de herança materna, incluindo o DNA mitocondrial, espera-se que dispersem junto com ela (SHOEMAKER et al., 2000; SHOEMAKER et al., 2003b; SHOMAKER et al., 2004).

Ahrens et al. (2005b) analisaram 138 indivíduos de 11 populações geográficas nativas de *S. invicta*, visando inferir os padrões de transmissão de *Wolbachia*. Verificaram que a história de infecções por *Wolbachia* em *S. invicta* é complexa e envolve múltiplas invasões ou eventos de transmissão horizontal. Observaram que não há efeitos da infecção por *Wolbachia* nos padrões de variação e substituição do DNA mitocondrial dessas formigas, corroborando Shoemaker et al., (2003b). Portanto, sugerem que o efeito da endobactéria *Wolbachia* no genoma do hospedeiro *S. invicta* é menos severo do que anteriormente previsto (AHRENS et al., 2005b).

Wolbachia emergiu como uma das causadoras de especiação por agentes simbioses e a razão é simples: por ela causar alterações reprodutivas que podem afetar diretamente a compatibilidade entre populações e espécies (BORDENSTEIN, 2003). Por exemplo, a incompatibilidade citoplasmática pode levar a evolução de novas espécies, onde duas populações fixadas para duas cepas de *Wolbachia* diferentes e incompatíveis são completamente isoladas reprodutivamente (CLARK, 2007). Estudos teóricos suportam o papel de *Wolbachia* na especiação (TELSCHOW et al., 2002; TELSCHOW et al., 2005a; TELSCHOW et al., 2005b; CHAMPION de CRESPIGNY et al., 2005) e estudos empíricos tem demonstrado que a incompatibilidade citoplasmática bidirecional é a principal causa da incompatibilidade reprodutiva entre espécies irmãs de *Nasonia* (BORDENSTEIN et al., 2001). Em *Drosophila recens* e *D. subquinaria* tem demonstrado contribuir na barreira reprodutiva entre espécies (SHOEMAKER et al., 1999).

Transferência lateral de genes de *Wolbachia* para o genoma do invertebrado hospedeiro é comum e amplamente distribuída (KONDO et al., 2002; HOTOPP et al., 2007; NIKOH et al., 2008). Aproximadamente um terço dos genomas de invertebrado sequenciados possuem inserções de genes de *Wolbachia* que podem ser de variados tamanhos, desde aqueles menores com 600 pares de bases em espécies de *Nasonia*, até o genoma completo da bactéria (mais de 1 Mb) encontrado em *D. ananassae* (HOTOPP et al., 2007). Baixos níveis de atividade transcricional têm sido encontrados em alguns dos genes de *Wolbachia* inseridos no hospedeiro, e uma questão importante é se tais inserções podem resultar na aquisição de novas funções de genes (WERREN et al., 2008).

Braig et al. (1994) obtiveram sucesso em transferir *Wolbachia* proveniente de *Aedes albopictus* para *Drosophila simulans* através de técnicas de microinjeção. A *Wolbachia* transferida se comportou como uma infecção natural de *D. simulans*, porém, as moscas com a nova infecção por *Wolbachia* foram bidirecionalmente incompatíveis com todas as outras populações naturais infectadas de *D. simulans*. O sucesso deste experimento, revelando que

foi possível transferir o simbiote entre hospedeiros distantes, sugere que pode ser possível introduzir a *Wolbachia* experimentalmente em espécies de artrópode de importância médica e agrícola com o intuito de manipular geneticamente populações naturais.

Grandes avanços têm ocorrido na utilização da *Wolbachia* como agente de controle biológico. Determinadas cepas de *Wolbachia* quando introduzidas em populações de *Aedes aegypti* provocam redução no tempo de vida dos indivíduos (SINKINS e O'NEILL, 2000; BROWNSTEIN et al., 2003; RASGON et al., 2003; COOK et al., 2008). Moreira et al. (2009) verificaram que essas mesmas cepas de *Wolbachia* também inibem diretamente a capacidade de uma variedade de patógenos infectarem essa espécie de mosquito, dentre eles o vírus da dengue. Sugerem que essas variantes de *Wolbachia* podem atuar sinergicamente com a estratégia de diminuição do tempo de vida anteriormente proposta e fornecer uma ferramenta importante para o controle de insetos transmissores de doenças.

Simbiose animal é categorizada em idade evolutiva aparente e na extensão da codependência obrigatória entre hospedeiro e simbiote. A simbiose pode ser primária, nos casos onde o simbiote reside em células especializadas do hospedeiro (bacteriócitos), sendo herdados exclusivamente de modo vertical e que descendem de associações antigas e especializadas, onde a árvore filogenética do simbiote é congruente com aquela do hospedeiro (HYPSA e NOVÁKOVÁ, 2009). Já na simbiose secundária, simbioses podem colonizar os hospedeiros através de transmissão horizontal entre indivíduos hospedeiros diferentes ou espécies diferentes, além de recombinação ocorrer entre os simbioses. Assim, esse tipo de simbiose é facultativa, na perspectiva do hospedeiro e nem sempre possui uma história evolutiva congruente com a do hospedeiro (DALE e MORAN, 2006). Dentro dos simbioses secundários encontra-se a endobactéria *Wolbachia*. Porém, com a crescente diversidade de simbioses caracterizados, essa concepção entre simbioses secundários não é de simples definição, uma vez que esses organismos formam um grupo heterogêneo com respeito à locação no inseto e possivelmente na sua função (BAUMANN, 2005).

Enquanto alguns parasitas têm seu sucesso dentro do corpo do hospedeiro, outros se beneficiam do super-organismo que é o ninho de formigas e têm sucesso como parasitas sociais. Originalmente descrita como *Labachena daguerrei*, *Solenopsis daguerrei* é uma formiga completamente dependente do parasitismo social, que perdeu a casta de operárias no curso evolutivo, sendo que seus hospedeiros são limitados a espécies de *Solenopsis* do grupo *saevissima* (*S. richteri*, *S. invicta*, *S. saevissima*, *S. quinquecupis* e *S. macdonaghi*) (TSCHINKEL, 2006). As rainhas de *S. daguerrei* de alguma maneira atraem as operárias do ninho parasitado para que elas cuidem preferencialmente de sua cria. A cria da colônia se

transforma em um grande número de progênie do parasita, que irá desenvolver somente indivíduos sexuais (TSCHINKEL, 2006).

A íntima relação entre as operárias do ninho infectado e a parasita social, como a trofalaxia e carregamento de ovos, pode promover oportunidades suficientes para que ocorra a transferência horizontal de microorganismos do hospedeiro para o parasita social e, possivelmente, do parasita social para o hospedeiro, como a própria *Wolbachia*.

Diante das complexas interações de hospedeiros e parasitas que possam estar ocorrendo entre as formigas e as bactérias do gênero *Wolbachia*, é interessante e necessário expor algumas observações sobre questões evolutivas. Inicialmente, é importante distinguir coevolução e coespeciação. A coevolução é a evolução de uma espécie em resposta à seleção imposta por uma segunda espécie, seguida pela evolução na segunda espécie em resposta à seleção recíproca imposta pela primeira espécie (CLAYTON et al., 1999). Já a coespeciação é a especiação comum de duas ou mais linhagens que são ecologicamente associadas, sendo que a associação não é necessariamente parasítica; associações mutualísticas, simbióticas e de outros tipos podem também apresentar coespeciação (PAGE, 2003). Ainda, se a coespeciação é o único processo em curso, as árvores filogenéticas do hospedeiro e do parasita devem ser imagens em espelho, uma da outra (PAGE, 2003).

Se for considerado coevolução como a evolução de adaptações recíprocas em parasita e hospedeiro, então fica claro que linhagens podem coevoluir sem coespeciarem (PAGE, 2003), portanto, é importante a distinção entre coevolução e coespeciação.

Reconstruções coevolutivas estão entre as mais precárias operações em filogenias. Os objetivos principais nesses estudos são identificar se a congruência filogenética entre dois organismos associados é maior que o esperado ao acaso, e localizar e explicar incongruências observadas (HYPSA e NOVÁKOVÁ, 2009). Um dos grandes problemas em análises de coevolução apontados por Hypsa e Nováková (2009) é que incongruências podem ter origens fundamentalmente diferentes como, por exemplo, eventos evolutivos reais (como troca de hospedeiro e ou múltiplas colonizações) ou artefatos metodológicos (topologias incongruentes, duplicação de linhagens). Ainda, frequentes transferências horizontais vistas em muitos microorganismos parasitas (DOUGLAS, 1989) sugerem distribuição aleatória e normalmente não implicam em nenhuma aproximação coevolutiva rigorosa.

Provavelmente devido a essas circunstâncias, associações de insetos-simbiontes foram apenas raramente endereçadas por métodos coevolutivos rigorosos. Em casos simples, onde ambas as partes carregam fortes e inequívocos sinais filogenéticos, a congruência pode ser observada apenas pelo exame das árvores (MUNSON et al., 1991; SCHRÖDER et al., 1996;

CHEN et al., 1999). Porém, muitas descobertas recentes sugerem que associações de insetos-simbiontes devem ser vistas como sistemas mais dinâmicos formados por aquisições múltiplas, perdas, substituições e transferências horizontais (HYPSA e NOVÁKOVÁ, 2009).

Objetivos

Diante da abundância e da ampla distribuição de espécies do gênero *Solenopsis* no território brasileiro e pelo fato de algumas regiões geográficas do país não terem sido contempladas em estudos anteriores, tanto para o gênero de formigas quanto para a presença da endobactéria *Wolbachia* nessas populações nativas, os objetivos do presente trabalho foram:

1. Caracterização das populações de lava-pés (*Solenopsis* spp.) de ampla área do território brasileiro, pela análise de sequências do DNA mitocondrial, que inclui parte do gene da citocromo oxidase I (utilizando o par de primers C1-J-2195 e DDS-COII-4 ou C1-J-2195 e JerryGarcia-CI) e através de estudos filogenéticos, analisar o parentesco dessas populações e inferir a provável filogenia.

2. Investigação da presença e a frequência e ocorrência da endobactéria *Wolbachia* nas populações de *Solenopsis* do país, pela análise do fragmento do gene *wsp* amplificado por reação de polimerização em cadeia (PCR), a partir de DNA obtido da endobactéria, com o uso do par de primers *wsp81F* e *wsp691R* e quando presente, realizar sequenciamento e análise do fragmento.

3. Uma vez determinadas as sequências do DNA mitocondrial da formiga e do gene *wsp* da *Wolbachia*, verificar a história evolutiva de *Wolbachia* nessas populações de formigas, fornecendo informações ainda ausentes na literatura sobre a relação da endobactéria com as populações geográficas das formigas do gênero *Solenopsis*.

Apresentação

O tema e os objetivos dessa dissertação estão ligados à pesquisa desenvolvida sobre espécies do gênero de formiga *Solenopsis*, popularmente conhecidas como formigas lava-pés, e a endobactéria *Wolbachia*, de ampla ocorrência em artrópodes.

Diante dos resultados obtidos, a maneira mais didática de apresentação foi na forma de capítulos, com uma introdução contendo o referencial teórico, os objetivos gerais e específicos e os resultados foram divididos em dois artigos científicos.

O primeiro artigo compreende os resultados do primeiro objetivo, originando o artigo intitulado “Caracterização molecular de formigas *Solenopsis* spp. (Hymenoptera: Formicidae) do Brasil, através da análise do gene mitocondrial citocromo oxidase I (COI)“. Nele são apresentados os resultados da caracterização de populações de *Solenopsis* spp. coletadas em diversas localidades do Brasil e uma localidade da Argentina, revelando através de estudos filogenéticos a relação de parentesco entre essas populações.

O segundo artigo contempla os resultados do segundo e terceiro objetivos, que resultou em um artigo intitulado “Presença e distribuição do endossimbionte *Wolbachia* em populações de *Solenopsis* spp. (Hymenoptera: Formicidae) do Brasil e Argentina e sua história evolutiva”. Nesse artigo, discutem-se os resultados obtidos no levantamento da infecção pelo endossimbionte *Wolbachia* nas populações de *Solenopsis* spp. do Brasil e de parte da Argentina, diferenciando as cepas encontradas e sua distribuição no território brasileiro, relacionando com a filogenia e prováveis causas da distribuição variável encontrada.

Referências

- AESCHILIMANN, J. P. Simultaneous occurrence of thelytoky and bisexuality in Hymenopteran species, and its implications for the biological control of pests. **Entomophaga**. v. 35, p. 3–5. 1990.
- 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. 2005a.
- AHRENS, M. E.; SHOEMAKER, D. Evolutionary history of *Wolbachia* infections in the fire ant *Solenopsis invicta*. **BMC Evolutionary Biology**. v. 5, p. 35. 2005b.
- BANDI, C.; ANDERSON, T.; GENCHI, C. BLAXTER, M. Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. **Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Science**. v. 265, p. 2407-2413. 1998.
- BAUMANN, P. Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of pant sap-sucking insects. **Annual Review of Microbiology**. v. 59, p. 155-189. 2005.
- BEARD, C. B.; O'NEILL, S. L.; TESH, R. B.; RICHARDS, F. F.; AKSOY, S. Modification of Arthropod vector competence via symbiotic bacteria. **Parasitology Today**. v. 9, p. 179–183. 1993.
- BORDENSTEIN, S. R.; O'HARA, R. P.; WERREN, J. H. *Wolbachia*-induced incompatibilities in *Nasonia*. **Nature**. v. 409, p. 707-710. 2001.
- BORDENSTEIN, S. R. Symbiosis and the origin of species. In: Bourtzis, K.; Miller, T. (Eds.) **Insect Symbiosis**. CRC Press, Boca Raton, Florida, EUA. 2003.
- BORDENSTEIN, S.; ROSENGAUS, R. B. Discovery of a novel *Wolbachia* supergroup in isoptera. **Current Microbiology**. v. 51, p. 393-398. 2005.
- 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.
- BRAIG, H. R.; GUZMAN, H.; TESH, R. B.; O'NEILL, S. L. Replacement of the natural *Wolbachia* symbiont of *Drosophila simulans* with a mosquito counterpart. **Nature**. v. 367, p. 453-455. 1994.
- BROWNSTEIN, J. S.; HETT, E.; O'NEILL, S. L. The potential of virulent *Wolbachia* to modulate disease transmission by insects. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 84, p. 24–29. 2003.
- BUREN, W. F. Revisionary studies of the taxonomy of the imported fire ants. **Journal of the Georgia Entomological Society**. v. 7, p. 1-26. 1972.
- CASIRAGHI, M.; BORDENSTEIN, S. R.; BALDO, L.; LO, N.; BENINATI, T.; WERNEGREN, J. J.; WERREN, J. H.; BANDI, C. Phylogeny of *Wolbachia pipientis* based on *gltA*, *groEL* and *ftsZ* gene sequences: clustering of arthropod and nematode symbionts in

the F supergroup, and evidence for further diversity in *Wolbachia* tree. **Microbiology**. v. 151, p. 4015-22. 2005.

CHAMPION DE CRESPIGNY, F. E.; BUTLIN, R. K.; WEDELL, N. Can cytoplasmic incompatibility inducing *Wolbachia* promote the evolution of mate preferences? **Journal of Evolutionary Biology**. v. 18, p. 967–977. 2005.

CHAPUISAT, M.; KELLER, L. Testing kin selection with sex allocation data in eusocial Hymenoptera. **Heredity**. v. 82, p. 473-478. 1999.

CHEN, X. A.; LI, S.; AKSOY, S. Concordant evolution of a symbiont with its host insect species: molecular phylogeny of genus *Glossina* and its bacteriome-associated endosymbiont, *Wigglesworthia glossinidia*. **Journal of Molecular Evolution**. v. 48, pp. 49-58. 1999.

CLARK, M. E. *Wolbachia* symbiosis in arthropods. In: HOERAUF, A.; RAO, R. U. (Ed.) **Wolbachia: a bug's life in another bug**. Karger: Basel, 2007. (Issues in Infectious Diseases, v. 5).

CLAYTON, D. H.; LEE, P. L. M.; TOMPKINS, D. M.; BRODIE III, E. D. Reciprocal natural selection on host–parasite phenotypes. **The American Naturalist**. v. 154, p. 261-277. 1999.

COOK, P. E.; McMENIMAN, C. J.; O'NEILL, S. L. Modifying insect population age structure to control vector-borne disease. In: AKSOY, S. (Ed.). **Transgenesis and the management of vector-borne disease**. Landes Biosciences : Austin, TX. 2008.

CZARNETZKI, A. B.; TEBBE, C. C. Detection and phylogenetic analysis of *Wolbachia* in Collembola. **Environmental Microbiology**. v. 6, p. 35-44. 2004.

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.

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

GIRIN, C.; BOULETREAU, M. Microorganism-associated variation in host infestation efficiency in a parasitoid wasp, *Trichogramma boutatachae* (Hymenoptera, Trichogrammatidae). **Experientia**. v. 51, p. 398–401. 1995.

GREEN, H. B. Biology and control of the imported fire ant in Mississippi. **Journal of Economical Entomology**. v. 45, p. 593-597. 1952.

GUPTA, S. R.; MOK, A. Phylogenomics and signature proteins for the alpha proteobacteria and its main groups. **BMC Microbiology**. v. 7, p. 106. 2007.

HENSCHAW, M. T.; KUNZMANN, N.; VANDERWOUDE, C.; SENETRA, M.; CROZIER, R. H. Population genetics and history of the introduced fire ant, *Solenopsis invicta*

Buren (Hymenoptera: Formicidae) in Australia. **Austral Journal of Entomology**. v. 44, p. 37-44. 2005.

HOTOPP, J. C. D.; CLARK, M. E.; OLIVEIRA, D. C. S. G.; FOSTER, J. M.; FISCHER, P.; TORRES, M. C. M.; GIEBEL, J. D.; KUMAR, N.; ISHMAEL, N.; WANG, S.; INGRAM, J.; NENE, R. V.; SHEPARD, J.; TOMKINS, J.; RICHARDS, S.; SPIRO, D. J.; GHEDIN, E.; SLATKO, B. E.; TETTELIN, H.; WERREN, J. H. Widespread lateral gene transfer from intracellular bacteria to multicellular eukaryotes. **Science**. v. 317, p. 1753-1756. 2007.

HURST, G. D. D.; JIGGINS, F. M. Male-killing bacteria in insects: mechanisms, incidence, and implications. **Emerging Infectious Dis.** v. 6, p. 329-336. 2000.

HURST, G. D. D.; JIGGINS, F. M.; VON DER SCHULENBURG, J. H. G.; BERTRAND, D.; WEST, S. A.; GORIACHEVA, I. I.; ZAKHAROV, I. A.; WERREN, J. H.; STOUTHAMER, R.; MAJERUS, M. E. N. Male killing *Wolbachia* in two species of insect. **Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Science**. v. 266, p. 735-740. 1999.

HYPSA, V.; NOVÁKOVÁ, E. Insect symbionts and molecular phylogenetics. In: BOURTZIS, K.; MILLER, T. (Ed.) **Insect Symbiosis**. v. 3, CRC Press: Boca Raton, Florida, EUA. 2009.

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.

KELLER, L.; LIAUTARD, C.; REUTER, M.; BROWN, W. D.; SUNDSTRÖM, L.; CHAPUISAT, M. Sex ratio and *Wolbachia* infection in the *Formica exsecta*. **Heredity**. v. 87, p. 227-233. 2001.

KONDO, N.; NIKOH, N.; IJICHI, N.; SHIMADA, M.; FUKATSU, T. Genome fragment of *Wolbachia* endosymbiont transferred to X chromosome of host insect. **Proceedings of the National Academy of Science**. v. 99, p. 14280-14285. 2002.

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

MOREIRA, L. A.; ITURBE-ORMAETXE, I.; JEFFERY, J. A.; LU, G.; PYKE, A. T.; HEDGES, L. M.; ROCHA, B. C.; HALL-MENDELIN, S.; DAY, A.; RIEGLER, M.; HUGO, L. E.; JOHNSON, K. N.; KAY, B. H.; MCGRAW, E. A.; VAN DEN HURK, A. F.; RYAN, P. A.; O'NEILL, S. L. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, chikungunya, and plasmodium. **Cell**. v. 139, p. 1268-1278. 2009.

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

NIKOH, N.; TANAKA, K.; SHIBATA, F.; KONDO, N.; HIZUME, M.; SHIMADA, M.; FUKATSU, T. *Wolbachia* genome integrated in an insect chromosome: evolution and fate of laterally transferred endosymbiont genes. **Genome Research**. v. 18, p. 272–280. 2008.

O'NEILL, S. L.; GIORDANO, R.; COLBERT, A. M. E.; KARR, T. L.; ROBERTSON, H. M. 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.

PAGE, R. D. M. **Tangles trees**: phylogeny, cospeciation, and coevolution. The University Chicago Press, Chicago. 2003.

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. Foraging in *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae): affects of weather and season. **Environmental Entomology**. v. 16, p. 802-808. 1987.

RASGON, J. L.; STYER, L. M.; SCOTT, T. W. *Wolbachia*-induced mortality as a mechanism to modulate pathogen transmission by vector arthropods. **Journal of Medical Entomology**. v. 40, p. 125–132. 2003.

ROSS, K. G.; GOTZEK, D.; ASCUNCE, M. S.; SHOEMAKER, D. D. Species delimitation: a case study in a problematic ant taxon. **Systematic Biology**. v. 59, p. 1-23. 2009.

ROSS, K. G.; KRIEGER, M. B.; SHOEMAKER, D. D.; VARGO, 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.

ROSS, K. G.; TRAGER, J. C. Systematics and populations genetics of fire ants (*Solenopsis saevissima* complex) from Argentina. **Evolution**. v. 44, p. 2113-2134. 1990.

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

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

SHIMODAIRA, H.; HASEGAWA, M. Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. **Molecular Biology and Evolution**. v.16, p.1114–1116. 1999.

