UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

"O endossimbionte Wolbachia na espécie cactófila Drosophila buzzatii"

Eliete Cristina Delduca

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Ribeirão Preto - SP

2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

"O endossimbionte Wolbachia na espécie cactófila Drosophila buzzatii"

Eliete Cristina Delduca

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maura Helena Manfrin

Ribeirão Preto - SP

2014

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Maura Helena Manfrin, pela oportunidade de trabalhar com um tema tão instigante e pela orientação e prontidão em todas as ocasiões em que necessitei de ajuda.

Às colegas do Laboratório de Genética Evolutiva, pela amizade e disposição em me ensinar a utilizar os equipamentos e materiais e as técnicas laboratoriais e pela paciência em sanar minhas dúvidas sempre que necessário.

À doutoranda Luciana P. B. Machado, por ter conseguido amostras de *Drosophila sp.* infectadas por *Wolbachia*, as quais foram utilizadas como controles positivos para infecção nos testes iniciais e por ter me iniciado nos procedimentos laboratoriais.

À mestranda Jaqueline Reginato Koser, por ter me ensinado extração de DNA de moscas e também ajudou nos primeiros experimentos de amplificação do DNA.

À doutoranda Dora Barrios Leal, por ter me ajudado durante todo o trabalho, com as reações de amplificação, purificação e quantificação do DNA. Muito obrigada pela paciência, por todas as discussões, por ter me orientado durante os diversos procedimentos realizados, por discutir os erros e me encorajar a tentar outros meios, o que tornou essa jornada muito menos árdua.

À doutoranda Natácia Evangelista de Lima, por ter me ensinado sobre precipitação do DNA, outros procedimentos laboratoriais e discussões acerca da amplificação e sequenciamento.

À doutoranda Taís Carmona Lavagnini por toda a ajuda com os programas utilizados nas análises de semelhança entre as linhagens.

Ao Prof. Dr. Victor Hugo Valiati, por compartilhar conhecimentos muito proveitosos e por ceder amostras de *Drosophila melanogaster* e *Drosophila willistoni* infectadas por *Wolbachia*, as quais utilizei nos experimentos iniciais que precedem este trabalho. Ao Dr. Mateus Henrique Santos, pelo auxílio com as localidades das amostras coletadas.

Às Prof^as. Dr^as. Zilá Luz Paulino Simões e Márcia Maria Gentile Bitondi, pela disponibilização de seus equipamentos e laboratórios, fundamentais na conclusão deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Maria Helena de Souza Goldman, à Dr^a. Andrea Carla Quiapim e ao Laboratório de Biologia Molecular de Plantas (LBMP) – FFCLRP – USP, à Dr^a Agda Paula Facincani e ao Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) – FCAV – UNESP - Campus Jaboticabal pelo sequenciamento das amostras de DNA.

Ao auxiliar de laboratório Paulo R. Epifânio pela dedicação com que realiza seu trabalho no laboratório há tantos anos.

Ao corpo docente da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP pela dedicação e excelente trabalho, que me possibilitaram ter uma ótima formação.

Aos funcionários no geral, que realizam as mais diversas funções no campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e facilitam as atividades de trabalho e estudo.

Às agências de fomento à pesquisa como FINEP, CAPES, FAPESP, CNPq e ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP e Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, cujas verbas mantêm o Laboratório de Genética Evolutiva.

Aos meus familiares por todo o incentivo, apoio, carinho e compreensão. Em especial aos meus pais, Neuza Batista Delduca e Orlando Delduca, que são minha fonte inspiradora, minha vida, meu alento. A vocês, todo o meu amor e eterna gratidão.

Ao meu namorado, Angelo de Oliveira Furlan, por todo o apoio, carinho, amor e compreensão nos momentos difíceis. Obrigada por trazer mais alegria à minha vida. Te amo muito.

Aos amigos que conquistei ao longo da graduação, que são muitos e não caberiam nestas páginas, saibam que cada um tem uma história e uma lembrança especial para mim. Em especial aqueles com os quais convivi por anos na República d20, Aline Campelo Mendes, Daniel Tech, Gabriel José Teixeira e Paulo Mangano de Almeida Santos, por todas as experiências de vida, discussões, risadas, e que são praticamente minha segunda família.

