



Conteúdo disponível em: <https://www.ifgoiano.edu.br/periodicos/>

Multi-Science Journal

Website do periódico: <https://www.ifgoiano.edu.br/periodicos/index.php/multiscience>



Artigo original

Caracterização e seleção de regiões ISSR para análise genético-populacional de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae)

Carla Faine Matos-Oliveira¹, Cibelle Santos Dias², Elisa S.L. Santos³, Carlos B.M. Cerqueira-Silva^{1,3*}

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, Bahia, 45700-000.

²Curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, Bahia, 45700-000.

³Departamento de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, Bahia, 45700-000. *Autor de Correspondência (csilva@uesb.edu.br)

INFO ARTIGO

Histórico do artigo
Recebido: 06 janeiro 2017
Aceito: 26 abril 2017

Palavras chaves:

formigas cortadeiras
ISSR
marcadores moleculares
saúva

RESUMO

Com o intuito de gerar subsídios para realização de estudos genéticos em formiga cortadeira (especificamente *Atta sexdens*), caracterizou-se o padrão de amplificação de DNA gerado por iniciadores ISSR. Para tanto, operárias médias de *A. sexdens* tiveram DNA genômico extraído utilizando a cabeça, mesossoma e pernas. Os padrões de amplificação foram analisados em géis de agarose 2%. Dentre os 23 iniciadores ISSR testados 17 geraram produtos de amplificação (sendo 12 destes iniciadores classificados como “tipo ideal” e cinco como “tipo razoável”). O percentual de polimorfismo variou entre 0% (iniciadores TRICAC3'YC, TRITGT3'YC, TRIACA3'RC, TRITGG3'RC, TRICGA3'RC, TRIGCA3'RC) e 100% (iniciador DiCA3'YG). Os resultados atestam que os iniciadores ISSR selecionados apresentam um grau de polimorfismo adequado e, portanto, são adequados para estudos de diversidade genética em formigas cortadeiras, especialmente para *A. sexdens*.

1. Introdução

As regiões ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) constituem-se sequências de 100 a 3.000 pares de bases contidas no genoma, localizadas entre sequências microsatélites que podem ser acessadas a partir de marcadores ISSR (Zietkiewicz et al., 1994). Os ISSR possuem herança de padrão dominante (não diferindo os *loci* em homozigose dos em heterozigose) (Faleiro, 2007) e baseiam-se na técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) com a aplicação sendo realizada a partir de iniciadores que têm de 16 a 25 pares de bases (Zietkiewicz et al., 1994).

Os marcadores ISSR são amplamente utilizados em estudos genéticos, visto que são potencialmente aplicáveis para qualquer espécie, não exigindo sequenciamento prévio (Faleiro, 2007), além do que oferecem vantagens por gerar número significativo de sequências polimórficas (Nagaoka & Ogihara, 1997). Portanto, são destinadas à estudos genéticos de *fingerprinting*, diversidade genética e análise filogenética (Faleiro, 2007). Considerando as vespas, abelhas e formigas (classe Insecta, ordem Hymenoptera) é possível verificar um número bem superior de estudos com estes marcadores em espécies pertencente ao grupo das abelhas (Ceksteryte et al., 2012, Shouhani et al., 2014, Rahimi et al., 2016) e vespas (De Leon et al., 2010, Ardeh, 2013) quando comparado ao grupo

das formigas, em especial as formigas cortadeiras (Reis et al., 2014).

As formigas cortadeiras, *Atta* e *Acromyrmex*, são organismos eussociais cujas características biológicas lhe permitem nidificar tanto em ambientes naturais, como em ambientes modificados pela ação antrópica (Hölldobler & Wilson, 1990, Vasconcelos et al., 2006). *Atta sexdens* (Myrmicinae:Attini) ou “saúva”, como é popularmente conhecida, realiza intensa atividade forrageadora em busca de partes vegetais para o cultivo do fungo simbiote (Hölldobler & Wilson, 1990). Devido ao hábito de cortar folhas *A. sexdens* é considerada uma praga importante na agricultura e silvicultura brasileira (Della Lucia, 1993).