SHOEMAKER, D. D.; AHRENS, M. E.; ROSS, K. G. Molecular phylogeny of the 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.; AHRENS, M.; SHEILL, L.; MESCHER, M.; KELLER, L.; ROSS, K. G. Distribution and prevalence of *Wolbachia* infections in native populations of the fire ant *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). **Population Ecology**. v. 32, p. 1329-1336. 2003a.
- SHOEMAKER, D. D.; DYER, K. A.; AHRENS, M.; McABEE, K.; JAENIKE, J. Decreased diversity but increased substitution rate in host mtDNA as a consequence of *Wolbachia* endosymbiont infection. **Genetics**. v. 168, p. 2049-2058. 2004.
- SHOEMAKER, D. D.; KATJU, V.; JAENIKE, J. *Wolbachia* and the evolution of reproductive isolation between *Drosophila recens* and *D. subquinaria*. **Evolution**. v. 53, p. 1157-1164. 1999.
- SHOEMAKER, D. D.; KELLER, G.; ROSS, K. G. Effects of *Wolbachia* on mtDNA variation in two fire ant species. **Molecular Ecology**. v. 12, p. 1757-1772. 2003b.
- SHOEMAKER, D. D.; ROSS, K. G.; ARNOLD, M. L. Genetic structure and evolutions of the fire ant hybrid zone. **Evolution**. v. 50, p. 1958-1976. 1996.
- SHOEMAKER, D. D.; ROSS, K. G.; KELLER, L.; VARGO, E. L.; WERREN, J. H. *Wolbachia* infections in native and introduced populations of the fire ants (*Solenopsis* spp.). **Insect Molecular Biology**. v. 9, p. 661-673. 2000.
- SINKINS, S. P. e O'NEILL, S. L. *Wolbachia* as a vehicle to modify insect populations. In: JAMES, A. A. (Ed.). **Insect Transgenesis: Methods and Applications**. CRC Press: Boca Raton. p. 271-287. 2000.
- SNELLING, R. R.; HUNT, J. H. The ants of Chile. **Revista Chilena de Entomologia**. v. 9, pp. 63-129. 1975.
- STOUTHAMER, R. The use of sexual versus asexual wasps in biological control. **Entomophaga**. v. 38, p. 3-6. 1993.
- 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.
- TABER, S. W. **Fire ants**. Texas, EUA: Texas A&M University Press. 2000.
- TELSCHOW, A.; HAMMERSTEIN, P.; WERREN, J. H. The effect of *Wolbachia* versus genetic incompatibilities on reinforcement and speciation. **Evolution**. v. 59, p.1607-1619. 2005b.
- TELSCHOW, A.; HAMMERSTEIN, P.; WERREN, J. H. The effect of *Wolbachia* on genetic divergence between populations: models with two way migration. **American Naturalist**. v. 160, p. S54-S66. 2002.
- TELSCHOW, A.; YAMAMURA, N.; WERREN, J. H. Bidirectional cytoplasmic incompatibility and the stable coexistence of two *Wolbachia* strains in parapatric host populations. **Journal of Theoretical Biology**. v. 235, p. 265-274. 2005a.

- THOMPSON, C. R. The thief ants, *Solenopsis molesta* group, of Florida (Hymenoptera: Formicidae). **Florida Entomologist**. v. 72, p. 268-283. 1989.
- TRAGER, J. C. A revision of the fire ants, *Solenopsis geminata* group (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae). **Journal of the New York Entomological Society**. v. 99, p. 141-198. 1991.
- TSCHINKEL, W. R. **The fire ants**. Cambridge, Massachusetts and London, England: The Belknap Press of Harvard University Press. 2006.
- TURELLI, M.; HOFFMANN, A. A. Rapid spread of an inherited incompatibility factor in California. **Nature**. v. 353, p. 440-442. 1991.
- 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.
- VANDEKERCKHOVE, T. T.; WATTEYNE, S.; WILLEMS, A.; SWINGS, J. G.; MERTENS J.; GILLIS, M. Phylogenetic analysis of the 16S rDNA of the cytoplasmic bacterium *Wolbachia* from the novel host *Folsomia candida* (Hexapoda, Collembola) and its implications for wolbachial taxonomy. **FEMS Microbiology Letters**. v. 180, p. 279-286. 1999.
- VAVRE, F.; FLEURY, F.; LEPETIT, D.; FOUILLET, P.; BOULETREAU. Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations. **Molecular Biology and Evolution**. v.16, p.1711-1723, 1999.
- VINSON, S. B. Impact of the invasion of *Solenopsis invicta* (Buren) on native food webs. In: Williams, D. F. **Exotic Ants: Biology, Impact, and Control of Introduced Species**. Western Press, Boulder, C.O., 1994.
- WENSELEERS, T; ITO, F.; VAN BORM, S.; HUYBRECHTS, R.; VOLCKAERT, F. BOLLEN, J. Widespread occurrence of the microorganism *Wolbachia* in ants. **Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Science**. v. 265, p. 1447-52. 1998.
- WERREN, J. H. Biology of *Wolbachia*. **Annual Review of Entomology**. v. 42, p. 537-609. 1997.
- WERREN, J. H.; BALDO, L.; CLARK, M. E. *Wolbachia*: master manipulator of invertebrate biology. **Nature Reviews Microbiology**. v. 6, p. 741-751. 2008.
- WERREN, J. H.; ZHANG, W.; GUO, L. R. Evolution and phylogeny of *Wolbachia* reproductive parasites of arthropods. **Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Science**. v. 261, p. 55-63. 1995.
- 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. L.; JOUVENAZ, D. P.; LUTZ, R. S. Red imported fire ants: impact on biodiversity. **American Entomologist**. v. 47, p. 16-23. 2001.

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.

ARTIGO 1

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE FORMIGAS *Solenopsis* spp.
(HYMENOPTERA: FORMICIDAE) DO BRASIL, ATRAVÉS DA ANÁLISE DO
GENE MITOCONDRIAL CITOCROMO OXIDASE I (COI)**

Resumo

O gênero *Solenopsis* tem distribuição cosmopolita, mas espécies do grupo *S. saevissima*, nativas da América do Sul e popularmente conhecidas como lava-pés, foram introduzidas de forma acidental em diversos países do mundo. No Brasil apresentam ampla distribuição, inclusive nas zonas urbanas. São formigas altamente agressivas e são responsáveis por acidentes que podem levar a choques anafiláticos e à morte. No presente trabalho, foi realizado estudo da caracterização de populações do gênero *Solenopsis* que ocorrem no Brasil através de análise do gene mitocondrial da citocromo oxidase I e de estudos filogenéticos, analisando o parentesco dessas populações e inferindo sobre sua filogenia. Nos resultados obtidos encontrou-se desde completa coerência geográfica, até polifilia para as espécies *S. invicta* e *S. saevissima* estudadas, o que demonstra claramente a diversidade desse gênero de formigas encontrado no Brasil. Existe a possibilidade de ocorrer populações isoladas reprodutivamente, tendo como decorrência processos evolutivos de especiação. Além disso, clados com espécies divergentes agrupadas podem trazer evidências de espécies erroneamente identificadas morfologicamente, presente em bancos de dados.

Introdução

Formigas são insetos que possuem alta capacidade adaptativa e estão distribuídas na maioria dos ambientes terrestres em grande abundância e diversidade. Muitas espécies possuem comportamento agressivo, que por sua vez, podem desalojar outras espécies. As espécies invasoras podem dominar vários tipos de habitats, como áreas urbanas e agrícolas que são de grande importância social e econômica para os seres humanos. Nesse grupo estão as formigas do gênero *Solenopsis*, que inclui as conhecidas popularmente como formigas lava-pés, que ocorrem em todo o mundo e possuem ampla distribuição no território brasileiro, inclusive dentro das zonas urbanas, sendo altamente agressivas na defesa da colônia e durante o forrageamento.

A espécie *Solenopsis invicta* Buren, 1972 foi disseminada, a partir da América do Sul para vários locais do mundo através de exportação de madeira (TABER, 2000), sendo encontradas atualmente nos Estados Unidos da América, Oeste das Índias, Nova Zelândia,

Porto Rico, Austrália (HENSCHAW et al., 2005; TSCHINKEL, 2006), Taiwan (CHEN et al., 2006) e China (YIJUAN et al., 2007).

S. invicta foi introduzida de forma não intencional nos Estados Unidos há quase 80 anos atrás e tem se expandido por toda a região sul. Essa espécie é de grande importância econômica, pois está presente particularmente em ambientes modificados pelo homem, causando vários incidentes de reações alérgicas devido a sua ferroada, além de se alimentarem de diversas plantas e se associarem com homóptera que também são sugadores de seiva das plantas, além de afetar a diversidade local de formigas nativas e outros animais (TSCHINKEL, 2006).

Na América do Sul, local de alta diversidade de espécies, a distinção entre espécies de *Solenopsis* é dificultada devido a um número reduzido de caracteres diagnósticos (PITTS et al., 2005), além de pouco definidos, o que dificulta o entendimento da sistemática do grupo (SHOEMAKER et al., 2006).

Wilson (1952) considerou que poderia haver apenas três espécies de lava-pés, com diversas sinonímias. Acreditava que as lava-pés da América do Sul compreendiam mais que um grande formigueiro híbrido, com diversas variantes de hibridizações regionais em áreas de parapatria.

A taxonomia das formigas lava-pés foi revisada por Trager (1991), onde o gênero *Solenopsis* Westwood (Formicidae: Myrmicinae) inclui 185 espécies. A maioria dessas espécies é caracterizada por possuírem operárias pequenas e monomórficas, que formam pequenas colônias e que vivem no interior dos ninhos de outras espécies de formigas, das quais roubam alimento e cria (THOMPSON, 1989). Estes hábitos deram a essas espécies de *Solenopsis* o nome de “thief ants” ou formigas ladras (PITTS et al., 2005).

As demais espécies de *Solenopsis* diferem em muitos aspectos das anteriores por possuírem operárias polimórficas, formarem enormes colônias e serem altamente agressivas tanto na defesa do ninho quanto no forrageamento (PITTS et al., 2005). Devido à ferroada desferida pelas operárias, tais espécies de *Solenopsis* receberam o nome de “fire ants” ou formigas de fogo. Elas foram divididas em quatro grupos de espécies: *S. virulens*, *S. tridens*, *S. geminata* e *S. saevissima*. O grupo de espécies *S. saevissima* consiste de 13 espécies descritas: *S. interrupta*, *S. invicta*, *S. macdonaghi*, *S. mergergates*, *S. pythia*, *S. quinquecuspis*, *S. richteri*, *S. saevissima*, *S. weyrauchi*, *S. electra*, *S. pusillignis*, *S. daguerrei* e *S. hostilis* (PITTS et al., 2005).

Análises filogenéticas realizadas por Shoemaker et al. (2006) para o grupo de espécies *Solenopsis saevissima*, baseada em sequências do DNA mitocondrial de amostras

provenientes de alguns locais da América do Sul (parte do Brasil e Argentina), permitiram inferir que o grupo deve ser monofilético. Verificaram a ocorrência de linhagens com DNA mitocondrial divergentes em várias espécies, como na invasora *S. invicta*, por exemplo, sugerindo que esse padrão polifilético disperso geralmente deriva de delimitações morfológicas que possivelmente sobre limita espécies.

Podem ocorrer espécies crípticas de *S. invicta* e, provavelmente, também em outras espécies do gênero. Esse fato foi constatado pelas divergências observadas no DNA mitocondrial (SHOEMAKER et al., 2003b) e diferenças entre frequências alélicas observadas em análises de aloenzimas, em populações geográficas distintas (ROSS et al., 1997); estudos com aloenzimas realizados por Ross e Trager (1990) revelaram a existência de espécies crípticas, morfológicamente indistinguíveis de *S. quinquecuspis*, uma espécie próxima de *S. invicta*. Essas informações levaram Ross e Shoemaker (2005) a realizarem análises genéticas da delimitação de espécies de lava-pés na América do Sul, partindo do princípio que *S. invicta* e *S. richteri* estão isoladas reprodutivamente nesse local, contrastando com resultados anteriores onde verificaram regiões de formação de híbridos entre essas espécies nos EUA (SHOEMAKER et al., 1996). Além disso, foi proposta a ocorrência de espécies crípticas em *S. invicta* e *S. richteri*, que indicam que o grupo está em um processo de radiação e que divergências morfológicas não estão levando ao isolamento reprodutivo e divergência genética neutra nesse processo.

Ross et al. (2009) utilizando 68 marcadores genéticos para distinguir linhagens de *S. saevissima* do Brasil, encontraram uma variedade de níveis de divergência e distinção evolutiva entre populações regionais da espécie. Verificaram que, enquanto duas populações amplamente distribuídas estão ligadas por níveis substanciais de fluxo gênico recente, outros agrupamentos encontrados são evolutivamente independentes ou na trajetória de se tornarem independentes. Várias dessas linhagens são parapátricas com outras populações, o que sugere que barreiras intrínsecas de pré-acasalamento e pós-acasalamento de fluxo gênico estejam ocorrendo. As diferenciações genéticas localizadas de *S. saevissima* podem estar ocorrendo devido à hibridização interespecífica com outras espécies regionais que ocorrem em simpatria ou parapatria, inclusive *S. geminata*.

Considerando-se que a América do Sul é o principal centro de ocorrência das formigas lava-pés, dois aspectos importantes devem ser considerados, primeiro, a região do Pantanal Sul-Americano é considerado o núcleo de dispersão da *S. invicta*, e, segundo, as demais regiões do Brasil são dominadas pela *S. saevissima*, analisadas por Ahrens et al., (2005a), Ross e Shoemaker, (2005), Shoemaker et al., (2006), Ross et al., (2009).

O DNA mitocondrial possui características interessantes para estudos evolutivos como a herança exclusivamente materna e evolução rápida em parte devido à perda de reparo de mutações (AVISE, 1994). Devido a essas características trata-se de uma molécula importante em termos de estudos filogenéticos e principalmente, como uma ferramenta significativa de diferenciação de espécies em grupos de difícil identificação morfológica.

Objetivos

Caracterizar as populações de lava-pés (*Solenopsis* spp.) provenientes de várias regiões do Brasil, além de algumas amostras de Corrientes (Argentina), através de análises de sequências do DNA mitocondrial, que inclui parte do gene da citocromo oxidase I (utilizando o par de primers C1-J-2195 e DDS-COII-4 ou C1-J-2195 e JerryGarcia-CI) e através de estudos filogenéticos, analisar o parentesco dessas populações e inferir sobre sua filogenia.

Material e métodos

Coleta de espécimes, identificação e preservação do material

As amostras analisadas foram coletadas em 42 localidades nos Estados do Amapá, Amazonas, Pará, Tocantins, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo, além de algumas amostras de Corrientes (Argentina), seguindo transectos Leste-Oeste e outro Norte-Sul do Brasil. A Tabela 1 contém os códigos de coletas, localidade, espécie, haplótipo do DNA mitocondrial e coordenadas geográficas. Os locais de coleta estão representados na Figura 1.

As amostras continham operárias de diversos tamanhos que foram fixadas e mantidas em álcool 80% sob congelamento, para evitar a degradação do DNA, até o momento de uso.

A identificação do material utilizado foi realizada segundo a proposta de Paul D. N. Herbert em utilizar dados do DNA mitocondrial, mais especificamente, da COI (citocromo oxidase I), para identificação de espécies (HEBERT et al., 2003a, HEBERT et al., 2003b, RATNASINGHAM e HEBERT, 2007). Portanto, através do sequenciamento de parte da COI, foram gerados fragmentos de todas as populações, e com o uso do aplicativo Blast do banco NCBI (National Center for Biotechnology Information) foram comparadas com as sequências depositadas no banco gênico. A confirmação da espécie se deu quando houve

grande similaridade das sequências geradas no presente trabalho, com valores de Score altos e E-values com valores 0 ou muito próximo, com aquelas depositadas no banco gênico.

Extração de DNA

A extração de DNA foi total, através de método não fenólico. Foram utilizadas cinco operárias inteiras (pool) em cada extração. As amostras foram homogeneizadas em uma solução para lise celular tamponada, composta de: 100mM Tris, pH 9,1, 100 mM NaCl, 200 mM sacarose, 50 mM de EDTA, 0,5% SDS. O homogeneizado foi incubado a 55 °C, por 3 horas; resíduos de proteínas foram subsequentemente precipitados com NaCl 5M. A precipitação do DNA foi realizada com álcool isopropílico 100%, seguida de lavagem em álcool etílico a 70%. A ressuspensão do DNA foi feita em tampão TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8).

Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

DNA mitocondrial

Através de reações de polimerização em cadeia de DNA, fragmentos de cerca de 920 pares de bases do DNA mitocondrial foram amplificados para todas as amostras. Esse fragmento corresponde a parte do gene da citocromo oxidase I (cerca de 780 pb), RNA transportador de leucina (de 70 pb) e parte da citocromo oxidase II (ao redor de 60 pb). As reações foram feitas em tubos apropriados com volume final de 25 µL, contendo de 250 a 500 ng de DNA template, 0,2-0,4 µM (5-10 pmol) de cada primer, utilizando-se um kit comercial que contém os reagentes necessários (Taq polimerase, tampão, MgCl₂, dNTP's, etc) da Amersham Pharmacia Biotech, denominado Ready-to-go.

O programa do ciclador térmico seguido foi de acordo com Ross e Shoemaker (1997): 1 minuto a 94 °C (denaturação inicial) e 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, anelamento por 1 minuto a 48 °C e extensão a 68 °C por 2 minutos, seguidos por uma extensão final de 72 °C por 5 minutos.

Os primers (iniciadores) utilizados foram: C1-J-2195 (COI-RLR) (5' – TTGATTTTTTGGTCATCCAGAAGT - 3') e DDS-COII-4 (5' – TAAGATGGTTAATGAAGAGTAG - 3') (ROSS e SHOEMAKER, 1997; AHRENS et al.;

2005). Nos casos em que a combinação de primers não amplificou o fragmento desejado, foi utilizado um outro primer substituindo o DDS-COII-4, designado JerryGarcia-CI (5' – GGGGAATTAGAATTTTGAAGAG – 3') (SHOEMAKER et al., 2006), que produz fragmentos de cerca de 780 pb, que incluem apenas a porção do gene citocromo oxidase I (COI).

Sequenciamento do DNA

As reações de sequenciamento foram feitas com química BigDye Terminator (Applied Biosystem Inc). Ambas as cadeias de DNA de cada amostra foram sequenciadas separadamente, usando os respectivos primers para a reação senso (C1-J-2195) ou anti-senso (DDS-COII-4 ou JerryGarcia-CI) (ROSS e SHOEMAKER, 1997; AHRENS et al.; 2005; SHOEMAKER et al., 2006). Para tal, foi utilizado um sequenciador automático modelo ABI Prism 377 (Applied Biosystem Inc.). As reações de sequenciamento foram feitas a partir de protocolo padrão fornecido pelo fabricante e tiveram um volume final de 10 uL. Os produtos de extensão de DNA foram precipitados com isopropanol 75%.

Análises dos resultados

As sequências obtidas, foram inicialmente analisadas separadamente com o uso do programa BioEdit e alinhadas por meio do aplicativo Clustal (HIGGINS et al., 1992) e editadas manualmente. Um segundo alinhamento mais refinado foi realizado com o uso do programa MUSCLE3.6 (EDGAR, 2004).

O número e a frequência de haplótipos únicos foi determinada com o uso dos programas DnaSP4.90 (ROZAS et al., 2003) e Network4.5 (fluxus-engineering.com) utilizando o parâmetro Median Joining (BANDELT et al., 1999).

Após alinhamento, o conjunto de dados foi submetido à análise do sinal filogenético no programa DAMBE (XIA e XIE, 2001).

Após as sequências devidamente alinhadas com um conjunto de sequências provenientes do banco gênico (Tabela 2), foram excluídas algumas bases do final do fragmento correspondentes a uma região com alinhamento insatisfatório, ficando uma matriz com cerca de 700 pares de bases, compreendendo apenas o gene a citocromo oxidase I (COI). Posteriormente, os dados foram submetidos aos programas de análise filogenética.

A reconstrução da filogenia a partir de máxima parcimônia foi realizada com o uso do programa PAUP, versão 4.0 (SWOFFORD, 2003). Os dados foram tratados com mesmo peso tanto para gaps quanto para substituição. Para gerar os índices de bootstrap foram utilizadas 1000 réplicas.

A reconstrução da filogenia a partir da análise Bayesiana foi realizada com o programa MrBayes (HUELSENBECK et al., 2001). Foi utilizado o modelo GTR+G com uma proporção de sítios invariáveis e os restantes retirados de uma distribuição gama, a cadeia de Markov foi rodada por 1.000.000 gerações e amostradas a cada 100 gerações. Para sumarização dos valores paramétricos e das árvores geradas foram descartadas 10% das árvores e os valores de probabilidade posterior foram calculados com o restante das árvores.

Resultados

Foram analisadas amostras provenientes de 114 colônias de 42 localidades de diversas espécies de *Solenopsis* localizadas em todas as regiões do Brasil, além de algumas amostras de Corrientes, na Argentina.

Das 114 colônias analisadas, foram detectadas 72 sequências únicas da COI do DNA mitocondrial (haplótipos) ilustrada na rede de haplótipos na Figura 2. A Tabela 1 indica as espécies identificadas através da COI, as localidades de coleta (georreferenciadas) e os haplótipos correspondentes.

O resultado obtido na análise do sinal filogenético indicado na forma gráfica na Figura 3 indica que o número de transições está acima do de transversões em função da divergência entre sequências nucleotídicas, indicando um ótimo sinal filogenético.

O resultado das análises filogenéticas das populações de *Solenopsis*, baseadas em uma porção do gene COI, está representado na Figura 4. Dos 726 caracteres utilizados na análise de máxima parcimônia, 482 eram constantes e 206 eram caracteres informativos (parsimony-informative). Foram encontradas 48 árvores igualmente parcimoniosas.

Ambas as análises (MP e IB) foram praticamente congruentes e apenas a árvore da análise Bayesiana está ilustrada com valores de probabilidade posterior.

A análise filogenética foi enraizada (outgroup) com um representante da espécie *Monomorium pharaonis* proveniente do banco gênico. Também foram incorporados na análise diversas sequências de grupos internos de várias espécies de *Solenopsis* provenientes do banco gênico (Tabela 2).

A análise da árvore indica a ocorrência de vários clados, a maioria bem suportados, e os seguintes resultados podem ser destacados:

Clado 1. observa-se a presença de espécies divergentes, agrupadas como espécies próximas, não concordando com a filogenia proposta por outros autores (SHOEMAKER et al., 2006; TSCHINKEL, 2006). Foram agrupadas neste clado representantes das espécies *S. geminata* e *S. saevissima*.

Clado 2. encontram-se representantes da espécie *S. pusillignis* provenientes de Ladário, MS agrupadas com representante proveniente do banco gênico (AY950775) da mesma espécie.

Clado 3. encontram-se representantes da espécie *S. saevissima* proveniente de populações da região norte, além de representantes provenientes do banco gênico (AY950715, FJ467557, FJ467537). Pode-se notar a separação desse clado de outro de populações de *S. saevissima* (clado 7), provenientes da região sudeste do Brasil.

Clado 4. observa-se novamente a presença de espécies divergentes, sendo estas representantes das espécies *S. saevissima*, *S. megergates* e *S. invicta*.