À colega de sala Sophia Araújo do Val Silva e a todos da 46^a turma de Ciências Biológicas ("Bio 46") da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto por todas as risadas e também pelos momentos difíceis de aprendizado. Já sinto saudades das conversas e a convivência todos os dias na faculdade. Vocês são muito queridos por mim. Obrigada por tudo.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram de alguma forma com a minha vida e minha graduação, muito obrigada.

DEDICATÓRIAS

À memória de minha avó Maria Aparecida Alves.

Aos meus pais, por todo o amor e esforço dedicados a mim, pelo incentivo a iniciar um curso superior e pelo apoio durante toda a minha vida. Sem vocês eu não estaria aqui hoje, quem eu sou e o que conquistei foi graças a vocês. Amo muito vocês.

RESUMO

Wolbachia pipientis (Rickettsiales, Anaplasmataceae) é uma bactéria endossimbionte, obrigatoriamente intracelular, conhecida por manipular o sistema reprodutivo de seus hospedeiros, por meio da indução de incompatibilidade citoplasmática, feminização, partenogênese ou morte do macho, aumentando sua frequência nas populações de seus hospedeiros. Embora seja classificada como uma única espécie, o gênero é altamente diverso, sendo classificado em supergrupos. Atualmente existem 13 supergrupos descritos, denominados alfabeticamente de A a F e de H a N, dado que o supergrupo G pode ser um recombinante dos supergrupos A e B. Os supergrupos mais comumente encontrados em artrópodes são A e B. Sua distribuição é pandêmica. Estima-se que 40% das espécies de artrópodes terrestres e 66% de todas as espécies de insetos estejam infectadas por Wolbachia. Este trabalho teve como objetivo verificar a ocorrência e identificar as linhagens de Wolbachia em amostras populacionais da espécie cactófila Drosophila buzzatii, endêmica da América do Sul. A amplificação foi feita através da técnica de PCR padrão e utilizando primers para o gene wsp, que codifica uma proteína de membrana de Wolbachia, específicos para a identificação de linhagens do supergrupo B de Wolbachia. As amostras de DNA foram extraídas de indivíduos machos de populações naturais de Drosophila buzzatii. De 23 amostras analisadas, foram sequenciadas 6 amostras infectadas por Wolbachia, denominados aqui como "isolados", uma frequência de 26%, valor esperado de acordo com dados da literatura, que preveem 20% de infecção utilizando PCR padrão. Através de análises estatísticas, foram obtidos três haplótipos em Drosophila buzzatii, sendo que dois deles são distintos entre si, apresentando cerca de 28% de diferença na composição de aminoácidos. Um dos haplótipos é proveniente da Bahia (Brasil) e é semelhante à linhagem wNo (Drosophila simulans), pertencente ao supergrupo B de Wolbachia. O outro é composto por amostras provenientes de La Cruz (Argentina) e dos estados do Rio Grande do Sul, São Paulo e Minas Gerais (Brasil) e é semelhante ao isolado ALB001 (Pseudacysta perseae), o qual ainda não descrito foi como membro de algum supergrupo. Entretanto, a densidade de infecção encontrada é baixa, o que pode ter várias explicações, como interferência do DNA do hospedeiro ou baixa densidade de Wolbachia nos tecidos. Através de análises das relações fenéticas entre diversos grupos de Wolbachia, foi observado que Drosophila buzzatii é hospedeira de linhagens de

Wolbachia que não são frequentemente observadas entre espécies do gênero *Drosophila*, dado que a maioria das espécies do gênero estão infectadas por linhagens do supergrupo A. Existem muitas linhagens de *Wolbachia* em *Drosophila* que não se agrupam em nenhum dos supergrupos mais comuns em artrópodes (A e B), inclusive um dos haplótipos (amostras da Argentina e Sul/Sudeste do Brasil) obtidos em *Drosophila buzzatii*. É necessário um estudo acerca das relações filogenéticas entre estas linhagens para saber se são recombinantes ou talvez um novo supergrupo.

Palavras-chave: *Wolbachia*, gene *wsp*, supergrupo B de *Wolbachia*, *Drosophila buzzatii*, endossimbiose.