Estudos ecológicos e genéticos contribuem para a compreensão das populações de formigas cortadeiras em diversos ambientes (Cantagalli et al., 2013, Reis et al., 2014). Entretanto, para *A. sexdens* há carência de estudos genético-moleculares. Uma importante etapa na realização de estudos genético-moleculares é a caracterização e a seleção de marcadores adequados (com boa visualização dos produtos de amplificação, reprodutibilidade e presença de polimorfismo). Neste contexto, objetivou-se caracterizar o padrão de amplificação de 23 primers ISSR e selecionar um conjunto de marcadores que potencialize o sucesso de estudos genético-populacionais de *A. sexdens*.

2. Material e métodos

O material biológico utilizado para as extrações de DNA e posterior testes de amplificação, é oriundo de expedição de coleta realizada em quatro ninhos localizados no fragmento de Floresta Estacional Semidecidual ou "mata de cipó" (15°15'S e 040°17'N), em Itapetinga, Bahia. Foram coletadas quatro amostras, sendo cada uma destas compostas por cinco indivíduos (operárias médias 1,5mm), totalizando 20 formigas. As amostras foram armazenadas em eppendorfs contendo álcool 70% para manter a integridade do material biológico até que se procedesse à etapa de extração.

A extração de DNA genômico de cada amostra (mix de cinco formigas) foi realizada pelo método descrito por Sunnucks e Halles (1996), sendo este definido como mais adequado para *A. sexdens* a partir de testes previamente realizados (Matos-Oliveira et al., 2015). As análises qualitativas das extrações foram avaliadas em eletroforese em gel de agarose 1% (durante 90 minutos em uma corrente elétrica de 90 V) e visualizados com tampão *Gel Red* (adotando-se as especificações do fabricante) em sistema de fotodocumentação Kodak, com a incidência de luz ultravioleta. Após extração, as amostras foram armazenadas em ultrafreezer no Laboratório de Genética Molecular Aplicada da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *campus* de Itapetinga.

O padrão de amplificação de 23 iniciadores ISSR foi caracterizado de acordo com o proposto por Santos et al. (2011). As amplificações foram conduzidas em termociclador MJ 96 (Biocycler) em um volume total de 15 µL e 15 ng do DNA extraído, tampão de PCR 1X (20 mM Tris-HCl [pH 8,4] e 50 mM de KCl), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 1 pM de primer e 1U de polimerase de DNA Taq (*Invitrogen*, Carlsbad, Califórnia, EUA). O programa de amplificação adotado para as reações de PCR foi: 94°C durante 5 min, seguido por 34 ciclos (94°C por 50 s, 48°C por 60 s e 72°C por 60 s) e extensão final de 72°C por 5 min. Os produtos de amplificação foram separados em eletroforese em gel de agarose a 2% (m/v) em tampão de corrida TBE 1X e 120 volts por 2 horas. A coloração do gel e a aquisição de imagens foram realizadas como descrito para a quantificação de ácidos nucleicos.

Os iniciadores foram classificados a partir do padrão de amplificação em: (i) Ideal - amplificações em todas as amostras e com fácil visualização, (ii) Razoável - amplificação em partes das amostras e/ou com difícil visualização e (iii) Ausente - ausência de produtos de amplificação visível (Figura 1).

Análises descritivas considerando o total de marcas e o número de marcas monomórficas (presentes em todas as amostras) e polimórficas (ausente em ao menos uma das amostras) também foram realizadas.

3. Resultados e Discussão

Aproximadamente 75% dos 23 iniciadores testados possibilitaram a amplificação de fragmentos úteis para estimativas genéticas, sendo 12 destes classificados como ideais e cinco classificados como razoáveis (Figura 1; Tabela 1).

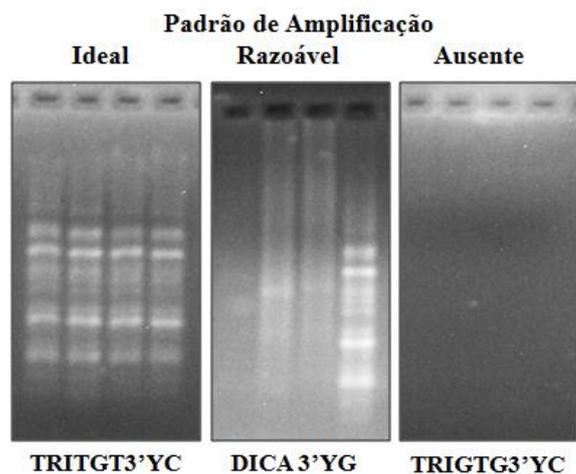


Figura 1 - Exemplo ilustrativo da classificação do padrão de amplificação observado a partir de três dos 23 iniciadores ISSR testados para espécie *Atta sexdens*. O padrão observado com o iniciador TRITGT3'YC também observado para outros 11 iniciadores, sendo por sua vez o padrão observado para DICA3'YG e TRIGTG3'YC observado para outros 4 e 5 iniciadores, respectivamente.