Clado 5. encontram-se representantes da espécie *S. invicta* provenientes de populações dos Estados de São Paulo, Paraná, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, formando um clado bem suportado de espécimes de *S. invicta*, que parece ter ocorrência apenas nestas regiões geográficas.

Clado 6. como na anterior a presença de representantes da espécie *S. invicta* provenientes de Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina encontram-se agrupados, formando um segundo clado de *S. invicta*.

Clados 8, 9 e 10. encontram-se agrupados representantes das espécies *S. invicta* e *S. saevissima*, formando um agrupamento isolado de representantes dessas espécies que não se alocaram nos clados descritos. Ainda, um terminal com representante de *S. invicta* proveniente do Rio de Janeiro, aparece basal, juntamente com o clado 10 em relação aos clados 5, 6, 7, 8 e 9.

Os resultados encontrados nessas análises demonstram a existência de clados bem suportados de *S. invicta* e *S. saevissima* de regiões geográficas distintas, ocorrendo uma separação entre *S. saevissima* provenientes da região Norte daquelas que ocorrem ao Sul no Brasil, da mesma maneira que *S. invicta* separa-se entre representantes das Regiões Sul e Sudeste do país.

Discussão

Os resultados obtidos revelam desde completa coerência de agrupamento de populações segundo distribuição geográfica, até polifilia para as espécies *S. invicta* e *S. saevissima*, o que demonstra explicitamente a diversidade deste gênero de formigas encontrado no Brasil. Além disso, a presença de clados com espécies divergentes agrupadas sugere erros de identificação morfológica das espécies.

A diferenciação visual entre espécies distintas de *Solenopsis* é dificultada devido a pouca definição de caracteres morfológicos (PITTS et al., 2005). Nesse sentido, dados moleculares podem ajudar a esclarecer certas dúvidas reveladas pela identificação morfológica de algumas espécies, ou até mesmo, ser uma das principais ferramentas na diferenciação de espécies através do DNA Barcode (HEBERT et al., 2003a, HEBERT et al., 2003b, RATNASINGHAM e HEBERT, 2007).

Agrupamentos de espécies divergentes foram observados nos clados 1, 4, 6, 8 e 9 (Figura 4). No caso do clado 1 pode-se admitir que a classificação baseada em caracteres morfológicos da espécie *S. saevissima* obtida do banco gênico (FJ467529) pode estar incorreta, pois encontra-se num agrupamento de *S. geminata*, coerente com a região de ocorrência dessa espécie. Considerando-se ainda que *S. geminata* é um representante do grupo de espécies *geminata*, e *S. saevissima* representante do grupo de espécie *saevissima*, eles não deveriam se agrupar no mesmo ramo. A mesma sugestão pode ser dada no clado 6, onde um representante do banco gênico de *S. megergates* (AY950773), proveniente de Curitiba (PR), agrupa-se com representantes de *S. invicta* de populações da Região Sul do Brasil. Apesar de serem representantes do mesmo grupo de espécies e relativamente próximos (PITTS, 2002), este agrupamento não deveria ser esperado, uma vez que representantes de *S. megergates* estão no clado 4. Ainda no clado 4, agrupamentos divergentes ocorreram com representante do banco gênico de *S. saevissima* (AY950711) e *S. invicta* (AY950708) podendo também se tratarem de espécies erroneamente identificadas pelos caracteres morfológicos e depositadas no banco de dados.

Os clados 8 e 9, ocorrem como irmãos do clado 7 que possui representantes da espécie *S. saevissima*; porém, no clado 8, encontra-se terminais com representantes das espécies *S. invicta* e *S. saevissima* formando grupos irmãos e no clado 9, representantes de *S. invicta* e *S. saevissima*. Esses agrupamentos são distintos dos clados de *S. invicta* (clados 5 e 6) e de *S. saevissima* (clados 3 e 7), que se destacam por diferentes regiões geográficas de ocorrência, podendo evidenciar possíveis clados não suportados nessa análise. Isto seria possível por falta

de coleta em alguma região onde poderia ocorrer representantes que se agrupariam com esses e formar novos clados, como encontrado por Shoemaker et al. (2006).

A completa coerência da distribuição geográfica encontrada em algumas populações de *Solenopsis* aqui analisadas pode ser explicada por diversos fatores. Shoemaker et al. (2006) sugeriram que a polifilia observada no grupo de espécies *Solenopsis saevissima* pode ser devido a um resultado de uma antiga hibridização interespecífica seguida de introgressão do DNAm. Como genes do DNA mitocondrial são menos influenciados pela ligação a genes nucleares menos dominantes, capturas de genomas citoplasmáticos são esperadas com maior frequência que introgressão nuclear (HARRISON, 1990; FUNK e OMLAND, 2003), e os genes nucleares envolvidos em fenótipos espécie específicos podem estar sob ação direta de seleção purificadora. A polifilia também observada no presente trabalho, para algumas espécies, pode ser devido essa característica dos genes mitocondriais, resultando numa expansão de determinados genomas mitocondriais em determinadas regiões geográficas. Por outro lado, a polifilia pode ser devido ao sucesso de hibridizações entre espécies de *Solenopsis*. Esse evento deve ter ocorrido há muito tempo, porque a presença de haplótipos relacionados ocorrendo em diferentes espécies não são frequentes e a maioria dos clados possui representantes de uma única espécie nominal.

Funk e Omland (2003) consideraram que a polifilia pode ser um artefato de espécies erroneamente identificadas, ou devido aos exemplares estarem nos limites entre espécies e do locus de estudo, ou até mesmo informação inadequada (como baixa resolução filogenética decorrente de artefatos na reconstrução filogenética); mas também, pode refletir aspectos da história alélica fornecendo importantes dados para a biologia da espécie.

Ross et al. (2009) consideraram que o grupo de espécies *S. saevissima* compreende um complexo de espécies crípticas que, provavelmente, não representam o produto de um único evento de especiação. Indicaram provisoriamente as regiões ocidentais do Brasil e da Amazônia como sendo constituída de populações de *S. saevissima sensu stricto* e as populações das regiões do planalto sul do Brasil, sudeste do Atlântico e central do Atlântico devem cada uma delas, possuir exemplares de novas espécies ainda não descritas. Diversos autores descreveram as variações morfológicas de espécies de *Solenopsis* (WILSON, 1952; TRAGER, 1991; PITTS, 2002) e, estudos genéticos atuais geralmente suportam a idéia de distintas populações isoladas reprodutivamente que correspondem a espécies reconhecidas (ROSS e TRAGER, 1990; ROSS e SHOEMAKER, 2005). Grupos genéticos divergentes também já foram detectados dentro de espécies nominais, trazendo a possibilidade de ocorrência de espécies crípticas (ROSS e SHOEMAKER, 2005; SHOEMAKER et al., 2006;

ROSS et al., 2007). Ross et al. (2009) suportam a idéia de uma baixa resolução nas delimitações morfológicas no grupo de espécies de *Solenopsis saevissima* na América do Sul.

As polifilias encontradas em *S. invicta* (Figura 4), também já foram observadas por outros autores (SHOEMAKER et al., 2000; SHOEMAKER et al., 2003; SHOEMAKER et al., 2006). Shoemaker et al. (2006) encontraram discordância entre a filogenia reconstruída com haplótipos de DNAmT e aquela baseada na morfologia além de sete clados bem suportados da espécie *S. invicta*. Sugerem que a polifilia da sequência do DNA mitocondrial dessas espécies parecem resultar na maioria dos casos do amontoamento de múltiplos caracteres morfológicos indistinguíveis que representam linhagens genética e evolutivamente indistinguíveis e independentes (espécies crípticas). Concluíram que delimitações morfológicas correntes sobreestimam a distribuição de lava-pés e assumem que a árvore que eles obtiveram do DNAmT fielmente localiza o desenvolvimento de isolamento reprodutivo e padrões de ancestralidade de populações de espécies do grupo *S. saevissima*.

Ross e Shoemaker (2005) revelaram a existência de espécies crípticas em *S. invicta* e *S. richteri*. Os dados também revelaram que populações da mesma espécie separadas por até 800km são distintas uma da outra entre seus genomas, como são populações heteroespecíficas de várias espécies nominais de lava-pés. Esses dados, juntamente com as informações de Shoemaker et al (2006) confirmam os clados múltiplos e divergentes e bem suportados de *S. invicta* e *S. richteri*, implicando que múltiplas linhagens evolutivas independentes, que podem eventualmente justificar o reconhecimento como espécies distintas, provavelmente existem em ambos os táxons.

O agrupamento geográfico observado em *S. invicta* (clados 5 e 6) e em *S. saevissima* (clados 3, 7) pode ser explicado pela hipótese de que populações regionais de cada uma dessas espécies derivaram de refúgios ou grandes áreas isoladas de endemismo anterior, a partir do qual a expansão tenha ocorrido (AHRENS et al., 2005; SHOEMAKER et al., 2006). Ainda, deve-se evidenciar que uma limitação para a expansão de um determinado haplótipo de DNAmT é a pequena habilidade de rainhas monogínicas de espécies de *Solenopsis* recém inseminadas em dispersarem por longas distâncias (MARKIN et al., 1971), sendo que em rainhas poligínicas a distância de dispersão é ainda menor (DEHEER et al., 1999).

Uma hipótese bastante provável para a separação em clados divergentes de *S. saevissima* (clados 3 e 7) são os padrões de habitats, particularmente em relação ao clima que predomina nas diferentes regiões que os clados representam. O clado 3 possui representantes dos estados do Tocantins, Amazonas, Pará e Amapá que se caracterizam por serem regiões quentes, passando do semi-úmido (TO) pelo úmido (AM, PA, AP), compreendendo o Bioma

Amazônia. Já o clado 7 possui representantes dos estados mais ao sul do Brasil, onde o clima predominante são os tipos subequatorial (SP) e mesotérmico brando (RS, SC).

Uma observação adicional que pode suportar o fato de não haver fluxo gênico é a existência de poucos haplótipos de DNAm_t que são compartilhados por diferentes populações. Do total de 72 haplótipos encontrados, apenas 13 são compartilhados por colônias de localidades diferentes. Isto pode ser visto pelo tamanho dos círculos, indicados na rede de haplótipos na Figura 2 e Tabela 1 para referência das localidades.

Em insetos onde a infecção por *Wolbachia* é frequente, introgressão do DNAm_t pode ocorrer, até com hibridizações menos frequentes, porque a *Wolbachia* pode induzir a seleção de genomas citoplasmáticos (SHOEMAKER et al., 2003). O envolvimento da *Wolbachia* pode estar relacionado com a divergência encontrada nos clados das espécies *S. invicta* e *S. saevissima*. Essa divergência pode se tratar do rastro deixado a partir do aumento de taxas de substituição no DNAm_t, associado com recorrentes infecções de *Wolbachia* em linhagens de hospedeiros infectados (SHOEMAKER et al., 2004). Para que este cenário seja possível, clados separados de espécies correspondentes devem estar totalmente isolados ou com mínimas migrações, o que deve ser o caso das populações estudadas, pois elas se encontram separadas geograficamente por muitos quilômetros. Além disso, as populações de *Solenopsis* de ocorrência no Brasil possuem altas taxas de infecção por *Wolbachia*, contrapondo algumas localidades onde a taxa de infecção é baixa ou mesmo ausente (MARTINS et al. não publicado).

Ross et al. (1997) postularam que o rio Paraná pode servir como uma principal barreira para o fluxo gênico que tem influenciado a estrutura e a evolução de populações nativas de lava-pés, e até o momento, não existe nenhuma informação explícita que suporte essa hipótese (AHRENS et al., 2005). Da mesma maneira, o presente trabalho também não fornece informações para suportar essa hipótese, apesar do clado 5 possuir populações de *S. invicta* do noroeste do Brasil separadas daquelas do sudeste, no clado 6 a *S. invicta* de Campo Grande, MS se agrupa com outras do sul do Brasil, sendo portanto separadas pelo Rio Paraná, podendo ser possível que fluxo gênico mitocondrial entre essas regiões possa ocorrer.

O transporte de formigas, conseqüentemente o fluxo gênico, pela atividade humana é comum o suficiente para reduzir os efeitos de barreiras geográficas e distância física. Por outro lado, esses movimentos não devem ser tão frequentes e regulares de maneira a prevenir a contínua divergência genética de populações geográficas (AHRENS et al., 2005). É importante salientar que *Solenopsis* possui status de inseto invasor e não se pode excluir a possibilidade de populações que ocorrem ao noroeste do Rio Paraná ou daquelas que ocorrem

no sul do Brasil, não possam estar sendo transportadas através da atividade humana para outras localidades. Esse fato pode estar ocultando a real distribuição e história evolutiva desse gênero na sua região de origem. Não menos importante é o fato de que as coletas realizadas para esse trabalho foram feitas em locais de interferência humana, em áreas urbanizadas ou ao longo de rodovias.

A hipótese de ocorrência de transporte de formigas pela atividade humana encontra apoio nos estudos de Lofgren (1986) e várias vezes enfatizada no livro de Tschinkel (2006) que relata que a atividade humana facilitou a dispersão de *S. invicta* para pontos distantes, após sua introdução nos EUA. Apesar da diversidade de formigas ser maior na América do Sul, inclusive de *Solenopsis*, algumas espécies podem estar sendo favorecidas pela redução das florestas nativas e implantação de monoculturas em detrimento de outras.

Diante dos resultados obtidos, incluindo nas análises informações do banco gênico, é evidente a identificação morfológica errônea de vários exemplares de *Solenopsis*, talvez devido ao fato de um número reduzido de caracteres diagnósticos ser utilizado na identificação (PITTS et al., 2005).

Considerações finais

A grande evidência das formigas lava-pés se deve às suas introduções nos EUA no início do século passado e mais tarde em vários outros países do ocidente e do oriente. Com modo de vida generalista e sem inimigos naturais elas se estabeleceram, ocorreu aumento populacional e rapidamente a área de ocupação foi se expandindo.

Devido aos possíveis danos econômicos causados aos fazendeiros (nem sempre real) e a sua potente arma de defesa, o ferrão, com capacidade de inocular veneno, causador de graves alergias, primeiro os próprios fazendeiros e depois o próprio governo declaram guerra às formigas lava-pés, que durou cerca de 40 anos, muito bem documentada em dois livros organizados por Buhs (2004) e Tschinkel (2006).

A guerra foi exclusivamente química com a aplicação de toda família de inseticidas clorados (milhões de toneladas foram aplicadas). Com o passar do tempo começaram a aparecer os danos provocados pelo mau uso dos produtos químicos clorados, tanto em termos ambientais como no caso da saúde pública.

Verbas vultuosas foram destinadas, inicialmente, ao combate às formigas e depois às pesquisas acadêmicas, o que ocorre até os dias atuais. O resultado desse investimento é o número enorme de publicações científicas sobre as formigas lava-pés, realizadas pelos norte

americanos. Isso incluiu pesquisas na América do Sul, inicialmente para conhecer a biologia das espécies em seus ambientes naturais e mais tarde seus inimigos naturais. Por isso, são raros os trabalhos com formigas lava-pés realizados exclusivamente por pesquisadores brasileiros.

O eminente mirmecologista Edward O. Wilson, na época da guerra, foi um ferrenho defensor dos estudos básicos, a história natural das formigas lava-pés. Já na década de 1950, considerava que as formigas lava-pés na América do Sul compreendiam um enorme formigueiro híbrido com diversas hibridizações regionais em áreas de parapatria (WILSON, 1952).

Atualmente, com o emprego de técnicas de biologia molecular esse fato vem se confirmando e realçada por Shoemaker et al. (1996) e recentemente por Ross et al. (2009). Assim os dados obtidos no presente trabalho corroboram essa idéia, como populações regionais isoladas e diferenciadas geneticamente de outras populações da mesma espécie, mas que ocorrem em outras regiões do Brasil.

Resolver relações interespecíficas e limites de espécies é importante para entender padrões de diversificação na América do Sul, que é o local de dispersão desse gênero de formigas, além dessas questões serem muito importantes devido ao fato das formigas lava-pés estarem caminhando para se tornarem uma praga global.

Sabe-se que *Solenopsis* é um grupo complexo, onde representantes de algumas espécies podem se cruzar e pode haver formação de híbridos nas regiões onde co-ocorrem no Brasil. Nesses locais, podem ocorrer populações isoladas reprodutivamente, tendo como consequência processos evolutivos de especiação. Além disso, essa provável diversificação de espécies pode também ser decorrente da presença de microorganismos endossimbiontes como a infecção por *Wolbachia*. Essa bactéria pode atuar como um catalisador da especiação, levando a restrições de cruzamentos das populações, através da incompatibilidade citoplasmática, e conseqüentemente especiação do tipo simpátrica.

Novos estudos da distribuição e grau de parentesco entre as populações de *Solenopsis* que ocorrem no Brasil devem ser estimulados, principalmente com técnicas de marcadores moleculares, de maneira a explorar a diversidade que ainda não está devidamente registrada na literatura especializada sobre essas populações naturais.

Outra preocupação se refere aos dados depositados em bancos genéticos, que certamente foram informados com identificações morfológicas inadequadas. Assim, quando se utiliza desses bancos, cautela deve ser tomada para identificação de espécies através do

Barcode, da mesma forma verificada para *Linepithema humile* por Wild (2009), pois identificações morfológicas inadequadas parecem ser uma constante no gênero *Solenopsis*.

Referências

- 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.
- AVISE, J. C. **Molecular markers, natural history, and evolution**. New York, NY: Chapman and Hall. 1994.
- BANDEL, H.-J.; FOSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**. v. 16, p. 37-48. 1999.
- BUHS, J. B. **The fire ant wars: nature, science and public policy in the twentieth-century America**. The University of Chicago Press, Chicago, USA. 2004.
- CHEN, J. S. C.; SHEN, C.-H.; LEE, H.-J. Monogynous and polygynous red imported fire ants, *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae), in Taiwan. **Environmental Entomology**. v. 35, p. 167-172. 2006.
- DEHEER, C. J.; GOODISMAN, M. A. D.; ROSS, K. G. Queen dispersal strategies in the multiple-queen form of the fire ant *Solenopsis invicta*. **American Naturalist**. v. 153, p. 660-675. 1999.
- EDGAR, R. C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acid Research**. v. 32(5), p. 1792-97. 2004.
- FUNK, D. J.; OMLAND, K. E. Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. **Annual Review of Ecology Evolution and Systematics**. v. 34, p. 397-423. 2003.
- HARRISON, R. G. Hybrid zones: windows on evolutionary process. **Oxford Surveys in Evolutionary Biology**. v. 7, p. 69-128. 1990.
- HEBERT P. D. N.; CYWINSKA A.; BALL S. L.; deWAARD J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences**. v. 270, p. 313-321. 2003a.
- HEBERT P. D. N.; RATNASINGHAM S.; deWAARD J. R. Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences**. v. 270, p. 596-599. 2003b.
- HENSCHAW, M. T.; KUNZMANN, N.; VANDERWOUDE, C.; SENETRA, M.; CROZIER, R. H. Population genetics and history of the introduced fire ant, *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae) in Australia. **Austral Journal of Entomology**. v. 44, p. 37-44. 2005.
- HIGGINS, D. G.; BLEASBY, A. J.; FUCHS, R. Clustal V: Improved software for multiple sequence alignment. **Computer Applications in the Biosciences**. v. 8, p. 189-191. 1992.
- HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F.; NIELSEN, R.; BOLLBACK, J. P. Evolution: Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. **Science**. v. 294, p. 2310-2314. 2001.

LOFGREN, C. S. History of imported fire ants in the United States. In: LOFGREN, C. S.; VANDER MEER, R. K. (Ed.). **Fire ants and leaf cutting ants: biology and management**. Westview Press, Boulder, CO. 1986.

MARKIN, G. P.; DILLIER, J. H.; HILL, S. O.; BLUM, M. S.; HERMANN, H. R. Nuptial flight and flight ranges of the imported fire ant *Solenopsis saevissima richteri* (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of the Georgia Entomological Society**. v. 6, p. 145–156. 1971.

PITTS, J. P. **A cladistic analysis of the *Solenopsis saevissima* species-group (Hymenoptera: Formicidae)**. Dissertação de Ph.D., Universidade da Georgia, Athens, Georgia. 2002.

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.

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

ROSS, K. G.; GOTZEK, D.; ASCUNCE, M. S.; SHOEMAKER, D. D. Species delimitation: a case study in a problematic ant taxon. **Systematic Biology**. v. 59, p. 1-23. 2009.

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.; VARGO, 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. Nuclear and mitochondrial genetic structure in two social forms of the fire ant *Solenopsis invicta*: insights into transitions to an alternate social organization. **Heredity**. v. 78, p. 590-602. 1997.

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

ROSS, K. G.; TRAGER, J. C. Systematics and population genetics of fire ants (*Solenopsis saevissima* complex) from Argentina. **Evolution**. v. 44, p. 2113-2134. 1990.

ROZAS, J.; SÁNCHEZ-DELBARRIO, J. C.; MESSEGUER, X.; ROZAS, R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics**. v. 19, p. 2496-97. 2003.

SHOEMAKER, D. D.; AHRENS, M. E.; ROSS, K. G. Molecular phylogeny of the 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.; DYER, K. A.; AHRENS, M.; McABEE, K.; JAENIKE, J. Decreased diversity but increased substitution rate in host mtDNA as a consequence of *Wolbachia* endosymbiont infection. **Genetics**. v. 168, p. 2049-2058. 2004.

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

SHOEMAKER, D. D.; ROSS, K. G.; ARNOLD, M. L. Genetic structure and evolutions of the fire ant hybrid zone. **Evolution**. v. 50, p. 1958-1976. 1996.

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

SWOFFORD, D. L. **Phylogenetic analyses using parsimony, version 4.0b10**. Smithsonian Institution, Washington DC. 2003.

TABER, S. W. **Fire ants**. Texas A&M University Press: Texas, EUA. 2000.

THOMPSON, C. R. The thief ants, *Solenopsis molesta* group, of Florida (Hymenoptera: Formicidae). **Florida Entomologist**. v. 72, p. 268-283. 1989.

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

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

WILD, A. L. Evolution of the Neotropical ant genus *Linepithema*. **Systematic Entomology**. v. 34(1), p. 49-62. 2009.

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

XIA, X. e XIE, Z. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. **Journal of Heredity**. v. 92, p. 371-73. 2001.

YIJUAN, X.; YOUNGYUE, L.; LING, Z.; GUANGWEN, L. Foraging behavior and recruitment of red imported fire ant *Solenopsis invicta* Buren in typical habitats of South China. **Acta Ecologica Sinica**. v. 27, p. 855-860. 2007.