ABSTRACT

Wolbachia pipientis (Rickettsiales, Anaplasmataceae) is an obligate intracellular endosymbiont bacteria known to manipulate the reproductive system of its hosts by inducing cytoplasmic incompatibility, feminization, parthenogenesis or male killing, increasing its frequency in the hosts population. Although it is classified as a single species, the genus is highly diverse, being classified into supergroups. Currently there are 13 supergroups described, called alphabetically from A to F and H to N, since the supergroup G may be a recombinant of supergroups A and B. The most commonly found supergroups in arthropods are A and B. Its distribution is estimated pandemic. It was found that 40% of terrestrial arthropods species and 66% of all insects species are infected by Wolbachia. This study aimed to assess the occurrence and identification of Wolbachia strains in populations of the cactophylic species Drosophila buzzatii, endemic to South America. The amplification was performed by standard PCR using primers for wsp gene, which encodes a Wolbachia surface protein, for the identification of strains specific to Wolbachia supergroup B. The DNA samples were extracted from male individuals from natural populations of Drosophila buzzatii. Of 23 samples, 6 samples, were found infected by Wolbachia, here named as "isolates", a frequency of 26%, expected according to the literature data, which predict 20% infection using standard PCR. Through statistical analysis, three haplotypes were obtained in Drosophila buzzatii, two of which are distinct from each other, with about 28% difference in amino acid composition. One haplotype comes from Bahia (Brazil) and is similar to the wNo strain (Drosophila simulans) belonging to Wolbachia supergroup B. The other is composed of samples from La Cruz (Argentina) and the states of Rio Grande do Sul, São Paulo and Minas Gerais (Brazil) and is similar to the isolate ALB001 (Pseudacysta perseae), which has not been described as a member of a supergroup yet. However, the density of infection found is low, which may have many explanations, such as interference of host DNA or Wolbachia low density in host tissue. Through analyzes of fenetic relations between different groups of Wolbachia it has been observed that Drosophila buzzatii is host for Wolbachia strains that are not often found in species of the genus Drosophila, since most species of the genus are infected by strains of supergroup A. There are many strains of Wolbachia in Drosophila that are not grouped in any of the most common arthropods supergroups (A and B), including one

of the haplotypes (samples from Argentina and South / Southeast of Brazil) obtained in *Drosophila buzzatii*. A study of the phylogenetic relationships between these strains is required to determine whether they are recombinants or perhaps a new supergroup.

Keywords: Wolbachia, wsp gene, Wolbachia supergroup B, Drosophila buzzatii, endosymbiosis.

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídios fosfatados
G	Grama
Μ	Molar
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
mM	Milimolar
mtDNA	Ácido desoxirribonucleico mitochondrial
Ng	Nanograma
n°	Número
Pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Rpm	Rotações por minute
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
UV	Ultra violeta
V	Volts
Wsp	Wolbachia Surface Protein (proteína de membrana de Wolbachia)
%	Porcentagem
+	Controle positivo para infecção por Wolbachia
-	Controle negativo da reação em cadeia da polimerase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Endossimbiose	12
1.2 Wolbachia	16
1.3 Interações Wolbachia-hospedeiro e efeitos fenotípicos	22
1.4 O "cluster" Drosophila buzzatii e a espécie D. buzzatii	27
1.5 Justificativa para o desenvolvimento do projeto	30
2. OBJETIVOS	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Amostras	32
3.2 Isolamento e amplificação do gene <i>wsp</i>	34
3.3 Eletroforese em gel de agarose	36
3.4 Purificação do DNA amplificado	37
3.5 Sequenciamento de DNA	38
3.6 Análises nucleotídicas	39
4. RESULTADOS & DISCUSSÃO	41
4.1 Amplificação do DNA	41
4.2 Estatística descritiva	45
4.3 Relações fenéticas entre as sequências obtidas	50
5. CONCLUSÃO	56
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1. INTRODUÇÃO