Tabela 1. Descrição do padrão de amplificação observado a partir de 23 iniciadores ISSR em amostras de DNA genômico da formiga cortadeira *Atta sexdens*.

Iniciadores	Nome	Seqüência	Número de marcas			Polimorfismo (%)	Padrão de amplificação
			Total	Monomórficas	Polimórficas		
DIGA3'G	(CA) ₈ G		—	—	—	—	Ausente
DICA3'RG	(CA) ₈ RG		—	—	—	—	Ausente
DICA3'YG	(CA) ₈ YG		7	0	7	100%	Razoável
DIGA3'C	(GA) ₈ C		6	3	3	50%	Ideal
DIGA3'RC	(GA) ₈ RC		4	1	3	75%	Razoável
DIGA3'T	(GA) ₈ T		5	3	2	40%	Ideal
TRICAC3'RC	(CAC) ₅ RC		5	4	1	20%	Ideal
TRICAC3'YC	(CAC) ₅ YC		3	3	0	0%	Ideal
TRICAC5'CY	CY(CAC) ₅		5	1	4	80%	Ideal
TRICAG3'RC	(CAG) ₅ RC		—	—	—	—	Ausente
TRIGTG3'YC	(GTG) ₅ YC		—	—	—	—	Ausente
TRITGT3'YC	(TGT) ₅ YC		5	5	0	0%	Ideal
TRIAAC3'RC	(AAC) ₅ RC		9	1	8	89%	Ideal
TRIAAG3'RC	(AAG) ₅ RC		9	5	4	44%	Ideal

TRIACA3'RC	(ACA) ₅ RC	3	3	0	0%	Ideal
TRIAGA3'RC	(ACG) ₅ RC	5	4	1	20%	Razoável
TRITGG3'RC	(CGC) ₅ RC	4	4	0	0%	Ideal
TRICGA3'RC	(GCA) ₅ RC	3	3	0	0%	Ideal
TRICGC3'RC	(GGA) ₅ RC	5	2	3	60%	Razoável
TRIGAC3'RC	(GAC) ₅ RC	8	2	6	75%	Ideal
TRIGCA3'RC	(GCA) ₅ RC	2	2	0	0%	Razoável
TRIGCC3'RC	(CGC) ₅ RC	—	—	—	—	Ausente
TRIGGA3'RC	(GGA) ₅ RC	—	—	—	—	Ausente
TOTAL		88	46	42		
Média		5,1	2,8	3,8	59%	

Nota: Os iniciadores foram classificados como ideal (excelente visualização), razoável (não permitiram uma boa visualização), ausente (não apresentaram marcas definidas).

4. Conclusão

O sucesso observado neste estudo para as ampliações realizadas com os iniciadores ISSR atesta para a eficiência dos mesmos em subsidiar estimativas genéticas em *Atta sexdens*, devendo ser priorizados para futuros estudos os 12 iniciadores classificados como ideal, visto que apresentam características favoráveis. Os iniciadores selecionados deverão potencializar a obtenção de informações populacionais associadas à diversidade e estrutura genética em populações naturais de *A. sexdens* presentes em diferentes biomas e regiões.

5. Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) e ao programa de pós-graduação em Ciências Ambientais (PPGCA) da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) pela concessão da bolsa de estudo.