ANEXOS:

Tabela 1: Código de coleta, localidade, espécie, haplótipo do DNA mitocondrial, coordenadas geográficas.

| Espécie da Formiga | Localidade Código de coleta | Haplótipo DNA mt | Coordenadas |
|---------------------------|--|-------------------------|--------------------------|
| <i>S. geminata</i> | E1820 Manaus, AM | H63 | S03°06'25" W60°01'34" |
| <i>S. geminata</i> | E1825 Manaus, AM | H64 | S03°06'25" W60°01'34" |
| <i>S. geminata</i> | E1818 Manaus, AM | H70 | S03°06'25" W60°01'34" |
| <i>S. geminata</i> | E1823 Manaus, AM | H73 | S03°06'25" W60°01'34" |
| <i>S. geminata</i> | E1830 Manaus, AM | H77 | S03°06'25" W60°01'34" |
| <i>S. geminata</i> | E1826 Manaus, AM | H75 | S03°06'25" W60°01'34" |
| <i>S. geminata</i> | E1827 Manaus, AM | H75 | S03°06'25" W60°01'34" |
| <i>S. geminata</i> | E1832 Manaus, AM | H78 | S03°06'25" W60°01'34" |
| <i>S. geminata</i> | E1822 Manaus, AM | H78 | S03°06'25" W60°01'34" |
| <i>S. invicta</i> | E1710(2) Rio de Janeiro, RJ | H11 | S22°58'51" W43°16'75" |
| <i>S. invicta</i> | E1628 Campo Grande, MS | H4 | S20°27'59" W54°35'33" |
| <i>S. invicta</i> | E1648 Caçador, SC | H5 | S26°47'06" W50°59'27" |
| <i>S. invicta</i> | E1652 Miranda, MS | H2 | S20°14'29" W56°22'43" |
| <i>S. invicta</i> | E1680 Bento Gonçalves,RS | H3 | S29°07'22" W51°20'58" |
| <i>S. invicta</i> | E1683 Ubatuba, SP(1) | H8 | S23°30'21" W45°07'55" |
| <i>S. invicta</i> | E1684 Ubatuba, SP(2) | H9 | S23°30'21" W45°07'55" |
| <i>S. invicta</i> | E1685 Ubatuba, SP(2)B | H9 | S23°30'21" W45°07'55" |
| <i>S. invicta</i> | E1686 Picinguaba, SP | H11 | S23°19'02" W44°54'04" |
| <i>S. invicta</i> | E1704 Corumbá, MS | H30 | S19°30'31" W57°20'05" |
| <i>S. invicta</i> | E1705 Corumbá, MS | H31 | S18°45'11" W57°07'09" |
| <i>S. invicta</i> | E1706 Corumbá, MS | H32 | S18°50'00" W57°18'55" |
| <i>S. invicta</i> | E1707 Corumbá, MS | H33 | S18°50'00" W57°18'55" |
| <i>S. invicta</i> | E1709(1) Rio de Janeiro, RJ | H11 | S22°58'51" W43°16'75" |
| <i>S. invicta</i> | E1720 Paraná | H37 | S25°25'46" W49°16'18" |
| <i>S. invicta</i> | E1721 Corumbá, MS | H31 | S19°00'23" W57°39'10" |
| <i>S. invicta</i> | E1722 Corumbá, MS | H31 | S19°00'23" W57°39'10" |

Continuação.

| Espécie da Formiga | Localidade Código de coleta | Haplótipo DNA mt | Coordenadas |
|---------------------------|--|-------------------------|---------------------------|
| <i>S. invicta</i> | E1723 Porto Esperança, MT | H31 | S14°09'40" W56°04'38" |
| <i>S. invicta</i> | E1724 Porto Esperança, MT | H40 | S14°09'40" W56°04'38" |
| <i>S. invicta</i> | E1725 Porto Alegre, RS | H41 | S29°59'14" W51°09'580" |
| <i>S. invicta</i> | E1726 Porto Alegre, RS | H41 | S29°59'14" W51°09'580" |
| <i>S. invicta</i> | E1727 Porto Alegre, RS | H42 | S29°59'14" W51°09'580" |
| <i>S. invicta</i> | E1737 Rio Claro, SP | H36 | S22°23'34" W47°33'21" |
| <i>S. invicta</i> | E1739 Rio de Janeiro, RJ | H68 | S22°58'51" W43°16'75" |
| <i>S. invicta</i> | E1741 Rio de Janeiro, RJ | H11 | S22°58'51" W43°16'75" |
| <i>S. invicta</i> | E1744 Ubatuba, SP | H43 | S23°30'21" W45°07'55" |
| <i>S. invicta</i> | E1748 Ubatuba, SP | H46 | S23°30'21" W45°07'55" |
| <i>S. invicta</i> | E1749 Ubatuba, SP | H9 | S23°30'21" W45°07'55" |
| <i>S. invicta</i> | E1752 Ubatuba, SP | H9 | S23°30'21" W45°07'55" |
| <i>S. invicta</i> | E1754 São Luiz do Paraitinga, SP | H50 | S23°12'22" W45°20'43" |
| <i>S. invicta</i> | E1768 Anastácio, MS | H51 | S20°28'46" W55°48'08" |
| <i>S. invicta</i> | E1770 Aquidauana, MS | H51 | S20°28'42" W55°47'03" |
| <i>S. invicta</i> | E1771 Aquidauana, MS | H53 | S20°28'42" W55°47'03" |
| <i>S. invicta</i> | E1780 Registro, SP | H9 | S24°31'46" W47°51'24" |
| <i>S. invicta</i> | E1781 Registro, SP | H9 | S24°31'46" W47°51'24" |
| <i>S. invicta</i> | E1783 Alfredo Wagner, SC | H54 | S27°41'42" W49°19'53" |
| <i>S. invicta</i> | E1786 Bento Gonçalves, RS | H55 | S29°09'48" W51°31'54" |
| <i>S. invicta</i> | E1788 Pinto Bandeira, RS | H56 | S29°07'21" W51°26'56" |
| <i>S. invicta</i> | E1789 Pinto Bandeira, RS | H56 | S29°07'21" W51°26'56" |
| <i>S. invicta</i> | E1794 Curitiba, PR | H58 | S25°25'42" W49°16'25" |
| <i>S. invicta</i> | E1808 Corrientes, Argentina | H59 | S27°18'39" W58°33'44" |
| <i>S. invicta</i> | E1807 Corrientes, Argentina | H59 | S27°18'39" W58°33'44" |
| <i>S. invicta</i> | E1805 Corrientes, Argentina | H59 | S27°18'39" W58°33'44" |
| <i>S. invicta</i> | E1801 Corrientes, Argentina | H59 | S27°18'39" W58°33'44" |

Continuação.

| Espécie da Formiga | Localidade Código de coleta | Haplótipo DNA mt | Coordenadas |
|---------------------------|--|-------------------------|--------------------------|
| <i>S. invicta</i> | E1803 Corrientes, Argentina | H59 | S27°18'39" W58°33'44" |
| <i>S. invicta</i> | E1802 Corrientes, Argentina | H59 | S27°18'39" W58°33'44" |
| <i>S. invicta</i> | E1806 Corrientes, Argentina | H59 | S27°18'39" W58°33'44" |
| <i>S. invicta</i> | E1810 Corrientes, Argentina | H59 | S27°18'39" W58°33'44" |
| <i>S. invicta</i> | E1798 Recife, PE | H43 | S08°07'49" W34°54'09" |
| <i>S. invicta</i> | E1799 Maringá, PR | H37 | S23°25'35" W51°56'46" |
| <i>S. invicta</i> | E1800 Maringá, PR | H37 | S23°25'35" W51°56'46" |
| <i>S. invicta</i> | E1784 Lages, SC | H61 | S27°48'57" W50°22'17" |
| <i>S. invicta</i> | E1787 Pinto Bandeira, RS | H56 | S29°07'21" W51°26'56" |
| <i>S. invicta</i> | E1790 Capão Alto, RS | H62 | S28°00'23" W50°32'26" |
| <i>S. invicta</i> | E1815 Pelotas, RS | H69 | S31°46'33" W52°20'33" |
| <i>S. invicta</i> | E1816 Pelotas, RS | H79 | S31°46'33" W52°20'33" |
| <i>S. invicta</i> | E1646 Caçador, SC | H85 | S26°46'32" W51°00'56" |
| <i>S. invicta</i> | E1645 Caçador, SC | H84 | S26°46'32" W51°00'56" |
| <i>S. megergates</i> | E1782 São Francisco, SC | H68 | S26°33'53" W48°43'10" |
| <i>S. megergates</i> | E1793 Areia Branca, PR | H68 | S25°51'45" W19°21'45" |
| <i>S. megergates</i> | E1644 Caçador, SC | H68 | S26°46'32" W51°00'56" |
| <i>S. megergates</i> | E1643 Caçador, SC | H68 | S26°46'32" W51°00'56" |
| <i>S. pusillignis</i> | E1657 Ladário, MS | H17 | S19°01'05" W57°33'04" |
| <i>S. pusillignis</i> | E1708 Ladário, MS | H34 | S19°01'03" W57°34'11" |
| <i>S. saevissima</i> | E1608 Eirunepé, AM | H16 | S6°38'55" W69°52'32" |
| <i>S. saevissima</i> | E1615 Rio Claro, SP | H6 | S22°23'34" W47°33'44" |
| <i>S. saevissima</i> | E1631 Ipeúna, SP | H7 | S22°26'11" W47°43'10" |
| <i>S. saevissima</i> | E1640 Belém, PA | H15 | S01°23'28" W48°28'43" |
| <i>S. saevissima</i> | E1650 Juiz de Fora, MG | H39 | S21°45'51" W43°20'56" |
| <i>S. saevissima</i> | E1662 Macapá, AP UFAP | H13 | S00°00'23" W51°05'06" |
| <i>S. saevissima</i> | E1666 Macapá, AP IEPA | H14 | S00°02'19" W51°05'39" |

Continuação.

| Espécie da Formiga | Localidade Código de coleta | Haplótipo DNA mt | Coordenadas |
|---------------------------|--|-------------------------|--------------------------|
| <i>S. saevissima</i> | E1671 Macapá, AP | H12 | S00°02'19" W51°05'39" |
| <i>S. saevissima</i> | E1682 Bento Gonçalves,RS | H1 | S29°04'31" W51°14'13" |
| <i>S. saevissima</i> | E1712 Rio Claro, SP | H29 | S22°23'47" W47°32'51" |
| <i>S. saevissima</i> | E1713 Buritizeiro, MG | H35 | S17°25'20" W44°56'54" |
| <i>S. saevissima</i> | E1714 Buritizeiro, MG | H35 | S17°25'20" W44°56'54" |
| <i>S. saevissima</i> | E1738 Rio de Janeiro, RJ | H60 | S22°58'51" W43°16'75" |
| <i>S. saevissima</i> | E1740 Rio de Janeiro, RJ | H60 | S22°58'51" W43°16'75" |
| <i>S. saevissima</i> | E1742 São Paulo, SP | H7 | S23°32'53" W46°38'11" |
| <i>S. saevissima</i> | E1743 Ubatuba, SP | H7 | S23°30'21" W45°07'55" |
| <i>S. saevissima</i> | E1746 Ubatuba, SP | H44 | S23°30'21" W45°07'55" |
| <i>S. saevissima</i> | E1747 Ubatuba, SP | H45 | S23°30'21" W45°07'55" |
| <i>S. saevissima</i> | E1750 Ubatuba, SP | H47 | S23°30'21" W45°07'55" |
| <i>S. saevissima</i> | E1751 Ubatuba, SP | H48 | S23°30'21" W45°07'55" |
| <i>S. saevissima</i> | E1753 Ubatuba, SP | H49 | S23°30'21" W45°07'55" |
| <i>S. saevissima</i> | E1769 Três Lagoas, MS | H52 | S20°47'37" W51°37'59" |
| <i>S. saevissima</i> | E1791 São Cristóvão do Sul, SC | H57 | S27°15'32" W50°26'50" |
| <i>S. saevissima</i> | E1792 São Cristóvão do Sul, SC | H57 | S27°15'32" W50°26'50" |
| <i>S. saevissima</i> | E1738 Rio de Janeiro, RJ | H60 | S22°58'51" W43°16'75" |
| <i>S. saevissima</i> | E1740 Rio de Janeiro, RJ | H60 | S22°58'51" W43°16'75" |
| <i>S. saevissima</i> | E1716 Porto Nacional, TO | H65 | S10°42'37" W48°24'34" |
| <i>S. saevissima</i> | E1717 Taquaruçu, TO | H66 | S10°19'07" W48°09'22" |
| <i>S. saevissima</i> | E1718 Palmas, TO | H81 | S10°19'07" W48°09'22" |
| <i>S. saevissima</i> | E1719 Palmas, TO | H67 | S10°19'07" W48°09'22" |
| <i>S. saevissima</i> | E1819 Manaus, AM | H71 | S03°06'25" W60°01'34" |
| <i>S. saevissima</i> | E1821 Manaus, AM | H72 | S03°06'25" W60°01'34" |
| <i>S. saevissima</i> | E1824 Manaus, AM | H74 | S03°06'25" W60°01'34" |
| <i>S. saevissima</i> | E1829 Manaus, AM | H76 | S03°06'25" W60°01'34" |

Continuação.

| Espécie da Formiga | Localidade Código de coleta | Haplótipo DNA mt | Coordenadas |
|---------------------------|--|-------------------------|--------------------------|
| <i>S. saevissima</i> | E1831 Manaus, AM | H74 | S03°06'25" W60°01'34" |
| <i>S. saevissima</i> | E1833 Pindoretama, CE | H80 | S04°01'33" W38°18'24" |
| <i>S. saevissima</i> | E1718 Palmas, TO | H81 | S10°12'46" W48°21'37" |
| <i>S. saevissima</i> | E1785 Lages, SC | H82 | S27°48'57" W50°22'17" |
| <i>S. saevissima</i> | E1828 Manaus, AM | H71 | S03°06'25" W60°01'34" |
| <i>S. saevissima</i> | E1795 Recife, PE | H83 | S08°07'44" W34°54'13" |

Tabela 2: Espécies de formigas e respectivos códigos de acesso no GenBank utilizadas como grupos externos e internos na análise filogenética utilizando o DNA mitocondrial da formiga e localidade de ocorrência do haplótipo. A coluna haplótipo mtDNA indica os números adotados nas análises realizadas.

| Espécie | Código de acesso no GenBank | Haplótipo mtDNA | Localidade |
|-----------------------------|------------------------------------|------------------------|------------------------------|
| <i>Monomorium pharaonis</i> | DQ023095 | H26 | - |
| <i>S. geminata</i> | AY254489 | H27 | EUA |
| <i>S. invicta</i> | AY950708 | H89 | Rio Negro: Brasil |
| <i>S. invicta</i> | AY950734 | H91 | Céu Azul: Brasil |
| <i>S. invicta</i> | AY950768 | H93 | Corumbá: Brasil |
| <i>S. invicta</i> | AY950747 | H92 | Rinco dos Cabrais: Brasil |
| <i>S. invicta</i> | EU352607 | H95 | Mississippi: EUA |
| <i>S. invicta</i> | DQ831672 | H95 | China |
| <i>S. invicta</i> | AY950750 | H98 | Corrientes: Argentina |
| <i>S. invicta</i> | EU373819 | H97 | Louisiana: EUA |
| <i>S. invicta</i> | EU352608 | H100 | Mississippi: EUA |
| <i>S. invicta</i> | AY950765 | H10 | Comodoro: Brasil |
| <i>S. megergates</i> | AY950773 | H20 | Curitiba: Brasil |
| <i>S. pusillignis</i> | AY950775 | H25 | Corumbá: Brasil |
| <i>S. saevissima</i> | FJ467529 | H103 | Nordeste: Brasil |
| <i>S. saevissima</i> | AY950715 | H86 | Pará: Brasil |
| <i>S. saevissima</i> | FJ467557 | H88 | Nordeste: Brasil |
| <i>S. saevissima</i> | FJ467537 | H87 | Norte: Brasil |
| <i>S. saevissima</i> | AY950711 | H90 | Rio Negro: Brasil |
| <i>S. saevissima</i> | FJ467520 | H101 | Sudeste: Brasil |
| <i>S. saevissima</i> | AY950783 | H38 | Água Clara: Brasil |
| <i>S. saevissima</i> | FJ467540 | H94 | Norte: Brasil |
| <i>S. saevissima</i> | FJ467547 | H99 | Nordeste: Brasil |
| <i>S. saevissima</i> | FJ467527 | H102 | Nordeste: Brasil |
| <i>S. saevissima</i> | AY950783 | H38 | Água Clara: Brasil |
| <i>S. saevissima</i> | FJ467520 | H82 | Sudeste: Brasil |
| <i>Solenopsis</i> sp. | AY950784 | H22 | Santa Fé: Argentina |

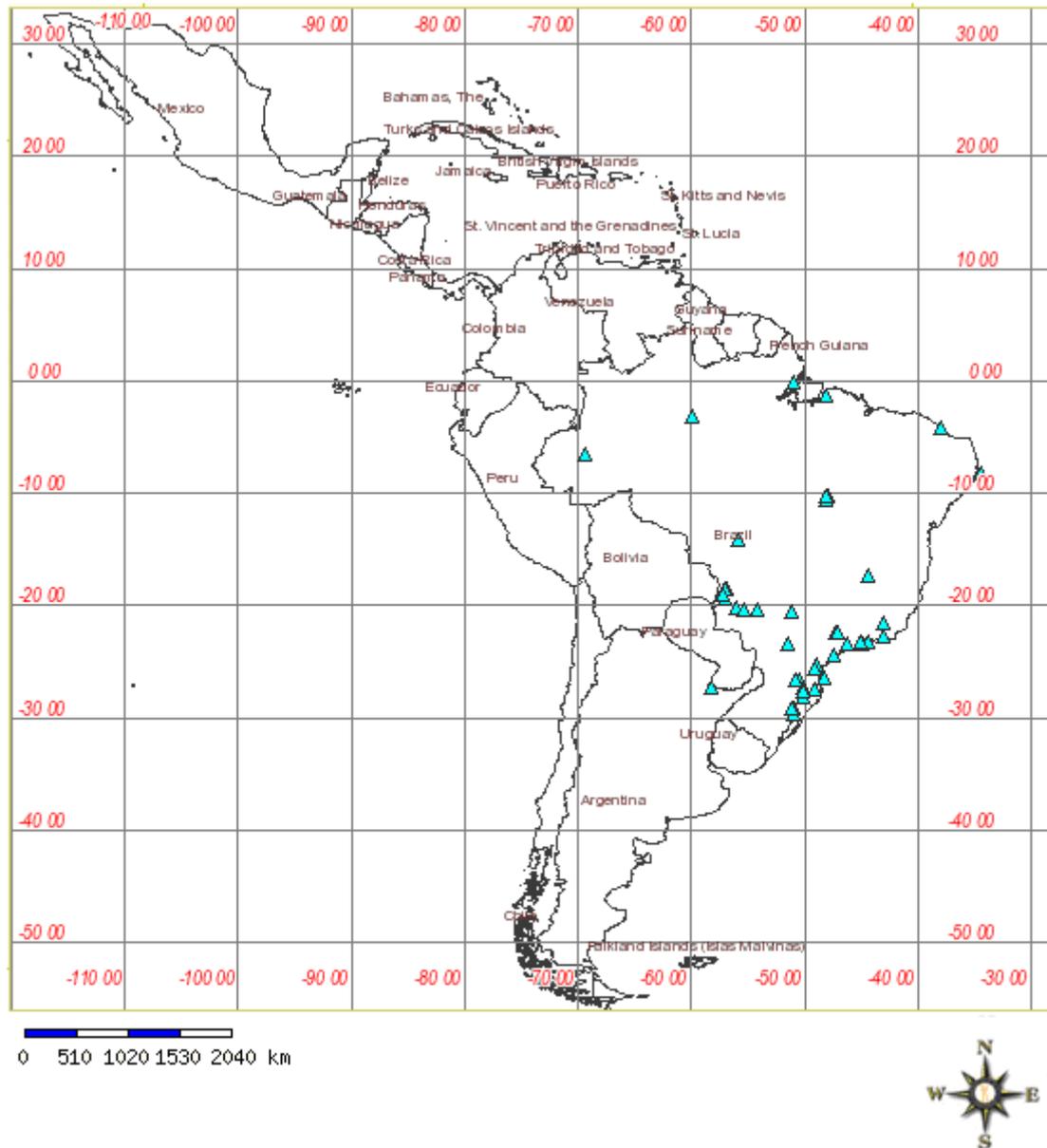


Figura 1: Localidades de coleta das populações estudadas. A Tabela 1 detalha os locais. Mapa: speciesMapper, 2009.