1.1 Endossimbiose

O termo "simbiose" (do grego: syn = juntos e bios = vida), geralmente, é usado para descrever associações benéficas entre microrganismos ("simbiontes") e seus hospedeiros. Uma definição clássica de simbiose é a relação entre "organismos diferentes que vivem juntos", proposta por De Bary, em 1878, e pode abarcar diversas relações ecológicas, do mutualismo ao parasitismo. A definição moderna trata simbiose como a associação entre dois organismos que se beneficiam mutuamente. O termo "endossimbiose" (do grego: *endo* = interior e *biosis* = que vive), por sua vez, designa a relação de um organismo que vive no interior do corpo ou da célula de outro organismo. Deste modo, endossimbiontes são organismos que vivem nos tecidos ou no citoplasma celular de seus hospedeiros em uma relação de simbiose (KUTSCHERA & NIKLAS, 2005).

A endossimbiose é um fenômeno frequente na natureza e de grande importância na história evolutiva dos seres vivos, notadamente no que se refere à origem dos eucariotos. De acordo com a Teoria da Endossimbiose, as organelas celulares mitocôndria e cloroplasto surgiram, de forma independente, a partir de uma bactéria ancestral assimilada por outra bactéria que, posteriormente, teriam se tornado endossimbiontes obrigatórios (MARGULIS, 1993; SMITH & SZATHMÁRY, 1995). Estas organelas são semelhantes às bactérias tanto em sua ultraestrutura quanto em suas sequências de DNA (O'BRIEN, 2003; KIM & ARCHIBALD, 2009; KUMAR, MELLA-HERRERA & GOLDEN, 2010). Algumas evidências que corroboram essa teoria são: aproximadamente o mesmo tamanho de um procarioto; membrana dupla, sendo a membrana interna muito similar à de procariotos; presença de DNA próprio, circular como o de procariotos; divisão independente da divisão celular do eucarioto; ribossomos próprios, similares aos de procariotos e não de eucariotos; subunidade gama da enzima DNA polimerase III muito semelhante ao Fator de Replicação C bacteriano e genes relacionados tanto ao DNA eucariótico quanto ao DNA de procariotos atuais (KHANNA, 2010).

Existem duas hipóteses para a origem das mitocôndrias. Na hipótese de origem endossimbiótica, as mitocôndrias surgiram a partir de uma bactéria ancestral aeróbica, pertencente à classe α-proteobacteria, que teria sido assimilada por outra bactéria, originando a protomitocôndria (KUTSCHERA & NIKLAS, 2005). A análise genômica de mitocôndrias e bactérias mostrou alta similaridade entre as sequências das mitocôndrias analisadas e as famílias de bactérias Anaplasmataceae e Rickettsiaceae, indicando-as como grupos irmãos (WILLIAMS, SOBRAL & DICKERMAN, 2007). Na hipótese de origem autógena, as mitocôndrias teriam surgido por meio da divisão do DNA do núcleo de uma célula protoeucariótica no momento de divergência entre procarioto e eucarioto, separando uma porção desse DNA que ficaria envolto por membranas, originando a organela (KUTSCHERA & NIKLAS, 2005). Já que mitocôndrias possuem muitas semelhanças com procariotos, a teoria mais aceita atualmente é a de origem endossimbiótica (MARTIN & MÜLLER, 2007). A relação simbiótica se desenvolveu por volta de 1,7 (EMELYANOV, 2001) ou 2 (FENG, CHO & DOOLITTLE, 1997) bilhões de anos atrás.

Outro grande impacto dos estudos acerca da endossimbiose e da origem da mitocôndria foi a descoberta da "Eva Mitocondrial" (CANN, STONEKING & WILSON, 1987). As mitocôndrias, além de possuírem DNA próprio, são herdadas através do citoplasma do ovo. Ao contrário do DNA nuclear que é proveniente tanto do pai quanto da mãe, todo o DNA mitocondrial (mtDNA) é herdado como uma única unidade (haplótipo). Isso diminui as chances de recombinação genética, o que o torna uma importante fonte de informação em estudos de genética de populações e biologia evolutiva (CASTRO, PICORNEL & RAMON, 1998). Além disso, as mitocôndrias paternas são destruídas durante os primeiros estágios da embriogênese através de um mecanismo de reconhecimento de ubiquitina, garantindo a descendência matrilineal (SUTOVSKY *et al.*, 1999).