6. Referências

- Ardeh, M. J. (2013). The utility of ISSR-primers to make difference among populations of parasitoid, *Eretmocerus mundus* Mercet (Hymenoptera:Aphelinidae). *Journal of Crop Protection*, 2 (3): 263-269.
- Cantagalli, L. B., Mangolin, C. A. & Ruvoletakasukuki, M. C. C. (2013). Population genetics of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) *Acta biológica Colombiana*, 18 (1), 179 - 190. Disponível em: <<http://www.scielo.org.co/pdf/abc/v18n1/v18n1a13.pdf>>. Acesso em junho de 2015.
- Ceksteryte, V., Paplauskiene, V., Tamasauskiene, D., Pasakinskiene, I. & Mazeikiene, I. (2012). Genetic characterization of Lithuanian honeybee lines based on ISSR polymorphism. *Apidologie*, 43, 652.
- Della Lucia, T. M. C. (1993). (Ed.) *As formigas cortadeiras*. Ed. Folha da Mata, Viçosa.
- Faleiro, F. (2007). *Marcadores moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos*. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, 102 p.
- Hölldobler, B. & Wilson, E. O. (1990). *The Ants*. Belknap Press of Harvard University, Cambridge, MA.
- De León, J. H., Neumann, G., Follett, P. A., Hollingsworth, R. G. (2010). Molecular markers discriminate closely related species *Encarsia diaspidicola* and *Encarsia berlesei* (Hymenoptera: Aphelinidae): biocontrol candidate agents for white peach scale in Hawaii. *Journal of Economic Entomology*, 103 (3):908-16.
- Lockenhaus, Austria, 10-13 June 1997 (pp. 188-195). Los Alamitos, CA: IEEE Computer Society.

- Matos-Oliveira C. F., Rocha, S. O., Dias, C., Santos, E. S. L. & Cerqueira-Silva, C.B.M. (2015). Comparison of methods of genomic DNA extraction from leaf-cutter ant *Atta sexdens* (Hymenoptera:Formicidae). Resumo expandido. Semana de Biologia, Ciências: Rompendo fronteiras englobando conhecimento, 24 à 26 de junho fevereiro, 2016. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Jequié.
- Nagaoka, T. & Ogihara, Y. (1997). Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 94, 597-602.
- Nascimento, M. A., Batalha-Filho, H., Waldschmidt, A. M, Tavares, M. G., Campos, L. A. O. & Salomão, T. M. F. (2010). Variation and genetic structure of *Melipona quadrifasciata* Lepelletier (Hymenoptera, Apidae) populations based on ISSR pattern. *Genetics and Molecular Biology*, 33 (2), 394-397. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/gmb/v33n2/2009-185.pdf>. Acesso em março de 2016.
- Rahimi, A., Mirmoayedi, A., Kahrizi, D., Zarei, L. & Jamali, S. (2016). Genetic diversity of Iranian honey bee (*Apis mellifera* meda Skorikow, 1829) populations based on ISSR markers. *Journal Cellular and molecular biology (Noisy-le-grand)*, 30-62 (4),53-8.
- Reis, E. P., Salomão, T. M. F., Campos, L. A. O. & Tavares, M. G. (2014). Genetic diversity and structure of *Atta robusta* (Hymenoptera, Formicidae, Attini), an endangered species endemic to the restinga ecoregion. *Genetics and Molecular Biology*, 37(3), 581-586. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/gmb/v37n3/a15v37n3.pdf>>. Acesso em Março de 2015.
- Santos, L. F., Oliveira, E. J., Silva, A. S., Carvalho, F. M., Costa, J. L. & Padua, J. G. (2011). ISSR markers as a tool for the assessment of genetic diversity in *Passiflora*. *Biochemical Genetics*, 49, 540-554.
- Shouhani, H., Dousti, A., Radjabi, R. & Zarei M. (2014). Application of ISSR to study the genetic diversity of honeybee (*Apis mellifera* L.) populations in some areas of Iran. *Journal of BioScience and Biotechnology*, 3(2), 127-131. Disponível em: [http://www.jbb.uni-plovdiv.bg/documents/27807/352486/jbb_2014-3\(2\)-pages_127-131.pdf](http://www.jbb.uni-plovdiv.bg/documents/27807/352486/jbb_2014-3(2)-pages_127-131.pdf). Acesso em Junho de 2016.
- Sunnucks, P. & Hales, D. F. (1996). Numerous Transposed Sequences of Mitochondrial Cytochrome Oxidase I-II in Aphids of the Genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae). *Molecular Biology and Evolution*, 13, 510-524.
- Vasconcelos, H. L., Vieira-Neto, E., Mundim, F. & Bruna, E. (2006). Roads alter the colonization dynamics of a keystone herbivore in neotropical savannas. *Biotropica*, 38, 661-665.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A. & Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20, 176-183.
- Zhu, X., Yang, J., Wu, Q., Li, J., Wang, S., Guo, Z., et al. (2012). Genetic diversity of different geographical populations of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) from China based on ISSR analysis. *Acta Entomologica Sinica*, 55(8), 981-987. Disponível em: <http://www.insect.org.cn/EN/volumn/current.shtml>. Acesso em junho de 2016.