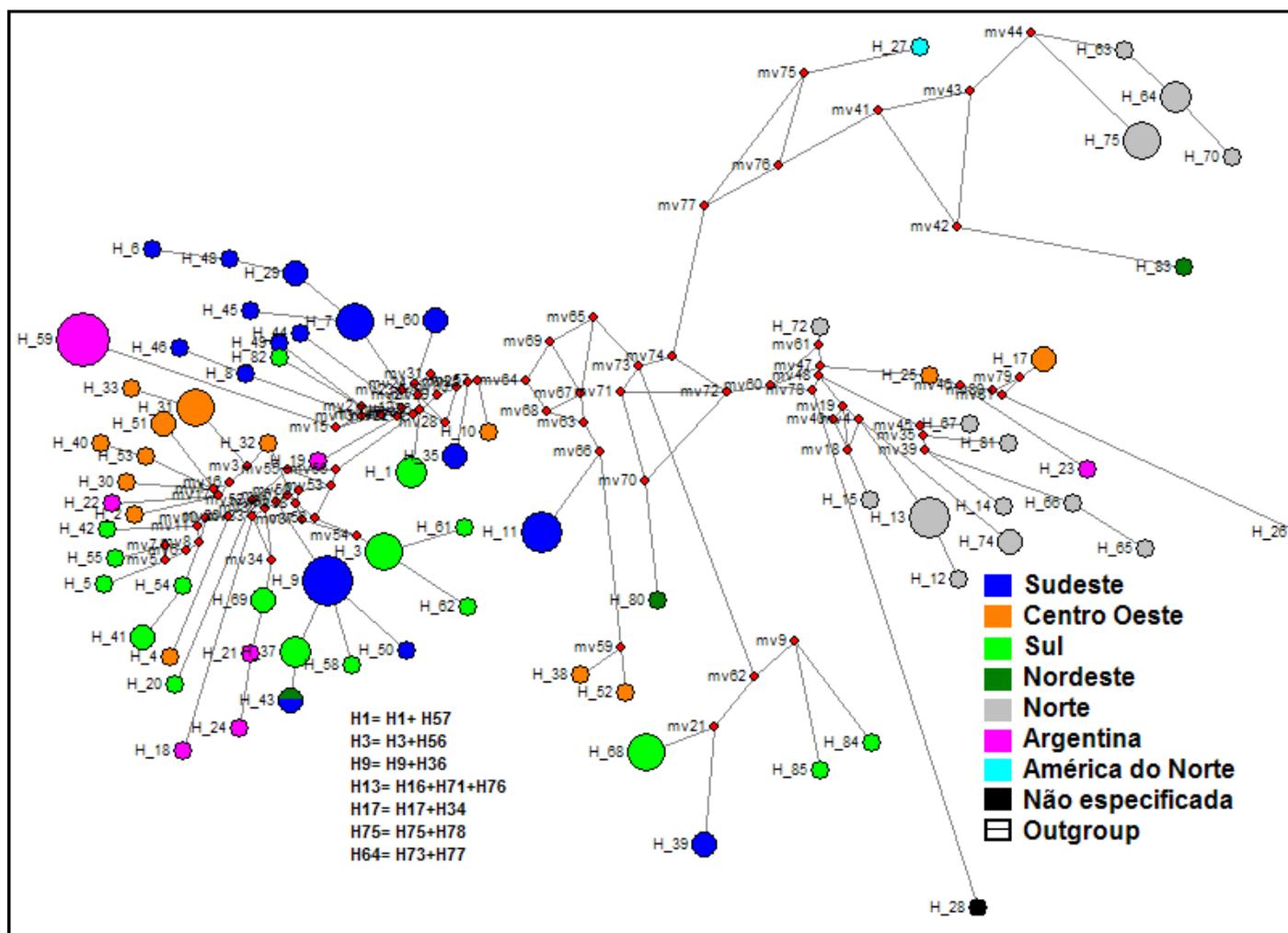


Figura 2: Rede de haplótipo gerada para os haplótipos de DNA mitocondrial existentes nas populações analisadas. Os pontos vermelhos indicam ancestrais hipotéticos.

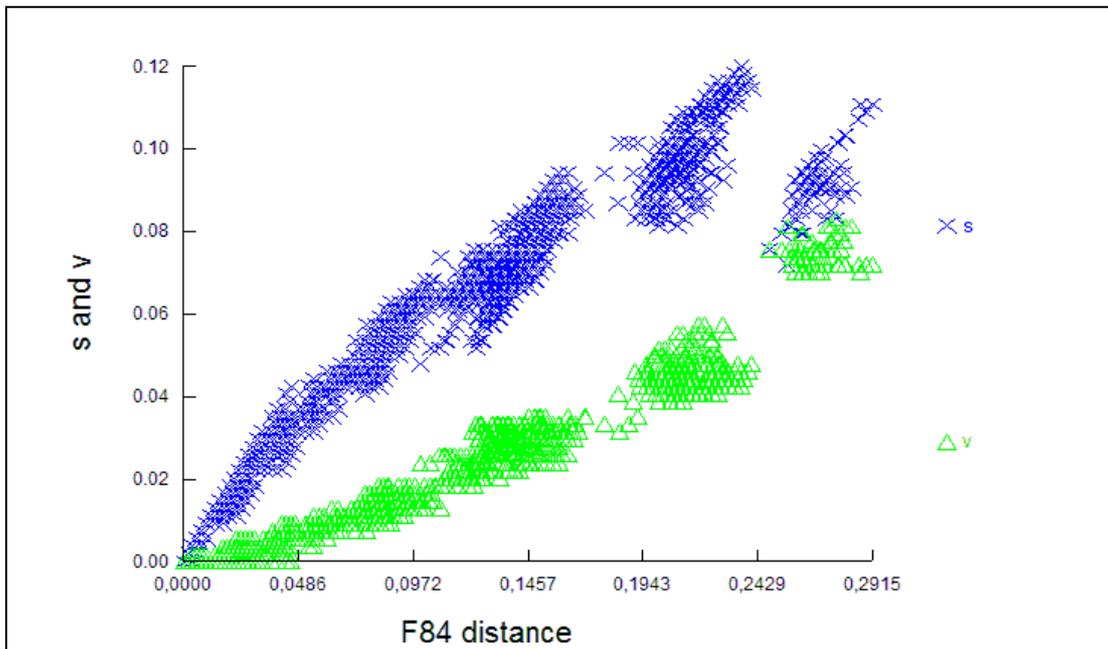


Figura 3: Análise do sinal filogenético. Frequência das transições (s) e transversões (v) em função da divergência nucleotídica da COI.

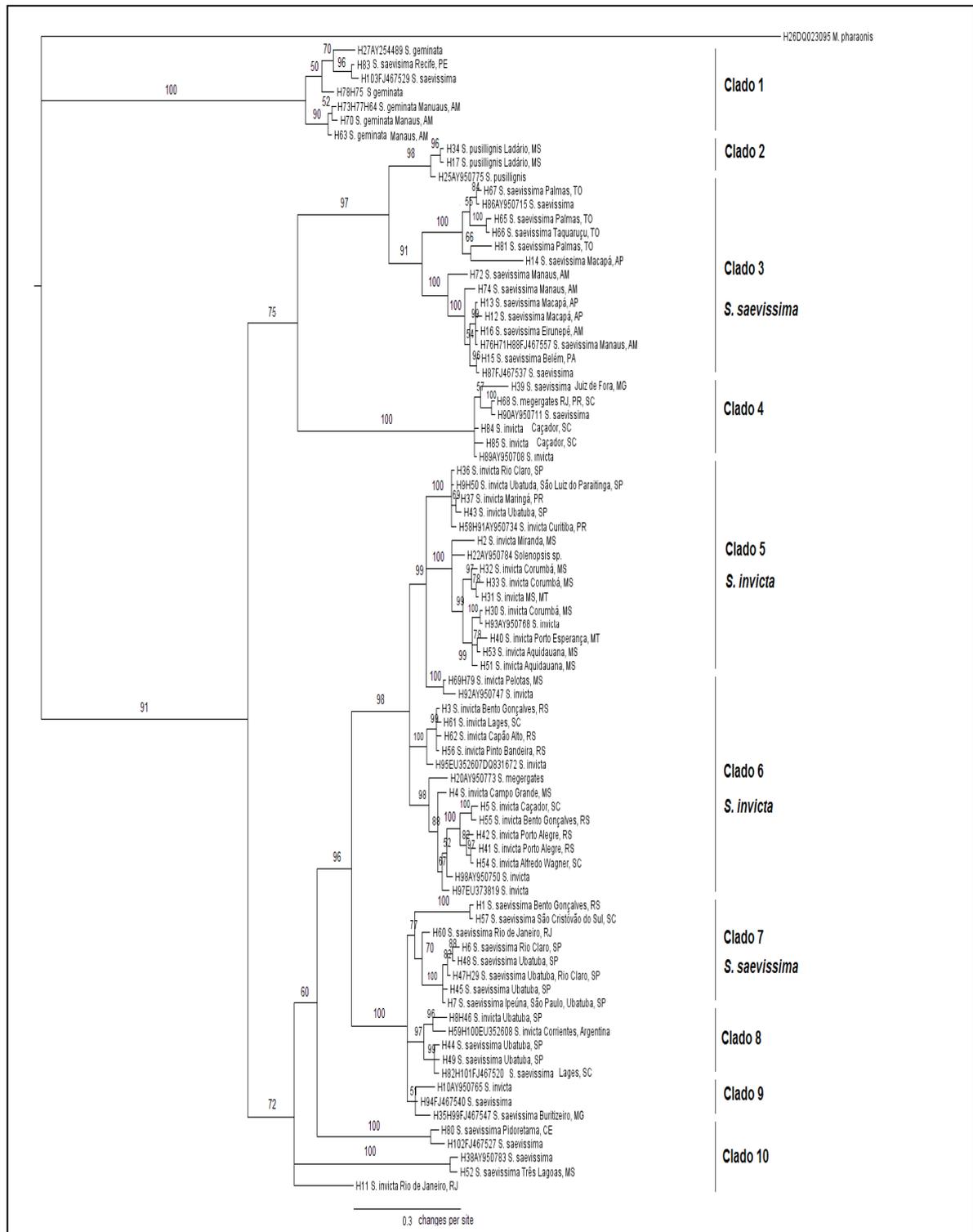


Figura 4: Árvore de inferência Bayesiana reconstruída a partir do gene COI de populações de lava-pés provenientes de diversas regiões do Brasil e parte da Argentina. Valores de probabilidade posterior estão ilustrados acima dos ramos. A árvore foi enraizada com representante de *Monomorium pharaonis*.

ARTIGO 2

PRESENÇA E DISTRIBUIÇÃO DO ENDOSSIMBIONTE *Wolbachia* EM POPULAÇÕES DE *Solenopsis* spp. (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) DO BRASIL E ARGENTINA E SUA HISTÓRIA EVOLUTIVA

Resumo

Wolbachia são bactérias intracelulares que comumente infectam artrópodes, com grande ocorrência registrada anteriormente em formigas do gênero *Solenopsis*. No presente trabalho, foi realizado estudo da presença e distribuição desses endossimbiontes em populações de *Solenopsis* spp. no Brasil, fazendo uso do gene *wsp*. Também foram realizadas análises filogenéticas para inferir a história evolutiva dessas bactérias nas populações de lava-pés do país. Foi encontrada uma grande diversidade de *Wolbachia* no gênero *Solenopsis*, com 51% das colônias analisadas apresentando infecção e a maior incidência em populações do sul do Brasil. Por outro lado, foi pequena a variabilidade encontrada entre as diferentes cepas de *Wolbachia* dentro dos supergrupos A e B, onde no máximo seis nucleotídeos diferiram, podendo ser evidenciado pelas politomias apresentadas na topologia. Os resultados também sugerem que transmissões horizontais podem estar ocorrendo a partir do parasita social *S. daguerrei*.

Introdução

As formigas do gênero *Solenopsis* são distribuídas mundialmente, porém, pouco se conhece sobre elas no Brasil, que é uma região de grande diversidade do gênero.

Nativas da América do Sul, formigas do gênero *Solenopsis* (*S. invicta* e *S. richteri*) foram introduzidas acidentalmente nos Estados Unidos no início do século passado e são consideradas como principais inimigas do povo americano, causando danos à diversidade local pelo desalojamento das espécies nativas, na agricultura e na saúde pública (WOJCIK et al., 2001). Atualmente, são gastos milhões de dólares anuais na tentativa de controle e mesmo assim, elas continuam a se expandir para novas áreas. Da mesma forma, infestações por *S. invicta* são relatadas em diversos países, como Porto Rico, Nova Zelândia e Austrália (MORRISON et al., 2004).

O potencial de expansão de *Solenopsis invicta* está relacionado com a variação de temperatura e níveis de precipitação, sendo que variações bruscas entre esses fatores limitam o sucesso da expansão (MORRISON et al., 2004). O baixo número de inimigos naturais em regiões invadidas pela formiga pode ser a causa da abundância de indivíduos, uma vez que em

sua região nativa este cenário é inversamente observado. Devido à rápida expansão e a interação com diversos táxons, muitas espécies de formigas podem ter adquirido diversas formas de parasitóides, entre eles endossimbiontes como a bactéria *Wolbachia* (DEDEINE et al., 2005).

As bactérias do gênero *Wolbachia* (Classe Alphaproteobacteria, Ordem Rickettsiales) são intracelulares, herdadas através do citoplasma, e são encontradas em grande número nos tecidos reprodutivos de uma ampla variedade de artrópodes. A frequência da endobactéria, analisada em 63 espécies de artrópodes, foi encontrada em 76% deles (JEYAPRAKASH e HOY, 2000) e extrapolações dessas estimativas sugerem que 10^6 espécies de insetos podem estar infectadas por *Wolbachia*, fazendo dessa bactéria um dos principais parasitas dos insetos (SHOEMAKER et al., 2003; HILGENBOECKER et al., 2008).

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). Elas podem atuar nos insetos provocando mudanças reprodutivas no hospedeiro, aumentando a taxa relativa de transmissão de linhagens infectadas (O'NEILL et al., 1992; BANDI et al., 1998; STOUTHAMER et al., 1999). Sua ocorrência em populações naturais é um fator importante em termos de controle, existindo grande interesse na possível utilização dessa endobactéria como agente de controle biológico (AESCHILIMANN, 1990; BEARD et al., 1993; STOUTHAMER, 1993; GIRIN, 1995).

As alterações reprodutivas que *Wolbachia* pode causar em seus hospedeiros incluem a incompatibilidade citoplasmática, indução de partenogênese e feminilidade de machos genéticos (WERREN, 1997). Em insetos sociais, contudo, é desconhecido se a *Wolbachia* possui influência na reprodução (WENSELEERS et al., 1998; CHAPUISAT e KELLER, 1999; KELLER et al., 2001).

Utilizando um gene do ciclo celular da endobactéria (*ftsZ*), Werren et al. (1995) analisaram a evolução e filogenia de *Wolbachia* nos artrópodes e propuseram a divisão em duas linhagens (A e B). Mais tarde, Zhou et al. (1998) utilizaram o gene *wsp*, que codifica uma proteína de membrana da endobactéria, e confirmaram com a divisão em dois grupos, mas sugeriram que dentro de cada grupo existem vários clados que não tinham sido observados nas análises anteriores. Indicaram a existência de oito grupos em potencial dentro do grupo A e quatro dentro do grupo B. Análises posteriores da presença de *Wolbachia* realizadas em nematóides revelaram dois clados adicionais (C e D) (BANDI et al., 1998). Esses clados são chamados desde então de “supergrupos” (LO et al., 2007). Recentemente,

outros supergrupos foram propostos, incluindo o supergrupo E em Collembola (VANDERKERCKHOVE et al., 1999; CZARNETZKI et al., 2004), F em artrópodes e nematóides (CASIRAGHI et al., 2005), G em aranhas (ROWLEY et al., 2004) e H em cupins (BORDENSTEIN et al., 2005).

A transmissão de *Wolbachia* pode ocorrer verticalmente, quando a fêmea transmite para sua prole através do citoplasma do ovo (WERREN, 1997; STOUTHAMER et al., 1999). Porém, várias linhas independentes de estudos apontam que a *Wolbachia* pode ser transmitida horizontalmente, tanto dentro quanto entre espécies hospedeiras (O'NEILL et al. 1992; VAVRE et al. 1999; AHRENS e SHOEMAKER 2005; DEDEINE et al. 2005).

Diversos estudos já foram realizados examinando a distribuição e prevalência de infecções por *Wolbachia* em populações nativas da espécie *S. invicta* e de outras do gênero, assim como os efeitos da *Wolbachia* na variação do DNA mitocondrial dessas espécies (SHOEMAKER et al., 2000; SHOEMAKER et al., 2003a, b; AHRENS e SHOEMAKER et al., 2005; DEDEINE et al., 2005; SOUZA et al., 2009).

Análises realizadas em populações de várias espécies do gênero *Solenopsis* nos locais onde foram introduzidas e de locais de origens indicaram dois tipos de linhagens de *Wolbachia* (A e B), além de alta taxa de variação na frequência da infecção entre regiões diferentes (SHOEMAKER et al., 2000). Acrescenta-se forte associação entre a variante de *Wolbachia* e a linhagem de DNA mitocondrial do hospedeiro, fato também exposto em Shoemaker et al. (2003a, b).

Ahrens e Shoemaker (2005) sugeriram que a história evolutiva de infecções por *Wolbachia* em *S. invicta* parece ser mais complexa e envolver múltiplas invasões ou eventos de transmissão horizontal da bactéria nessa espécie. Os autores ainda sugerem que infecções por *Wolbachia* podem ter sido perdidas secundariamente em diferentes linhagens, e ainda, que os efeitos de *Wolbachia* no genoma mitocondrial do hospedeiro parecem ser menos severos do que anteriormente previsto.

Enquanto alguns parasitas têm seu sucesso dentro do corpo do hospedeiro, outros se beneficiam do super-organismo que é o ninho de formigas e têm sucesso como parasitas sociais. Originalmente descrita como *Labachena daguerrei*, *Solenopsis daguerrei* é uma formiga completamente dependente do parasitismo social, que perdeu a casta de operárias no curso evolutivo, sendo que seus hospedeiros são limitados a espécies de *Solenopsis* do grupo *saevissima* (*S. richteri*, *S. invicta*, *S. saevissima*, *S. quinquecupis* e *S. macdonaghi*) (TSCHINKEL, 2006). As rainhas do parasita de alguma maneira atraem as operárias do ninho parasitado para que elas cuidem, preferencialmente, de sua cria e negligenciam a rainha do

ninho parasitado, enquanto a parasita produz ovos, a cria da colônia se transforma em um grande número de progênie da parasita que irá se desenvolver em indivíduos sexuais (TSCHINKEL, 2006).

Taxas de parasitismo são baixas (CALCATERRA et al., 1999) e as populações do parasita são pequenas e localizadas. Um grau máximo de efeito seria o colapso da colônia infectada e a morte, mas tipicamente o efeito não é extremo (TSCHINKEL, 2006).

A íntima relação entre as operárias do ninho infectado e a parasita social, como a trofalaxia e carregamento de ovos, pode promover oportunidades suficientes para que ocorra a transferência horizontal de microorganismos do hospedeiro para o parasita social e, possivelmente, do parasita social para o hospedeiro, como por exemplo, a *Wolbachia*.

Os objetivos do presente trabalho foram investigar a presença e distribuição da endobactéria *Wolbachia* em populações de *Solenopsis* (*S. invicta*, *S. saevissima*, *S. megergates*, *S. geminata* e *S. pusillignis*) no Brasil, utilizando a porção hipervariável do gene *wsp*.

Material e métodos

Coletas de espécimes, identificação e preservação do material

Foram analisados exemplares de 114 colônias de diversas espécies de *Solenopsis* coletadas em várias regiões do país, seguindo transectos Norte-Sul e Leste-Oeste (Tabela 1 e Figura 1).

Operárias de diversos tamanhos foram coletadas diretamente dos ninhos e mantidas em álcool 80% sob congelamento para evitar a degradação do DNA.

A identificação do material foi realizada segundo a proposta de Paul D. N. Herbert, em utilizar dados do DNA mitocondrial, mais especificamente, da citocromo oxidase I (COI), para identificação de espécies (HEBERT et al., 2003a; HEBERT et al., 2003b; RATNASINGHAM e HEBERT, 2007). Através do sequenciamento de parte da COI, foram gerados fragmentos das populações analisadas e com o uso do aplicativo Blast do banco gênico NCBI (National Center for Biotechnology Information) foram comparadas às sequências depositadas. A identificação se deu quando houve grande similaridade das sequências comparadas com valores de Score altos e E-values com valores 0 ou muito próximo com as depositadas no banco gênico.

Extração de DNA

A extração de DNA foi total, utilizando o método não fenólico. Foram utilizadas cinco operárias inteiras (pool) e as amostras foram homogeneizadas em uma solução tamponada para lise celular, composta de: 100mM Tris, pH 9,1, 100 mM NaCl, 200 mM sacarose, 50 mM de EDTA, 0,5% SDS. O homogeneizado foi incubado a 55 °C, por 3 horas; resíduos de proteínas foram precipitados com NaCl 5M. A precipitação do DNA foi realizada com álcool isopropílico 100%, seguida de lavagem em álcool etílico a 70%. A ressuspensão do DNA foi feita em tampão TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8).

Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

DNA mitocondrial

Fragmentos de cerca de 920 pares de bases do DNA mitocondrial foram amplificados através de reações de polimerização em cadeia de DNA. Esse fragmento corresponde a parte do gene da citocromo oxidase I (cerca de 780 pb), RNA transportador de leucina (de 70 pb) e parte da citocromo oxidase II (ao redor de 60 pb). As reações foram realizadas com volume final de 25 µL, contendo de 250 a 500 ng de DNA “template”, 0,2-0,4 µM (5-10 pmol) de cada “primer”, utilizando-se um “kit” comercial que contém os reagentes necessários (Taq polimerase, tampão, MgCl₂, dNTP’s, etc) da Amersham Pharmacia Biotech, denominado Ready-to-go.

A programação do ciclador térmico foi a proposta por Ross e Shoemaker (1997): 1 minuto a 94 °C (denaturação inicial) e 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, anelamento por 1 minuto a 48 °C e extensão a 68 °C por 2 minutos, seguidos por uma extensão final de 72 °C por 5 minutos.

Os primers utilizados foram: C1-J-2195 (COI-RLR) (5’ – TTGATTTTTTGGTCATCCAGAAGT - 3’) e DDS-COII-4 (5’ – TAAGATGGTTAATGAAGAGTAG - 3’) (ROSS e SHOEMAKER, 1997; AHRENS et al.; 2005). Nos casos em que a combinação de primers não amplificou o fragmento desejado, foi utilizado um segundo primer no lugar do DDS-COII-4, designado JerryGarcia-CI (5’ – GGGGAATTAGAATTTTGAAGAG - 3’) (SHOEMAKER et al., 2006), que produz

fragmentos de cerca de 780 pb que incluem apenas a porção do gene citocromo oxidase I (COI).

Isolamento de gene da *Wolbachia*

Dois pares de primers foram utilizados para verificar a presença de *Wolbachia* nos indivíduos. O primeiro foi o controle: EF1 α -532F (5' - AGGCAAATGTCTTATTGAAG - 3') e EF1 α -610R (5' - GCGGGTGCGAAGGTAACAAC - 3') (SHOEMAKER et al., 2000) que amplifica um fragmento de 400 pb do gene nuclear EF1 α (fator de alongação). O outro par é aquele que amplifica um fragmento variável de um gene que codifica uma proteína de superfície da bactéria, com cerca de 600 pb, denominado *wsp*81F (5' - TGGTCCATTAAGTGATGAAGAAAC - 3') e *wsp*691R (5' - AAAAATTAAACGCTACTCCA - 3') (BRAIG et al., 1998; ZHOU et al., 1998).

As reações foram feitas em tubos apropriados com volume final de 25 μ L, contendo de 250 a 500 ng de DNA "template", 0,2-0,4 μ M (5-10 pmol) de cada primer, utilizando-se um kit comercial que contém os reagentes necessários (Taq polimerase, tampão, MgCl₂, dNTP's, etc) da Amersham Pharmacia Biotech, denominado Ready-to-go. O programa do ciclorador térmico seguido foi o mesmo de Braig et al. (1998) e Zhou et al. (1998). A confirmação da amplificação foi visualizada em gel de agarose 2%.