Com estudo do mtDNA (CANN, STONEKING & WILSON, 1987; TORRONI et al., 2006), foi possível traçar a origem da espécie humana, revelando que os humanos atuais surgiram a partir de uma mulher que teria vivido cerca de 200.000 anos atrás. Esta mulher foi denominada "Eva Mitocondrial" (CANN, STONEKING & WILSON, 1987) e corroborou a teoria da Origem Recente Africana (GARRIGAN & HAMMER, 2006), em que humanos teriam surgido a partir de um único grupo de *Homo sapiens* no leste da África, entre 100 e 200 mil anos atrás, espalharam-se pelo resto do mundo e

14

substituíram outros grupos, como os *Homo neanderthalensis* e *Homo erectus*. Apesar de seu nome ser uma referência bíblica, ela certamente não foi a única mulher viva na época e não é possível traçar o mtDNA de todos os humanos até ela, sendo mais provável que outras mulheres que tenham surgido não deixaram descendentes ou seus descendentes estão relacionados a menores populações viventes (STONEKING, 2008).

Já os cloroplastos possuem membrana interna semelhante à de cianobactérias (KEELING, 2004) e ocorrem em diversos grupos de eucariotos, indicando que estes possivelmente surgiram mais de uma vez durante a evolução. Todos os eucariotos que possuem cloroplastos possuem também mitocôndrias, mas o inverso não ocorre, evidência para a hipótese de que os cloroplastos vieram depois (ARCHIBALD, 2009). Além disso, alguns cloroplastos não possuem apenas duas membranas celulares, mas três ou até quatro e, em alguns casos, entre essas membranas extras é possível encontrar resquícios de núcleos eucarióticos (CHAAL & GREEN, 2005). Alguns grupos possuem cloroplastos secundários e até mesmo terciários (KEELING, 2010).

Por isso a Teoria da Endossimbiose pode ser denominada também como Endossimbiose Sequencial, por ter ocorrido através de dois passos. Primeiro, uma célula procariótica teria assimilado outro procarioto (uma α -proteobacteria) gerando a protomitocôndria e culminando na origem da primeira célula eucariótica (ou "protoeucarioto"). Depois, esse protoeucarioto teria assimilado o procarioto (uma cianobactéria) que viria a originar o protocloroplasto (KUTSCHERA & NIKLAS, 2005) (Figura 1).



Figura 1. Neste modelo, o procarioto ancestral teria primeiro originado o núcleo e o retículo endoplasmático através da invaginação da membrana plasmática. Depois, este procarioto ancestral, denominado "protoeucarioto", teria assimilado um outro procarioto, o ancestral da mitocôndria, gerando o eucarioto heterotrófico ancestral. Por fim, a assimilação de um outro procarioto, uma cianobactéria, que viria a se tornar o protocloroplasto e gerar o eucarioto autotrófico ancestral. Reproduzido e modificado de Campbell & Reece (2009).

Cerca de um bilhão de anos atrás (MCFADDEN & VAN-DOOREN, 2004), uma célula eucariótica contendo mitocôndrias teria assimilado uma cianobactéria ancestral, e da mesma forma como a mitocôndria, teria escapado de vacúolos digestivos e se reproduzido, processo denominado endossimbiose primária. Posteriormente, muitos dos genes da cianobactéria ancestral teriam sofrido deleção ou transferidos ao núcleo do hospedeiro eucarioto (transmissão lateral), estabelecendo relação simbiótica obrigatória (NAKAYAMA & ARCHIBALD, 2012). Além disso, os genes transferidos do endossimbionte para o hospedeiro podem ser expressos tanto no hospedeiro quanto em sua prole. Acredita-se que a endossimbiose primária tenha dado origem às três principais linhagens de cloroplastos, Glaucophyta, Chloroplastida e Rodophyceae (BALL *et al.*, 2011). Algumas dessas algas teriam sido assimiladas por outras algas, num processo chamado endossimbiose secundária e, por sua vez, teriam sido assimiladas por outras algas, caracterizando endossimbiose terciária (KEELING, 2004; KIM & ARCHIBALD, 2009).