O controle positivo foi feito de acordo com Shoemaker et al. (2000) onde todas as reações de PCR para o gene *wsp* da endobactéria foi incluído um segundo par de primers (EF1 α -532F e EF1 α -610R), que constitui um controle positivo.

A presença do fragmento do primer controle (EF1 α) e a ausência do fragmento específico da *Wolbachia* (*wsp*) refletem uma ausência da bactéria e não uma baixa qualidade (em rendimento de produto de PCR), uma alta concentração de DNA genômico ou até mesmo um erro associado com a configuração do programa de PCR. Porém, na ausência do fragmento do primer controle (EF1 α) e do fragmento do gene *wsp*, não se pode concluir pela ausência da endobactéria. Neste caso, onde o fragmento EF1 α falha, o DNA genômico deve ser diluído e o protocolo de PCR repetido.

Quando confirmada a presença do gene *wsp*, com a visualização das duas bandas em gel de agarose 1,5% (do gene *wsp* com cerca de 600 pb e do fator de alongação ou controle positivo com 400 pb) foi realizada uma amplificação por PCR contendo apenas o par de primers *wsp*81F e *wsp*691R e posterior sequenciamento do fragmento alvo.

Clonagem

A presença de ruído no eletroferograma da amostra do gene *wsp* sequenciado exigiu a clonagem gênica da amostra, o que levou a separação das cepas presentes.

Para tal procedimento foi utilizado um kit comercial para clonagem de produtos de PCR da Fermentas Life Sciences denominado CloneJET PCR Cloning Kit. Foram utilizados os produtos diretos da PCR, que eram então inseridos no vetor de clonagem seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante do kit.

Sequenciamento de DNA

As reações de sequenciamento foram feitas com química BigDye Terminator (Applied Biosystem Inc). Ambas as cadeias de DNA de cada amostra foram sequenciadas separadamente, usando os respectivos primers, ou seja, o DNA mitocondrial para as formigas e o gene *wsp* das endobactérias. Para tal, foi utilizado um sequenciador automático modelo ABI Prism 377 (Applied Biosystem Inc.). As reações de sequenciamento foram feitas a partir de protocolo padrão e tiveram um volume final de 10 µL. Os produtos de extensão de DNA foram precipitados com isopropanol 75%.

Forma de análises dos dados

As sequências obtidas do gene *wsp* da endobactéria, foram inicialmente analisadas separadamente com o uso do programa BioEdit e alinhadas por meio do aplicativo Clustal (HIGGINS et al., 1992) e editadas manualmente. Um segundo alinhamento mais refinado foi realizado com o uso do programa MUSCLE3.6 (EDGAR, 2004) sendo que este alinhamento foi utilizado posteriormente para a construção da rede de variante de cepas e para a análise do sinal filogenético.

Como o gene *wsp* é codificante, foram reconstruídas as proteínas das sequências geradas e estas foram alinhadas no programa BioEdit. Comparando o alinhamento das proteínas, as sequências nucleotídicas foram alinhadas manualmente. Este alinhamento foi utilizado nas análises filogenéticas posteriores.

Foram excluídas da análise as sequências denominadas H10, H17, H28 e H38, pois estas geraram proteínas que não eram semelhantes aquelas das outras sequências, podendo se tratar de erros no sequenciamento.

A construção da rede de variantes de cepas de *Wolbachia* foi realizada com o uso dos programas DnaSP4.90 (ROZAS et al., 2003) e Network4.5 (fluxus-engineering.com) utilizando o parâmetro Median Joining (BANDELT et al., 1999).

Após alinhamento, o conjunto de dados do gene *wsp* foi submetido à análise do sinal filogenético no programa DAMBE (XIA e XIE, 2001).

Após todas as sequências estarem devidamente alinhadas com um conjunto de sequências provenientes do banco gênico (Tabela 2), foram excluídas algumas bases do final do fragmento correspondentes a uma região com alinhamento insatisfatório, ficando uma matriz com cerca de 480 pares de bases.

A reconstrução da filogenia a partir de máxima parcimônia foi realizada com o uso do programa PAUP, versão 4.0 (SWOFFORD, 2003). Os dados foram tratados com peso 1 para gap e 3 para substituições. Para gerar os índices de bootstrap foram utilizadas 1000 réplicas.

A reconstrução da filogenia a partir da análise Bayesiana foi realizada com o programa MrBayes (HUELSENBECK, 2001). Foi utilizado o modelo GTR com uma proporção de sítios invariáveis e os restantes retirados de uma distribuição gama, a cadeia de Markov foi rodada por 1.000.000 de gerações e amostradas a cada 100 gerações. Para sumarização dos valores paramétricos e das árvores geradas foram descartadas 10% das árvores e os valores de probabilidade posterior foram calculados com o restante das árvores.

Na ausência de um grupo externo apropriado para enraizar a árvore (ver LO et al., 2002), pode-se posicionar a raiz assumindo que a taxa de evolução foi aproximadamente uniforme sobre todos os ramos. Partindo deste pressuposto coloca-se a raiz no ponto mediano do maior caminho entre duas unidades taxonômicas, nomeado enraizamento do tipo “midpoint”.

Resultados

Das 114 colônias de *Solenopsis* (59 de *S. invicta*, 40 de *S. saevissima*, 9 de *S. geminata*, 4 de *S. megergates*, 2 de *S. pusillignis*), provenientes das regiões Sul, Sudeste, Norte, Nordeste e Centro Oeste, 58 delas (51%) estavam infectadas pelo endossimbionte, sendo que dessas, 13% possuíam múltiplas infecções.

A Tabela 1 indica as espécies identificadas através da COI, as localidades de coleta, se a infecção por *Wolbachia* foi encontrada, além de qual variante encontrada do endossimbionte.

Distribuição de *Wolbachia* no gênero *Solenopsis*

Quatro das cinco espécies de *Solenopsis* analisadas (*S. invicta*, *S. saevissima*, *S. geminata* e *S. megergates*) apresentaram infecção por *Wolbachia*, sendo que a maior ocorrência se deu na espécie *S. invicta*. Das espécies infectadas, 33 eram de *S. invicta*, 19 de *S. saevissima*, 4 de *S. megergates* e 2 de *S. geminata*.

As Tabelas 2 e 3 ilustram a diversidade de variantes (A ou B) de *Wolbachia* em cada espécie de formiga analisada e por regiões de ocorrência da formiga, respectivamente. Na Tabela 2, evidencia-se a maior ocorrência da variante B de *Wolbachia* na espécie *S. invicta*, com 27 cepas. As demais espécies apresentaram baixo número de variantes. Na Tabela 3, observa-se a maior ocorrência de infecção em populações provenientes das regiões sul (com 21 cepas) e sudeste (16 cepas) do Brasil, com maior ocorrência da variante B, no sul com 15 cepas e no sudeste com 10 cepas. As demais regiões apresentaram menor taxa de infecção. A região norte apresentou baixa infecção, nas regiões centro-oeste e nordeste não foi encontrado nenhum ninho infectado pelo endossimbionte *Wolbachia*.

A ausência de infecção ou baixa taxa de infecção pode ser devido à reduzida amostragem de algumas espécies, tanto quanto de algumas regiões do Brasil.

Rede de variantes de cepas de *Wolbachia*

Foram geradas no total 91 sequências do gene *wsp*, que em conjunto com algumas variantes do banco gênico (ilustradas na Tabela 4), foram submetidas à análise do programa NETWORK4.5 para gerar uma rede de variantes das cepas (ilustrada na Figura 2). Essa rede indicou que existem 46 variantes do gene *wsp* nas populações analisadas, sendo que dessas, 35 são provenientes das populações coletadas. Algumas variantes se repetiram em abundância nas amostras, sendo as variantes denominadas H1 e H4 (supergrupo A), H23/H26 e H43 (supergrupo B).

Análise do sinal filogenético

Após alinhamento, os conjuntos de dados foram submetidos à análise do sinal filogenético no programa DAMBE (XIA e XIE, 2001) e os resultados obtidos estão ilustrados no Figura 3 e indica que o conjunto de dados analisados nesse trabalho apresentam um bom sinal filogenético, com as transições aparecendo com maior frequência que as transversões.

Filogenia de *Wolbachia* das populações analisadas

O resultado das análises filogenéticas das cepas de *Wolbachia* a partir do gene *wsp*, está resumido na Figura 4. Dos 483 caracteres utilizados na análise de máxima parcimônia, 267 eram constantes e 182 eram caracteres informativos (parsimony-informative). Foram encontradas 3 árvores igualmente parcimoniosas.

Ambas as análises, máxima parcimônia e inferência Bayesiana, foram virtualmente congruentes e apenas a árvore da análise Bayesiana está ilustrada com probabilidade posterior e bootstrap correspondente a MP. A forma de enraizamento foi do tipo “midpoint”. Ela foi baseada em sequências do *wsp* de *S. invicta*, *S. saevissima*, *S. geminata* e *S. megergates* (ilustradas na Tabela 1) assim como sequências de cepas de *Wolbachia* de outros hospedeiros do gênero *Solenopsis*, provenientes do banco gênico (Tabela 2).

Foram encontradas seis variantes do supergrupo A de *Wolbachia* de *S. invicta* e três de *S. saevissima*. Agrupando-se no ramo de *Wolbachia* obtidas de *S. invicta* estão duas variantes provenientes do banco gênico dessa espécie de formiga (AF243435 e AY446997), formando um cluster mais derivado e politômico. Basal a este clado, encontra-se o agrupamento de *Wolbachia* proveniente de *S. saevissima*, que forma uma politomia com variantes provenientes do banco gênico dessa espécie (EU251431 e EU251432).

Dentro do supergrupo B, identificou-se quinze variantes de *S. invicta*, três de *S. saevissima* e duas de *S. megergates*. Três variantes (denominadas H23 e H26; e H31) com ocorrência respectivamente em *S. invicta* e *S. saevissima* também foram encontradas. Dentro do supergrupo B houve uma separação em dois grupos. Um deles apresenta uma politomia na qual se encontra a amostra de *Wolbachia* do banco gênico de *S. daguerrei* (AY878102) juntamente com amostras de variantes de *Wolbachia* de *S. invicta* e *S. megergates*. O segundo grupo apresenta-se como irmão do primeiro, com amostra proveniente de *Wolbachia* de *S. invicta* (H22) como mais basal, seguida de um ramo com amostra do banco gênico de *S. invicta* (AF217722) como basal, seguido de uma variante de *S. megergates* e outra de *S. invicta*. Um agrupamento derivado em relação aos anteriores, com *S. daguerrei* (AY878101, AY878107) seguido de um agrupamento de variantes de *S. invicta*, formando uma politomia com *S. invicta* e *S. daguerrei* provenientes do banco gênico (AF243436, DQ842483 e AY878106).

Esses dados indicam claramente uma grande diversidade de *Wolbachia* no gênero *Solenopsis* distribuído no Brasil. A maior incidência de infecção por *Wolbachia* foi encontrada em populações do sul do Brasil. Outro dado importante foi a pequena variabilidade encontrada entre as diferentes cepas de *Wolbachia* dentro dos grupos A e B,

onde no máximo 6 nucleotídeos diferiram, podendo ser evidenciada pelas politomias apresentadas na topologia.

Levando-se em consideração a topologia encontrada e as politomias das variantes de *Wolbachia* encontradas com as amostras provenientes do banco gênico do parasita social *S. daguerrei*, pode-se inferir que a transmissão horizontal a partir de parasitas possa estar ocorrendo nessas populações.

Discussão

A análise das sequências de *Wolbachia* indica uma ocorrência maior do supergrupo B, resultado divergente daqueles obtidos por Ahrens e Shoemaker (2005) para *S. invicta*, onde relataram um equilíbrio entre a ocorrência dos dois supergrupos em algumas populações da América do Sul. Em relação à distribuição destes supergrupos na rede gerada e na filogenia reconstruída, nota-se uma completa separação dos supergrupos, corroborando com as informações de Zhou et al. (1998) e Ahrens e Shoemaker (2005), pois as variantes denominadas H1 até H16 (ilustradas na Figura 2) correspondem a cepas do grupo A e as denominadas H17 até H46 correspondem a cepas do grupo B.

Observa-se também que o número de variantes é muito grande e não corresponde com o número de espécies de *Solenopsis* estudadas (*S. invicta*, *S. saevissima*, *S. megergates*; *S. geminata* e *S. pusillignis*), o que pode suportar um forte indício de transmissão horizontal dentro do gênero *Solenopsis*, como sugerido por Ahrens e Shoemaker (2005). Da mesma forma, Souza et al. (2009) relataram transmissão horizontal em populações brasileiras de *Solenopsis saevissima*.

Zhou et al. (1998) descreveram que a divergência na sequência de diferentes espécies de insetos encontrada dentro do supergrupo A foi de 14% e no supergrupo B de 22%. No caso de *Solenopsis* encontrou-se uma baixa divergência, para ambos supergrupos, podendo ser observado através das politomias observadas na árvore consenso. A similaridade poderia ser devido à herança da *Wolbachia* de um ancestral comum às populações estudadas, ou poderia ter surgido por transmissão horizontal através de um parasita ou parasitóide especializados nesse grupo de formigas, como sugerido por Van Borm (2003).

Um forte indício da ocorrência de transmissão horizontal nos representantes analisados é a presença de cepas de *Wolbachia* de um parasita social, *S. daguerrei*, se agrupando na árvore reconstruída com representantes do supergrupo A e B, formando um ramo politômico no caso do supergrupo B. Se um parasita desempenha papel na transferência de *Wolbachia*,

espera-se que ambos, parasita social e hospedeiro, possuam cepas de *Wolbachia* idênticas ou quase idênticas (DEDEINE et al., 2005). A transferência horizontal é a mais provável explicação para esta congruência, pois a interação íntima do parasita social e seu hospedeiro (como trofalaxia, carregar ovos, HÖLLDOBLER e WILSON, 1990) pode vislumbrar oportunidades suficientes para *Wolbachia* ser transferida do hospedeiro para o parasita social e possivelmente do parasita social para o hospedeiro.

As espécies *S. invicta* e *S. saevissima* predominaram nas coletas realizadas, porém a primeira apresentou maior número de colônias infectadas por *Wolbachia*, e as cepas encontradas possuem maior diversidade. Além disso, na espécie *S. invicta* foi encontrado o maior número de colônias com múltiplas infecções, sendo que a maioria dos ninhos eram provenientes da região sul do país.

Apesar das amostras terem sido coletadas em locais com grande interferência humana, poder-se-ia esperar resultados semelhantes para infecção de *Wolbachia* nos locais onde *Solenopsis* foi introduzida; porém, não foi detectada infecção por *Wolbachia* (SHOEMAKER et al., 2000). Isso pode ser devido a um efeito fundador ou por efeitos da pressão seletiva que poderia eliminar a *Wolbachia* em populações que sofrem fragmentações ou pressões ambientais. Esse não é o caso das populações do Brasil, onde se observou altas taxas de colônias infectadas, provavelmente com *Wolbachia* provenientes de transmissão horizontal, através da interação do hospedeiro com outras populações de artrópodes, pois essas formigas são predadoras generalistas e possuem parasitas sociais.

O ambiente intracelular ocupado pela *Wolbachia* pode ter pequena influência na sua fisiologia. Braig et al. (1994) obtiveram sucesso em transmitir artificialmente *Wolbachia* entre hospedeiros distantes. *Wolbachia* pode ser apta a estabilizar seu próprio microambiente dentro do vacúolo que tipicamente a envolve (ZHOU et al., 1998).

Por outro lado, a proteína de superfície de membrana (*wsp*) demonstra surpreendente analogia com proteínas antigênicas de patógenos, com uma variação heterogênea caracterizada por regiões hipervariáveis (HVRs) flanqueadas por regiões altamente conservadas (CRs) (BRAIG et al., 1998). Essa proteína pode sofrer forte seleção positiva afetando sua região hipervariável, além de evidências que sugerem existir recombinação nesta sequência (JIGGINS, 2002; REUTER e KELLER, 2003; WERREN e BARTOS, 2001). Esses fatores podem alterar a função dessa proteína em interações hospedeiro-*Wolbachia* (BALDO et al., 2005).

Especificamente na interação patógeno e hospedeiro, pode-se inferir que, independente da espécie infectada, pode haver alterações na proteína de superfície de membrana codificada

pelo gene *wsp*, causadas por alterações nucleotídicas mínimas. Essas alterações podem ser viáveis e transmitidas para a próxima geração do hospedeiro. A distribuição dessa nova variante em muitos táxons pode ser decorrente da interação do hospedeiro “fonte” com organismos do nicho a qual ele pertence.

Deve ser enfatizado que existe recombinação entre variantes de *Wolbachia* (WERREN e BARTOS, 2001; REUTER e KELLER, 2003). Portanto, a similaridade entre sequências pode derivar de recombinações homólogas entre linhagens de *Wolbachia*, fato que demonstra a possível troca de material genético entre simbiotes intracelulares.

Segundo Bordenstein et al. (2004) bacteriófagos influenciam a evolução do genoma de *Wolbachia*, lançando a hipótese da “arena intracelular”, onde material genético movimenta-se horizontalmente entre bactérias que coinfectam o mesmo ambiente intracelular.

O fato da infecção não ser uniforme, corrobora os resultados de Ahrens e Shoemaker (2005), onde 51% dos ninhos analisados apresentaram infecção pelo endossimbionte, podendo ter ocorrido perda do simbiote durante a história evolutiva dessas espécies de *Solenopsis*, ou até mesmo expansão de populações que não estavam infectadas, explicada pelo efeito fundador.

A baixa infecção por *Wolbachia* encontrada em populações de Manaus, AM, evidenciada pelas bandas menos intensas do gene *wsp*, impossibilitando o sequenciamento destas amostras, pode ser explicada por uma dessas hipóteses: i. provável adaptação estratégica para reduzir a carga da colônia; ii. perda da infecção em operárias adultas por fatores não adaptativos, como a regressão ovariana; iii. exposição a condições ambientais estressantes.

Pode-se considerar a terceira hipótese como a mais provável para as populações da região Norte. Primeiro, já foi considerado que a *Wolbachia* pode ser eliminada de operárias devido a exposição a condições mais estressantes do ambiente, como altas temperaturas (WENSELEERS et al., 2002), que pode afetar a densidade de *Wolbachia* em outros insetos (O'NEILL et al., 1997). Segundo, foi encontrada alta taxa de infecção pelo endossimbionte em populações de regiões com temperaturas mais amenas, além de muitos desses ninhos apresentarem múltiplas infecções de *Wolbachia*, evidenciando o sucesso da infecção sobre condições ambientais ditas mais favoráveis ao endossimbionte.

Uma relação positiva também foi verificada entre a ocorrência de *Wolbachia* e a distribuição latitudinal. As populações das Regiões Norte, Centro Oeste e Nordeste do Brasil apresentam pouca ou nenhuma infecção pelo endossimbionte, indicando que sua presença é aparentemente menor em locais onde existe uma longa estação seca ou temperatura média

diária alta. Essa relação já foi observada em besouros da espécie *Chelymorpha alternans* e em formigas do gênero *Solenopsis* (KELLER et al., 2004; AHRENS e SHOEMAKER, 2005). A distribuição de *Wolbachia* em *S. invicta* pode ser influenciada por diferenças nas condições ambientais, com prevalências de *Wolbachia* nas populações de temperaturas amenas (AHRENS e SHOEMAKER, 2005).

Uma provável adaptação estratégica para reduzir a carga da colônia não deve ser o fato que ocorre nas colônias de *Solenopsis*. De acordo com Wenseleers et al. (2002) colônias de *Formica truncorum* com muitos indivíduos infectados possuem uma baixa produtividade sexual *per capita*. Isto sugere que a *Wolbachia* pode possuir efeito deletério sobre a colônia, onde é possível que a bactéria reduza a performance locomotora de operárias, fato que já foi demonstrado no parasitóide *Leptopilina heterotoma* (FLEURY et al., 2000). Em estudo realizado por Souza et al. (2009) a infecção por *Wolbachia* aumentou de 44% para 90%, em um ano de observação, em uma colônia de *Solenopsis saevissima*, evidenciando que o sucesso da infecção nas operárias foi grande e provavelmente não deve ocorrer efeito deletério nesse grupo.

Existe a possibilidade de infecções por *Wolbachia* serem perdidas em operárias adultas devido a fatores não adaptativos, como por exemplo, a perda de infecção como um produto da regressão ovariana (WENSELEERS et al., 2002), o que geralmente ocorre durante a vida de operárias de formigas (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990). Wenseleers et al. (2002) predizem que simbioses herdáveis não possuem interesse em se manterem em adultos estéreis, pois a transmissão para gerações futuras não depende deles. Considerando que o endossimbionte *Wolbachia* ocorre com abundância em outros tecidos (MIN e BENZER 1997; DOBSON et al., 1999; IJICHI et al., 2002), e que dados evidenciem sua presença em todas as castas, estágios de vida, além de cabeça tórax e gaster de *S. invicta* (SHOEMAKER et al., 2000), apenas a regressão ovariana não explica esta perda ou baixa infecção encontrada em *Solenopsis*.

Para garantir se a infecção é realmente baixa nas colônias estudadas, seria ideal a realização de um experimento com PCR quantitativa em tempo real, como descrito em Ijichi et al. (2002). Com esta metodologia poder-se-ia obter a densidade de *Wolbachia* em um determinado indivíduo ou verificar qual região do corpo possui maior abundância.

A maior frequência de algumas variantes de *Wolbachia* nas Regiões Sul e Sudeste podem ser devido à infecção de uma variante em muitas populações locais, ou até mesmo uma variante em várias populações de duas ou mais espécies. As politomias encontradas na filogenia reforçam esta hipótese. A alta frequência de poucas variantes pode ser consequência

também da fundação por populações infectadas e sua expansão nessas regiões. As variantes “satélites” (Figura 2), que estão ligadas às variantes mais frequentes, podem ser resultados de pequenas diferenças na sequência do gene devido a mutações, como descrito por Ahrens e Shoemaker (2005) ou as recombinações a partir da mais frequente.

Todas as populações provenientes de Corrientes, Argentina apresentaram infecção por *Wolbachia*, com apenas três variantes, sendo duas delas pertencentes ao supergrupo B (uma delas foi encontrada na maioria das colônias analisadas, H26) e uma pertencente ao supergrupo A. As variantes do grupo B são muito próximas, fazendo parte de uma politomia ilustrada na filogenia (Figura 4). Esses dados reforçam os resultados encontrados nas populações do sul do Brasil, onde infecções por *Wolbachia* revelaram ter mais sucesso e serem mais abundantes diante das condições ambientais dessa região.

Considerações Finais

A partir das análises realizadas pode-se observar que a alta incidência de *Wolbachia* em formigas, já observada em trabalhos anteriores, também foi encontrada no gênero *Solenopsis* no Brasil e Argentina. Esta alta incidência pode ser devido às condições mais favoráveis de invasão e manutenção da infecção por *Wolbachia* em hospedeiros sociais haplodiplóides quando comparada com hospedeiros solitários (WENSELEERS et al., 1998). Além disso, as ocorrências de múltiplas infecções em alguns ninhos analisados podem influenciar conflitos reprodutivos e juntamente com outras barreiras reprodutivas pode acelerar o processo de especiação (WERREN, 1997).

De uma maneira geral, nossas observações corroboram Ahrens e Shoemaker (2005) sobre a possibilidade de várias introduções de *Wolbachia* em *S. invicta* e a diversificação da bactéria dentro do gênero. Nas espécies analisadas podem ter ocorrido várias transmissões horizontais, seguida de provável efeito fundador e expansão de algumas variantes em algumas regiões.

O fato da presença de *Wolbachia* da espécie parasita, *Solenopsis daguerrei*, se agrupando com aquelas tanto do grupo A como de B, é um indício de sua participação na transmissão horizontal.

Referências

- AESCHILIMANN, J. P. Simultaneous occurrence of thelytoky and bisexuality in Hymenopteran species, and its implications for the biological control of pests. **Entomophaga**. v. 35, p. 3–5. 1990.
- 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.
- AHRENS, M. E.; SHOEMAKER, D. Evolutionary history of *Wolbachia* infections in the fire ant *Solenopsis invicta*. **BMC Evolutionary Biology**. v. 5, p. 35. 2005.
- BALDO, L.; LO, N.; WERREN, J. H. Mosaic nature of the *Wolbachia* surface protein. **Journal of Bacteriology**. v. 187, p. 5406-18. 2005.
- 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.; ANDERSON, T.; GENCHI, C. BLAXTER, M. Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. **Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Science**. v. 265, p. 2407-2413. 1998.
- BEARD, C. B.; O'NEILL, S. L.; TESH, R. B.; RICHARDS, F. F.; AKSOY, S. Modification of Arthropod vector competence via symbiotic bacteria. **Parasitology Today**. v. 9, p. 179–183. 1993.
- BORDENSTEIN, S. R.; WERNEGREEN, J. J. Bacteriophage flux in endosymbionts (*Wolbachia*): infection frequency, lateral transfer, and recombination rates. **Molecular Biology and Evolution**. v. 21, p. 1981-1991. 2004.
- BORDENSTEIN, S.; ROSENGAUS, R. B. Discovery of a novel *Wolbachia* supergroup in isoptera. **Current Microbiology**. v. 51, p. 393-398. 2005.
- BRAIG, H. R.; GUZMAN, H.; TESH, R. B.; O'NEILL, S. L. Replacement of the natural *Wolbachia* symbiont of *Drosophila simulans* with a mosquito counterpart. **Nature**. v. 367, p. 453-455. 1994.
- BRAIG, H. R.; ZHOU, W.; DOBSON, S.; O'NEILL, S. L. Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia*. **The Journal of Bacteriology**. v. 180, p. 2373-2378. 1998.
- CALCATERRA, L. A.; BRIANO, J. A.; WILLIAMS, D. F. Field studies of the parasitic ant *Solenopsis daguerrei* (Hymenoptera: Formicidae) on fire ants in Argentina. **Environmental Entomology**. v. 28, pp. 88-95. 1999.
- CASIRAGHI, M.; BORDENSTEIN, S. R.; BALDO, L.; LO, N.; BENINATI, T.; WERNEGREEN, J. J.; WERREN, J. H.; BANDI, C. Phylogeny of *Wolbachia pipientis* based on *gltA*, *groEL* and *ftsZ* gene sequences: clustering of arthropod and nematode symbionts in the F supergroup, and evidence for further diversity in *Wolbachia* tree. **Microbiology**. v. 151, p. 4015-22. 2005.

- CHAPUISAT, M.; KELLER, L. Testing kin selection with sex allocation data in eusocial Hymenoptera. **Heredity**. v. 82, p. 473-478. 1999.
- CZARNETZKI, A. B.; TEBBE, C. C. Detection and phylogenetic analysis of *Wolbachia* in Collembola. **Environmental Microbiology**. v. 6, p. 35-44. 2004.
- DEDEINE, F.; AHRENS, M.; CALCATERRA, L.; SHOEMAKER, D. D. Social parasitism in fire ants (*Solenopsis* spp.): a potential mechanism for interespecies transfer of *Wolbachia*. **Molecular Ecology**. v.14, p. 1543-1548, 2005.
- DOBSON, S. L., BOURTZIS, K.; BRAIG, H. R.; JONES, B. F.; ZHOU, W.; ROUSSET, F.; O'NEILL, S. L. *Wolbachia* infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 29, p. 153-160. 1999.
- EDGAR, R. C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acid Research**. v. 32, p. 1792-97. 2004.
- FLEURY, F.; VAVRE, F.; RIS, N.; FOUILLET, P.; BOULETREAU, M. Physiological cost induced by the maternally transmitted endosymbiont *Wolbachia* in the *Drosophila* parasitoid *Leptopilina heterotoma*. **Parasitology**. v. 121, p. 493–500. 2000.
- GIRIN, C.; BOULETREAU, M. Microorganism-associated variation in host infestation efficiency in a parasitoid wasp, *Trichogramma boutatachae* (Hymenoptera, Trichogrammatidae). **Experientia**. v. 51, p. 398–401. 1995.
- HEBERT P. D. N; CYWINSKA A; BALL S. L; deWAARD J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences**. v. 270, p. 313–321. 2003a.
- HEBERT P. D. N; RATNASINGHAM S; deWAARD J. R. Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences**, v. 270, p. S596–S599. 2003b.
- HIGGINS, D. G.; BLEASBY, A. J.; FUCHS, R. Clustal V: Improved software for multiple sequence alignment. **Computer Applications in Biosciences**. v. 8, p. 189-191. 1992.
- HILGENBOECKER, K.; HAMMERSTEIN, P.; SCHALATTMANN, P.; TELSCHOW, A.; WERREN, J. H. How many species are infected with *Wolbachia*? A statistical analyses of current data. **FEMS Microbiology Letters**. v. 281, p. 215-220. 2008.
- HÖLLDOBLER, B.; WILSON. E. O. **The ants**. Springer: Berlim. 1990.
- HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. **Bioinformatics**. v. 17, p. 754-755. 2001.
- IJICHI, N.; KONDO, N.; MATSUMOTO, R.; SHIMADA, M.; ISHIKAWA, H.; FUKATSU, T. Internal spatiotemporal population dynamics with three *Wolbachia* strains in the Adzuki bean beetle, *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae). **Applied and Environmental Microbiology**. v. 68, p. 4074-4080. 2002.

- JEYAPRAKASH, A.; HOY, M. A. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: *wsp* sequences found in 76% of sixty-tree arthropods. **Insect Molecular Biology**. v. 9, p. 393-405. 2000.
- JIGGINS, F. M. The rate of recombination in *Wolbachia* bacteria. **Molecular Biology and Evolution**. v. 19, p. 1640-1643. 2002.
- KELLER, L.; LIAUTARD, C.; REUTER, M.; BROWN, W. D.; SUNDSTRÖM, L.; CHAPUISAT, M. Sex ratio and *Wolbachia* infection in the *Formica exsecta*. **Heredity**. v. 87, p. 227-233. 2001.
- KELLER, G. P.; WINDSOR, D. M.; SAUCEDO, J. M.; WERREN, J. H. Reproductive effects and geographical distributions of two *Wolbachia* strains infecting the neotropical beetle, *Chelymorpha alternans* Boh. (Chrysomelidae, Cassidinae). **Molecular Ecology**. v. 13, p. 2405-2420. 2004.
- LO, N.; CASIRAGHI, M.; SALATI, E.; BAZZOCCHI, C.; BANDI, C. How many *Wolbachia* supergroups exist? **Molecular Biology and Evolution**. v.19, p. 341-346. 2002.
- LO, N.; PARASKEVOPOULOS, C.; BOURTZIS, K.; O'NEILL, S. L.; WERREN, J. H.; BORDENSTEIN, S. R.; BANDI, C. Taxonomic status of the intracellular bacterium *Wolbachia pipientis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 57, p. 654-657. 2007.
- MIN, K.T.; BENZER, S. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent causing degeneration and early death. **Proceedings of the National Academy of Science USA**. v. 94, p. 10792-10796. 1997.
- 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.
- O'NEILL, S. L.; GIORDANO, R.; COLBERT, A. M. E.; KARR, T. L.; ROBERTSON, H. M. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. **Proceedings of the National Academy of Science USA**. v. 89, p. 2699-2702. 1992.
- RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. N. BOLD: The Barcode of life system (www.barcodinglife.org). **Molecular Ecology Notes**. p. 1-10. 2007.
- REUTER, M.; KELLER, L. High levels of multiple *Wolbachia* infection and recombination in the ant *Formica exsecta*. **Molecular Biology and Evolution**. v. 20, p. 748-753. 2003.
- ROSS, K. G. e SHOEMAKER, D. D. Nuclear and mitochondrial genetic structure in two social forms of the fire ant *Solenopsis invicta*: insights into transitions to an alternate social organization. **Heredity**. v. 78, p. 590-602. 1997.
- ROWLEY, S. M.; RAVEN, R. J.; MCGRAW, E. A. *Wolbachia pipientis* in Australian spiders. **Current Microbiology**. v. 49, p. 208-214. 2004.

- ROZAS, J.; SÁNCHEZ-DELBARRIO, J. C.; MESSEGUER, X.; ROZAS, R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics**. v. 19, p. 2496-97. 2003.
- SHOEMAKER, D. D.; ROSS, K. G.; KELLER, L.; VARGO, E. L.; WERREN, J. H. *Wolbachia* infections in native and introduced populations of the fire ants (*Solenopsis* spp.). **Insect Molecular Biology**. v. 9, p. 661-673. 2000.
- SHOEMAKER, D. D.; AHRENS, M.; SHEILL, L.; MESCHER, M.; KELLER, L.; ROSS, K. G. Distribution and prevalence of *Wolbachia* infections in native populations of the fire ant *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). **Population Ecology**. v. 32, p. 1329-1336. 2003a.
- SHOEMAKER, D. D.; KELLER, G.; ROSS, K. G. Effects of *Wolbachia* on mtDNA variation in two fire ant species. **Molecular Ecology**. v. 12, p. 1757-1772. 2003b.
- SHOEMAKER, D. D.; AHRENS, M. E.; ROSS, K. G. Molecular phylogeny of the fire ants of the *Solenopsis saevissima* species-group based on mtDNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 38, p. 200-215. 2006.
- SOUZA, R. F. de; RAMALHO, J. D. S.; MORINI, M. S. C.; WOLFF, J. L. C.; ARAÚJO, R. C.; MASCARA, D. Identification and characterization of *Wolbachia* in *Solenopsis saevissima* fire ant (Hymenoptera: Formicidae) in southeastern Brazil. **Current Microbiology**. v. 58, p. 189-194. 2009.
- STOUTHAMER, R. The use of sexual versus asexual wasps in biological control. **Entomophaga**. v. 38, p. 3-6. 1993.
- 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.
- SWOFFORD, D. L. **Phylogenetic analyses using parsimony, version 4.0b10**. Smithsonian Institution, Washington DC. 2003.
- TRAGER, J. C. A revision of the fire ants, *Solenopsis geminata* group (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae). **Journal of the New York Entomological Society**. v. 99, p. 141-198. 1991.
- TSUTSUI, N.D.; KAUPPINEN, S.N.; OYAFUSO, A.F.; GROSBURG, R.K. The distribution and evolutionary history of *Wolbachia* infection in native and introduced populations of the invasive argentine ant *Linepithema humile*. **Molecular Ecology**. v.12, p. 3057-3068. 2003.
- 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.
- VANDEKERCKHOVE, T. T.; WATTEYNE, S.; WILLEMS, A.; SWINGS, J. G.; MERTENS J.; GILLIS, M. Phylogenetic analysis of the 16S rDNA of the cytoplasmic bacterium *Wolbachia* from the novel host *Folsomia candida* (Hexapoda, Collembola) and its

- implications for wolbachial taxonomy. **FEMS Microbiology Letters**. v. 180, p. 279-286. 1999.
- VAVRE, F.; FLEURY, F.; LEPETIT, D.; FOUILLET, P.; BOULETREAU. Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations. **Molecular Biology and Evolution**. v.16, p. 1711-1723, 1999.
- WENSELEERS, T.; ITO, F.; VAN BORM, S.; HUYBRECHTS, R.; VOLCKAERT, F. BOLLEN, J. Widespread occurrence of the microorganism *Wolbachia* in ants. **Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Science**. v. 265, p. 1447-52. 1998.
- WENSELEERS, T.; SUNDSTRÖM, L.; BILLEN, J. Deleterious *Wolbachia* in the ant *Formica truncorum*. **Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Science**. v. 269, p. 623-629. 2002.
- WERREN, J. H. Biology of *Wolbachia*. **Annual Review of Entomology**. v. 42, p. 537-609. 1997.
- WERREN, J. H.; BARTOS, J. D. Recombination in *Wolbachia*. **Current Biology**. v. 11, p. 431-435. 2001.
- WERREN, J. H.; ZHANG, W.; GUO, L. R. Evolution and phylogeny of *Wolbachia* reproductive parasites of arthropods. **Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Science**. v. 261, p. 55-63. 1995.
- WOJCIK, D. P.; ALLEN, C. R.; BRENNER, R. J.; FORYS, E. L.; JOUVENAZ, D. P.; LUTZ, R. S. Red imported fire ants: impact on biodiversity. **American Entomologist**. v. 47, p. 16-23. 2001.
- XIA, X. e XIE, Z. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. **Journal of Heredity**. v. 92, p. 371-73. 2001.
- 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.

ANEXOS:

Tabela 1: Espécie da formiga, localidade de coleta, coordenadas geográficas e cepa de *Wolbachia*.

| Espécie da Formiga | Localidade Código de coleta | Coordenadas | Cepa de <i>Wolbachia</i> |
|---------------------------|--|--------------------------|-------------------------------------|
| <i>S. geminata</i> | E1820 Manaus, AM | S03°06'25" W60°01'34" | - |
| <i>S. geminata</i> | E1825 Manaus, AM | S03°06'25" W60°01'34" | - |
| <i>S. geminata</i> | E1818 Manaus, AM | S03°06'25" W60°01'34" | H17 |
| <i>S. geminata</i> | E1823 Manaus, AM | S03°06'25" W60°01'34" | - |
| <i>S. geminata</i> | E1830 Manaus, AM | S03°06'25" W60°01'34" | - |
| <i>S. geminata</i> | E1826 Manaus, AM | S03°06'25" W60°01'34" | - |
| <i>S. geminata</i> | E1827 Manaus, AM | S03°06'25" W60°01'34" | - |
| <i>S. geminata</i> | E1832 Manaus, AM | S03°06'25" W60°01'34" | - |
| <i>S. geminata</i> | E1822 Manaus, AM | S03°06'25" W60°01'34" | H26 |
| <i>S. invicta</i> | E1710(2) Rio de Janeiro, RJ | S22°58'51" W43°16'75" | H32 H40 |
| <i>S. invicta</i> | E1628 Campo Grande, MS | S20°27'59" W54°35'33" | - |
| <i>S. invicta</i> | E1648 Caçador, SC | S26°47'06" W50°59'27" | - |
| <i>S. invicta</i> | Colômbia, SP | S20°10'40" W48°41'38" | H45 |
| <i>S. invicta</i> | E1652 Miranda, MS | S20°14'29" W56°22'43" | - |
| <i>S. invicta</i> | E1680 Bento Gonçalves,RS | S29°07'22" W51°20'58" | - |
| <i>S. invicta</i> | E1683 Ubatuba, SP(1) | S23°30'21" W45°07'55" | - |
| <i>S. invicta</i> | E1684 Ubatuba, SP(2) | S23°30'21" W45°07'55" | - |
| <i>S. invicta</i> | E1685 Ubatuba, SP(2)B | S23°30'21" W45°07'55" | - |
| <i>S. invicta</i> | E1686 Picinguaba, SP | S23°19'02" W44°54'04" | H46 |
| <i>S. invicta</i> | E1704 Corumbá, MS | S19°30'31" W57°20'05" | - |
| <i>S. invicta</i> | E1705 Corumbá, MS | S18°45'11" W57°07'09" | - |
| <i>S. invicta</i> | E1706 Corumbá, MS | S18°50'00" W57°18'55" | - |
| <i>S. invicta</i> | E1707 Corumbá, MS | S18°50'00" W57°18'55" | - |
| <i>S. invicta</i> | E1709(1) Rio de Janeiro, RJ | S22°58'51" W43°16'75" | H10 H26 H44 |
| <i>S. invicta</i> | E1720 Paraná | S25°25'46" W49°16'18" | - |

Continuação.

| Espécie da Formiga | Localidade Código de coleta | Coordenadas | Cepa de <i>Wolbachia</i> |
|---------------------------|--|---------------------------|-------------------------------------|
| <i>S. invicta</i> | E1721 Corumbá, MS | S19°00'23" W57°39'10" | - |
| <i>S. invicta</i> | E1722 Corumbá, MS | S19°00'23" W57°39'10" | - |
| <i>S. invicta</i> | E1723 Porto Esperança, MT | S14°09'40" W56°04'38" | - |
| <i>S. invicta</i> | E1724 Porto Esperança, MT | S14°09'40" W56°04'38" | - |
| <i>S. invicta</i> | E1725 Porto Alegre, RS | S29°59'14" W51°09'580" | H1 |
| <i>S. invicta</i> | E1726 Porto Alegre, RS | S29°59'14" W51°09'580" | H1 |
| <i>S. invicta</i> | E1727 Porto Alegre, RS | S29°59'14" W51°09'580" | H1 |
| <i>S. invicta</i> | E1737 Rio Claro, SP | S22°23'34" W47°33'21" | H1 |
| <i>S. invicta</i> | E1739 Rio de Janeiro, RJ | S22°58'51" W43°16'75" | H44 |
| <i>S. invicta</i> | E1741 Rio de Janeiro, RJ | S22°58'51" W43°16'75" | H35 H36 |
| <i>S. invicta</i> | E1744 Ubatuba, SP | S23°30'21" W45°07'55" | - |
| <i>S. invicta</i> | E1748 Ubatuba, SP | S23°30'21" W45°07'55" | - |
| <i>S. invicta</i> | E1749 Ubatuba, SP | S23°30'21" W45°07'55" | H1 |
| <i>S. invicta</i> | E1752 Ubatuba, SP | S23°30'21" W45°07'55" | - |
| <i>S. invicta</i> | E1754 São Luiz do Paraitinga, SP | S23°12'22" W45°20'43" | - |
| <i>S. invicta</i> | E1768 Anastácio, MS | S20°28'46" W55°48'08" | - |
| <i>S. invicta</i> | E1770 Aquidauana, MS | S20°28'42" W55°47'03" | - |
| <i>S. invicta</i> | E1771 Aquidauana, MS | S20°28'42" W55°47'03" | - |
| <i>S. invicta</i> | E1780 Registro, SP | S24°31'46" W47°51'24" | H1 H7 H39 |
| <i>S. invicta</i> | E1781 Registro, SP | S24°31'46" W47°51'24" | H1 H2 H6 |
| <i>S. invicta</i> | E1783 Alfredo Wagner, SC | S27°41'42" W49°19'53" | H1 H22 H27 H29 |
| <i>S. invicta</i> | E1786 Bento Gonçalves, RS | S29°09'48" W51°31'54" | H30 H41 |
| <i>S. invicta</i> | E1788 Pinto Bandeira, RS | S29°07'21" W51°26'56" | H1 H28 |
| <i>S. invicta</i> | E1789 Pinto Bandeira, RS | S29°07'21" W51°26'56" | H1 |
| <i>S. invicta</i> | E1794 Curitiba, PR | S25°25'42" W49°16'25" | H25 H26 H38 |
| <i>S. invicta</i> | E1808 Corrientes, Argentina | S27°18'39" W58°33'44" | H23 |
| <i>S. invicta</i> | E1807 Corrientes, Argentina | S27°18'39" W58°33'44" | H26 |

Continuação.

| Espécie da Formiga | Localidade Código de coleta | Coordenadas | Cepa de <i>Wolbachia</i> |
|---------------------------|--|--------------------------|-------------------------------------|
| <i>S. invicta</i> | E1805 Corrientes, Argentina | S27°18'39" W58°33'44" | H26 |
| <i>S. invicta</i> | E1801 Corrientes, Argentina | S27°18'39" W58°33'44" | H26 |
| <i>S. invicta</i> | E1803 Corrientes, Argentina | S27°18'39" W58°33'44" | H2 |
| <i>S. invicta</i> | E1802 Corrientes, Argentina | S27°18'39" W58°33'44" | H26 |
| <i>S. invicta</i> | E1806 Corrientes, Argentina | S27°18'39" W58°33'44" | H26 |
| <i>S. invicta</i> | E1810 Corrientes, Argentina | S27°18'39" W58°33'44" | H31 |
| <i>S. invicta</i> | E1798 Recife, PE | S08°07'49" W34°54'09" | - |
| <i>S. invicta</i> | E1799 Maringá, PR | S23°25'35" W51°56'46" | - |
| <i>S. invicta</i> | E1800 Maringá, PR | S23°25'35" W51°56'46" | - |
| <i>S. invicta</i> | E1784 Lages, SC | S27°48'57" W50°22'17" | H1 |
| <i>S. invicta</i> | E1787 Pinto Bandeira, RS | S29°07'21" W51°26'56" | H26 H37 H44 |
| <i>S. invicta</i> | E1790 Capão Alto, RS | S28°00'23" W50°32'26" | H1 H9 |
| <i>S. invicta</i> | E1815 Pelotas, RS | S31°46'33" W52°20'33" | H8 |
| <i>S. invicta</i> | E1816 Pelotas, RS | S31°46'33" W52°20'33" | H8 |
| <i>S. invicta</i> | E1646 Caçador, SC | S26°46'32" W51°00'56" | H44 |
| <i>S. invicta</i> | E1645 Caçador, SC | S26°46'32" W51°00'56" | H44 |
| <i>S. megergates</i> | E1782 São Francisco, SC | S26°33'53" W48°43'10" | H44 |
| <i>S. megergates</i> | E1793 Areia Branca, PR | S25°51'45" W19°21'45" | H24 H42 |
| <i>S. megergates</i> | E1644 Caçador, SC | S26°46'32" W51°00'56" | H44 |
| <i>S. megergates</i> | E1643 Caçador, SC | S26°46'32" W51°00'56" | H44 |
| <i>S. pusillignis</i> | E1657 Ladário, MS | S19°01'05" W57°33'04" | - |
| <i>S. pusillignis</i> | E1708 Hotel, Ladário, MS | S19°01'03" W57°34'11" | - |
| <i>S. saevissima</i> | E1608 Eirunepé, AM | S6°38'55" W69°52'32" | - |
| <i>S. saevissima</i> | E1615 Rio Claro, SP | S22°23'34" W47°33'44" | H4 |
| <i>S. saevissima</i> | E1631 Ipeúna, SP | S22°26'11" W47°43'10" | H4 |
| <i>S. saevissima</i> | E1640 Belém, PA | S01°23'28" W48°28'43" | - |