Bactérias endossimbiontes são encontradas em abundância entre invertebrados, principalmente em artrópodes (ZCHORI-FEIN & BOURTIS, 2011). Os endossimbiontes mais comuns que infectam artrópodes pertencem aos gêneros *Arsenophonus, Cardinum, Spiroplasma* e *Wolbachia* (DURON *et al.*, 2008). Existem casos em que há mais de uma espécie de endossimbionte coexistindo no mesmo organismo hospedeiro, como ocorre em *Drosophila*, podendo ser infectada simultaneamente por *Wolbachia* e *Spiroplasma*, mesmo em populações naturais (MONTENEGRO *et al.*, 2005).

1.2 Wolbachia

Wolbachia (Figura 2) é uma bactéria endossimbionte conhecida por manipular o sistema reprodutivo de seus hospedeiros, por meio de incompatibilidade citoplasmática, indução de feminização, partenogênese e morte do macho, aumentando sua frequência nas populações de seus hospedeiros. Foi descoberta em 1924 por Hertig e Wolbach (HERTIG & WOLBACH, 1924), encontrada nos tecidos reprodutivos do mosquito *Culex pipiens*, sendo posteriormente denominada *Wolbachia pipientis* (HERTIG, 1936). O gênero é obrigatoriamente intracelular, pertencente à classe de bactérias gramnegativas α -proteobacteria, ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae. Já *Wolbachia persica* foi originalmente denominada assim por semelhanças ultraestruturais, mas apesar de possuir o mesmo nome do gênero, pertence à classe γ -proteobacteria (WEISBURG *et al.*, 1989) e, portanto, é filogeneticamente distante de *Wolbachia pipientis*.



Figura 2. Micrografia eletrônica de uma célula de *Drosophila sp.* contendo três indivíduos do gênero *Wolbachia* (círculos grandes delineados em branco). Reproduzido a partir de Wu *et al.* (2004).

As rickettsias mais próximas filogeneticamente (Figura 3) são as pertencentes aos gêneros *Anaplasma* (Anaplasmataceae) e *Ehrlichia* (Anaplasmataceae), seguidas por *Neorickettsia* (Anaplasmataceae) e *Rickettsia* (Rickettsiaceae) (HOTOPP *et al.*, 2006). Estas possuem um ciclo de vida que geralmente envolve um invertebrado como vetor e um mamífero como hospedeiro, embora algumas espécies sejam encontradas apenas em invertebrados (WERREN *et al.*, 1994). Ao contrário dos gêneros relacionados, *Wolbachia* não possui registro de infecção em vertebrados até o momento, sendo encontrada em artrópodes (como as principais ordens de insetos, alguns crustáceos e quelicerados) e nematoides filariais. Estima-se que 40% das espécies de artrópodes terrestres (ZUG & HAMMERSTEIN, 2012) e 66% de todas as espécies de insetos estejam infectadas por *Wolbachia* (HILGENBOECKER *et al.*, 2008).



Figura 3. A) As relações filogenéticas da ordem Rickettsiales, mostrando a proximidade entre *Wolbachia* e alguns outros gêneros da família Anaplasmataceae. B) Árvore filogenética não enraizada dos principais supergrupos de *Wolbachia*. Também ilustra os padrões dominantes de mutualismo ou parasitismo reprodutivo entre os supergrupos. Para alguns supergrupos, o tipo de interação com *Wolbachia* ainda é desconhecido. Os triângulos representam a diversidade de linhagens já descritas para o supergrupo. Círculos representam uma única linhagem de *Wolbachia*. Reproduzido e modificado de Werren, Baldo &

Clark (2008).