Continuação.

| Espécie da Formiga | Localidade Código de coleta | Coordenadas | Cepa de Wolbachia |
|---------------------------|--|--------------------------|--------------------------|
| <i>S. saevissima</i> | E1650 Juiz de Fora, MG | S21°45'51" W43°20'56" | H26 H43 |
| <i>S. saevissima</i> | E1662 Macapá, AP UFAP | S00°00'23" W51°05'06" | - |
| <i>S. saevissima</i> | E1666 Macapá, AP IEPA | S00°02'19" W51°05'39" | - |
| <i>S. saevissima</i> | E1671 Macapá, AP | S00°02'19" W51°05'39" | - |
| <i>S. saevissima</i> | E1682 Bento Gonçalves,RS | S29°04'31" W51°14'13" | H4 |
| <i>S. saevissima</i> | E1712 Rio Claro, SP | S22°23'47" W47°32'51" | - |
| <i>S. saevissima</i> | E1713 Buritizeiro, MG | S17°25'20" W44°56'54" | H26 |
| <i>S. saevissima</i> | E1714 Buritizeiro, MG | S17°25'20" W44°56'54" | H26 |
| <i>S. saevissima</i> | E1738 Rio de Janeiro, RJ | S22°58'51" W43°16'75" | H26 |
| <i>S. saevissima</i> | E1740 Rio de Janeiro, RJ | S22°58'51" W43°16'75" | H26 |
| <i>S. saevissima</i> | E1742 São Paulo, SP | S23°32'53" W46°38'11" | H4 |
| <i>S. saevissima</i> | E1743 Ubatuba, SP | S23°30'21" W45°07'55" | H4 |
| <i>S. saevissima</i> | E1746 Ubatuba, SP | S23°30'21" W45°07'55" | H26 |
| <i>S. saevissima</i> | E1747 Ubatuba, SP | S23°30'21" W45°07'55" | - |
| <i>S. saevissima</i> | E1750 Ubatuba, SP | S23°30'21" W45°07'55" | - |
| <i>S. saevissima</i> | E1751 Ubatuba, SP | S23°30'21" W45°07'55" | H4 |
| <i>S. saevissima</i> | E1753 Ubatuba, SP | S23°30'21" W45°07'55" | H26 |
| <i>S. saevissima</i> | E1769 Três Lagoas, MS | S20°47'37" W51°37'59" | - |
| <i>S. saevissima</i> | E1791 São Cristóvão do Sul, SC | S27°15'32" W50°26'50" | H3 H5 |
| <i>S. saevissima</i> | E1792 São Cristóvão do Sul, SC | S27°15'32" W50°26'50" | H4 |
| <i>S. saevissima</i> | E1738 Rio de Janeiro, RJ | S22°58'51" W43°16'75" | H26 |
| <i>S. saevissima</i> | E1740 Rio de Janeiro, RJ | S22°58'51" W43°16'75" | H26 |
| <i>S. saevissima</i> | E1716 Porto Nacional, TO | S10°42'37" W48°24'34" | - |
| <i>S. saevissima</i> | E1717 Taquaruçu, TO | S10°19'07" W48°09'22" | - |
| <i>S. saevissima</i> | E1718 Palmas, TO | S10°19'07" W48°09'22" | - |

Continuação.

| Espécie da Formiga | Localidade Código de coleta | Coordenadas | Cepa de <i>Wolbachia</i> |
|---------------------------|--|--------------------------|-------------------------------------|
| <i>S. saevissima</i> | E1719 Palmas, TO | S10°19'07" W48°09'22" | - |
| <i>S. saevissima</i> | E1819 Manaus, AM | S03°06'25" W60°01'34" | - |
| <i>S. saevissima</i> | E1821 Manaus, AM | S03°06'25" W60°01'34" | H26 |
| <i>S. saevissima</i> | E1824 Manaus, AM | S03°06'25" W60°01'34" | - |
| <i>S. saevissima</i> | E1829 Manaus, AM | S03°06'25" W60°01'34" | - |
| <i>S. saevissima</i> | E1831 Manaus, AM | S03°06'25" W60°01'34" | - |
| <i>S. saevissima</i> | E1833 Pindoretama, CE | S04°01'33" W38°18'24" | |
| <i>S. saevissima</i> | E1718 Palmas, TO | S10°12'46" W48°21'37" | - |
| <i>S. saevissima</i> | E1785 Lages, SC | S27°48'57" W50°22'17" | H26 H31 H34 |
| <i>S. saevissima</i> | E1828 Manaus, AM | S03°06'25" W60°01'34" | - |
| <i>S. saevissima</i> | E1795 Recife, PE | S08°07'44" W34°54'13" | - |

Tabela 2: Diversidade de variantes (A ou B) de *Wolbachia* em cada espécie de formiga analisada. A tabela não ilustra a quantidade de vezes que uma determinada cepa ocorre na espécie e sim a variante que ocorre.

| Espécie | Variante A | Variante B | Total |
|-----------------------|--------------------------------|--|--------------|
| <i>S. geminata</i> | - | H17, H26 | 2 |
| <i>S. invicta</i> | H1, H2, H6, H7, H8, H9, H10 | H22, H23, H25, H26, H27, H28, H29, H30, H31, H32, H35, H36, H37, H38, H39, H40, H41, H44, H45, H46 | 27 |
| <i>S. megergates</i> | - | H24, H42, H44 | 3 |
| <i>S. pusillignis</i> | - | - | - |
| <i>S. saevissima</i> | H3, H4, H5 | H26, H31, H34 | 6 |

Tabela 3: Diversidade de variantes (A ou B) de *Wolbachia* por região analisada. Novamente, a tabela não ilustra a quantidade de vezes que uma determinada cepa ocorre na espécie e sim a variante que ocorre.

| Região de ocorrência | Variante A | Variante B | Total |
|-----------------------------|-------------------------|---|--------------|
| Norte | - | H17, H26 | 2 |
| Nordeste | - | - | - |
| Sul | H1, H3, H4, H5, H8, H9 | H22, H24, H25, H26, H27, H28, H29, H30, H31, H34, H37, H38, H41, H42, H44 | 21 |
| Sudeste | H1, H2, H4, H6, H7, H10 | H26, H32, H35, H36, H39, H40, H43, H44, H45, H46 | 16 |
| Centro-Oeste | - | - | - |
| Argentina | H2 | H23, H26, H31 | 4 |

Tabela 4: Gênero e linhagem da endobactéria ou espécie do hospedeiro e respectivos códigos de acesso no GenBank.

| Gênero e linhagem da endobactéria ou espécie do hospedeiro | Código de acesso no GenBank | Haplótipo <i>wsp</i> |
|---|------------------------------------|-----------------------------|
| <i>Wolbachia</i> sp. wInv-B1 | AF217722 | H18 |
| <i>Wolbachia</i> sp. <i>S. invicta</i> | DQ842483 | H33 |
| <i>Wolbachia</i> sp. Sdag-B4 | AY878106 | H26 |
| <i>Wolbachia</i> sp. SinvictaB | AF243436 | H26 |
| <i>Wolbachia</i> sp. SdagB1 | AY878102 | H19 |
| <i>Wolbachia</i> sp. SdagB3 | AY878101 | H20 |
| <i>Wolbachia</i> sp. SdagB2 | AY878107 | H21 |
| <i>Wolbachia</i> sp. SdagA5 | AY878104 | H15 |
| <i>Wolbachia</i> sp. SdagA4 | AY878099 | H16 |
| <i>Wolbachia</i> sp. SdagA3 | AY878105 | H13 |
| <i>Wolbachia</i> sp. SdagA2 | AY878100 | H14 |
| <i>Wolbachia</i> sp. SdaqA1 | AY878103 | H11 |
| <i>Wolbachia</i> sp. <i>S. richteri</i> | AY755414 | H12 |
| <i>Wolbachia</i> sp. WrichterA | AF243437 | H8 |
| <i>Wolbachia</i> sp. wSinvictaA | AF243435 | H1 |
| <i>Wolbachia</i> sp. <i>S. saevissima</i> | EU251432 | H4 |
| <i>Wolbachia</i> sp. SS1A | EU251431 | H4 |

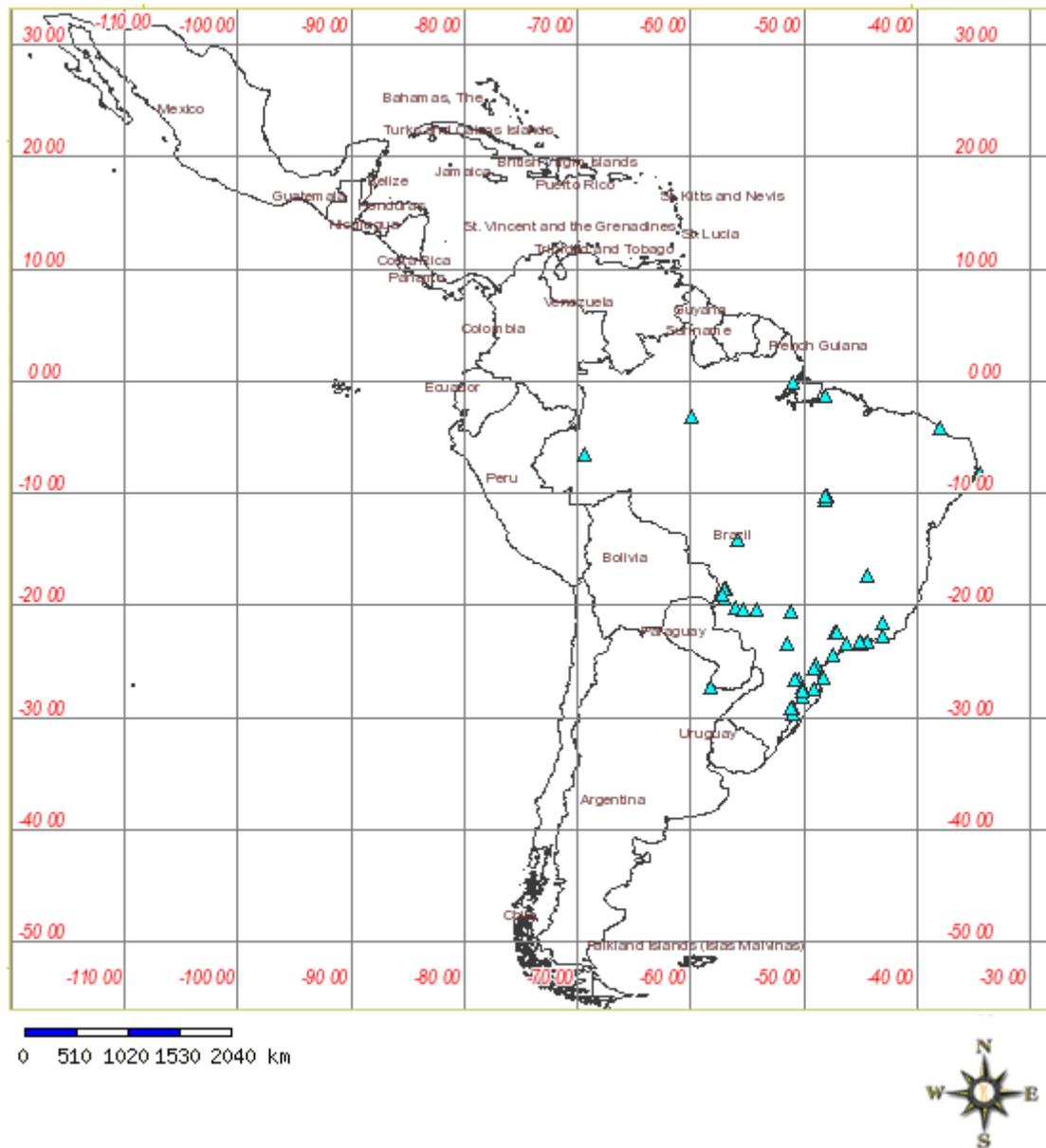


Figura 1: Localidades de coleta das populações estudadas. A Tabela 1 detalha os locais. Mapa: speciesMapper, 2009.

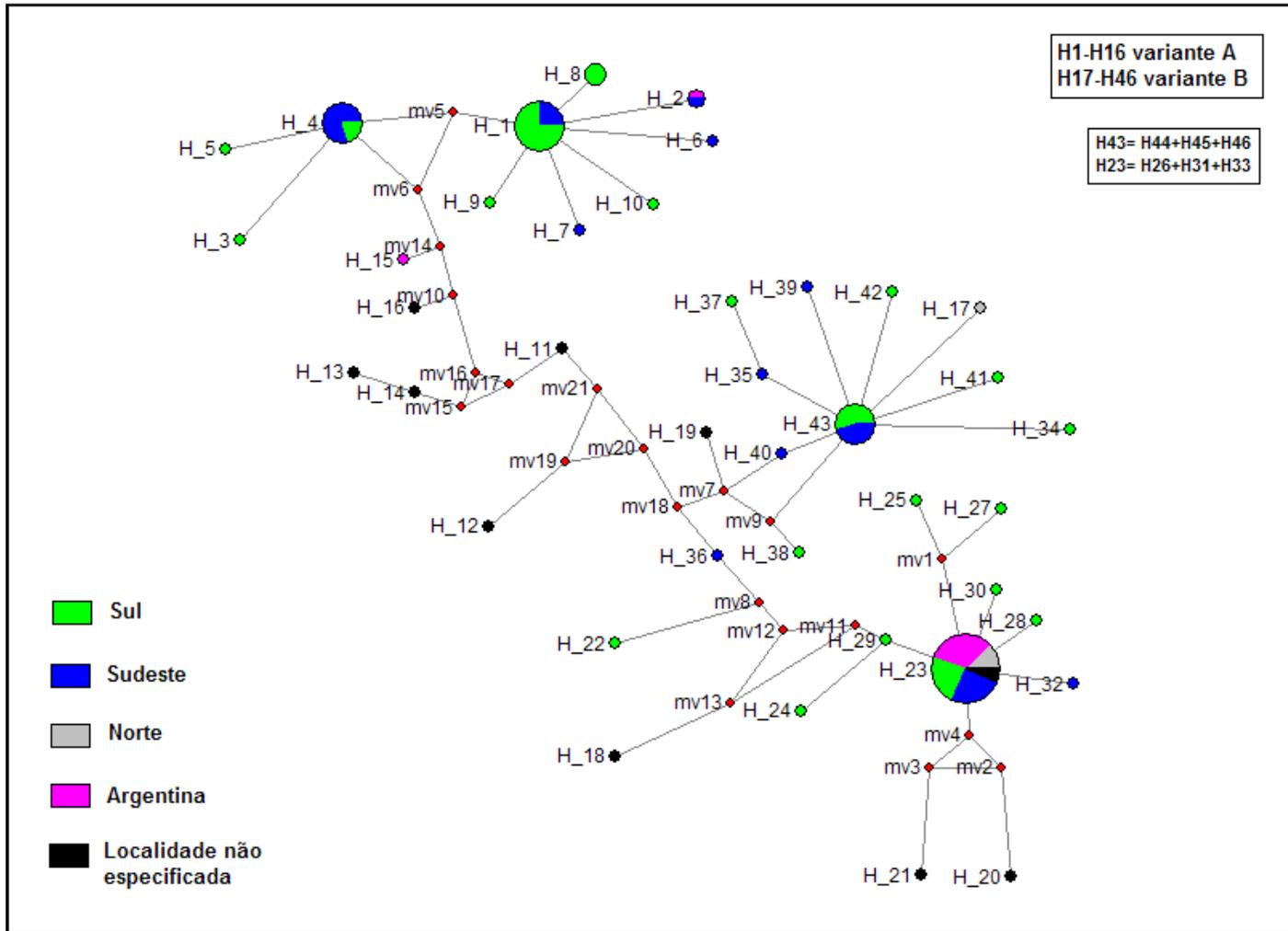


Figura 2: Rede de variantes de cepas do gene *wsp* gerada com o uso do programa NETWORK4.5 (fluxus-engineering.com). De H1 a H16 cepas do supergrupo A, de H17 a H46 cepas do supergrupo B. Os pontos vermelhos indicam ancestrais hipotéticos.

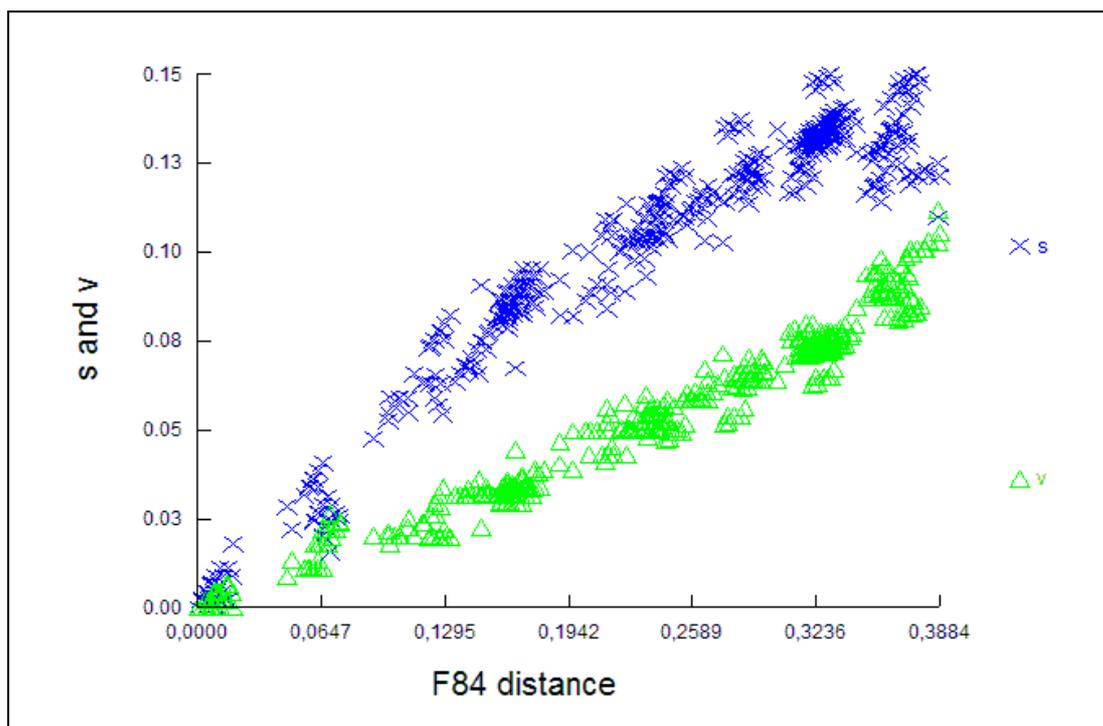


Figura 3: Análise do sinal filogenético das sequências do gene *wsp* do endossimbionte *Wolbachia* das amostras estudadas no presente trabalho. O eixo x indica uma divergência em torno de 39% entre as sequências. Os pontos azuis representam transições e os verdes transversões. O gráfico representa um sinal filogenético satisfatório, onde as transições aparecem com maior frequência que as transversões na maior parte do gráfico. Provavelmente a região onde as transversões e transições se sobrepõem seja devido a uma das 4 (quatro) regiões altamente variáveis (HVR) que ocorrem no gene *wsp* e que não possui um bom sinal filogenético (BALDO et al., 2005), porém o restante do gráfico está regular e portanto com um bom sinal filogenético.

Considerações gerais

O gênero de formigas *Solenopsis* mostrou-se um grupo muito diversificado no Brasil, pois verificou-se desde completa coerência geográfica de populações da mesma espécie, até polifilia para as espécies *S. invicta* e *S. saevissima*, corroborando trabalhos anteriores.

A análise dos resultados indicou também a existência de espécies morfológicas depositadas em bancos de dados mundiais incorretamente identificadas, dado a dificuldade de diferenciação morfológica existente entre as espécies do gênero *Solenopsis* e os agrupamentos divergentes encontrados nesse trabalho.

Existe a possibilidade dos altos níveis de infecção por *Wolbachia* encontrado nas populações analisadas agirem como um catalisador de processos evolutivos de especiação, devido à característica do endossimbionte de causar incompatibilidade citoplasmática entre populações infectadas com cepas divergentes e que ocorram em simpatria.

Altos níveis de infecção por *Wolbachia* foram encontrados principalmente nas populações de *Solenopsis*, que podem estar relacionados a condições mais favoráveis de invasão e manutenção da *Wolbachia* em hospedeiros sociais haplodiplóides devido a interações íntimas que são mantidas dentro da sociedade. Ainda, foi encontrada maior incidência de *Wolbachia* em populações do sul do Brasil e aparente ausência e baixa infecção em populações das regiões norte, nordeste e centro-oeste, o que indica a prevalência de *Wolbachia* em populações de formigas de regiões climáticas mais amenas.

As múltiplas infecções por *Wolbachia* encontradas em algumas colônias podem influenciar conflitos reprodutivos e juntamente com outras barreiras reprodutivas acelerar o processo de especiação. Ainda, os dados sugerem que nas espécies analisadas possam ter ocorrido várias transmissões horizontais, seguida de provável efeito fundador e expansão de variantes em algumas regiões.

Diante dos resultados obtidos, pode-se inferir que processos de coevolução não devem ter ocorrido nas populações analisadas, devido tanto ao agrupamento das cepas de *Wolbachia* encontradas nas populações amostradas com a do parasita social *S. daguerrei*, quanto à ocorrência de cepas de *Wolbachia* iguais em espécies de formigas diferentes.

De uma maneira geral, os resultados apresentados corroboram informações presentes na literatura e adicionam novas informações na literatura especializada sobre a filogenia e distribuição das formigas do gênero *Solenopsis* do Brasil, assim como da presença e distribuição do endossimbionte *Wolbachia* nessas populações e sua história evolutiva.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)