Apesar de ser classificada como uma única espécie (*Wolbachia pipientis*), o gênero é altamente diverso e é dividido em "supergrupos", todos monofiléticos quando comparados às outras Rickettsiales (HOTOPP *et al.*, 2006; LO *et al.*, 2007; WERREN, BALDO & CLARK, 2008), sendo que cada um deles possui diversas linhagens. Há 13 supergrupos descritos até o momento, classificados alfabeticamente de A a F e de H a N (AUGUSTINOS *et al.*, 2011). Os supergrupos A e B foram os primeiros a serem descritos e são os mais comumente encontrados em artrópodes (BREEUWER *et al.*, 1992; WERREN, WINDSOR & GUO, 1995; WERREN, ZHANG & GUO, 1995). Os supergrupos C e D são restritos à nematoides filariais (BANDI *et al.*, 1998). O Supergrupo F foi encontrado em nemátodas e alguns artrópodes, como escorpiões (BALDO *et al.*, 2007), esperanças (PANARAM & MARSHALL, 2007), cimídeos (SAKAMOTO, FEINSTEIN & RASGON, 2006), piolhos (COVACIN & BARKER, 2007), baratas (VAISHAMPAYAN *et al.*, 2007), formigas-leão (DUNN & STABB, 2005), cupins, carunchos e moscas parasitas da família Hippoboscidae (CASIRAGHI, M. *et al.*, 2005; LO *et al.*, 2002, ROS *et al.*, 2009). O Supergrupo E foi encontrado

somente em insetos colêmbolos (TIMMERMANS *et al.*, 2004) e H em um gênero de cupins (BORDENSTEIN & ROSENGAUS, 2005).

Já o supergrupo G foi encontrado em aranhas (ROWLEY, RAVEN & MCGRAW, 2004), mas sua validade é discutida por ser considerado um recombinante entre os supergrupos A e B (BALDO & WERREN, 2007). Além disso, quando analisadas sequências do gene 16S rRNA, a robustez dos supergrupos E, F e H também é questionada, dado sua diferença de menos de 2% quando comparados ao supergrupo A (AUGUSTINOS *et al.*, 2011). Os outros supergrupos foram descritos mais recentemente e em poucos grupos, como: supergrupo I foi encontrado em *Onchocerca gibsoni e O. ochengi*, J em *Dipetalonema gracile*, K em *Bryobia sp.*, L em *Radopholus similis*, M em *Tuberolachnus salignu* e algumas espécies de *Cinara sp.*, e N em algumas espécies de *Toxoptera sp.* (AUGUSTINOS *et al.*, 2011; BING *et al.*, 2014).

Por convenção, qualquer sequência nucleotídica obtida a partir da amplificação de genes de *Wolbachia* é chamada de "isolado", desta forma, isolados distintos podem pertencer à mesma linhagem de *Wolbachia*. Foram encontrados outros diversos isolados na literatura, mas mais dados e análises são necessários para incluí-los em alguma linhagem já descrita ou descrevê-los como uma linhagem nova (TENOVER *et al.*, 1995).

A distribuição geográfica deste organismo, que é um dos endossimbiontes mais abundantes atualmente, é ampla, podendo ser considerada pandêmica (WERREN & WÌNDSOR, 2000; WERREN, BALDO & CLARK, 2008), dado que o gênero *Wolbachia* infecta diversos táxons que ocorrem em muitas localidades do mundo e, portanto, sua área de ocorrência é equivalente a área de ocorrência de seus diversos hospedeiros.

Já foi descrito na literatura a infecção de mais de uma linhagem de *Wolbachia* no mesmo hospedeiro, como ocorre em *Drosophila simulans* que pode ser infectada, simultaneamente, com as linhagens *w*Ha do supergrupo A e *w*Ma do supergrupo B (JAMES *et al.*, 2002). Existem ainda outros estudos com *Wolbachia* acerca de sua interação com outros organismos no mesmo hospedeiro e têm demonstrado que este endossimbionte limita os níveis de infecção de alguns tipos de vírus, como a dengue (WERREN BALDO & CLARK, 2008; MOREIRA *et al.*, 2009). Nos casos de mutualismo, foi demonstrado que o tratamento com antibióticos faz com que a morte

dessa bactéria culmine na morte também de seu hospedeiro (BOURTZIS, 2008). Contudo, é preciso ter precaução quando se fala no uso de um organismo como controle biológico, pois muito ainda deve ser estudado acerca das relações evolutivas e interações ecológicas entre a *Wolbachia* e estes organismos.

Os mecanismos de transmissão deste endossimbionte podem ser por transmissão vertical e horizontal. A *Wolbachia* também pode transferir fragmentos de seu próprio DNA para o DNA do hospedeiro via transmissão lateral de genes (Figura 4) (HOTOPP *et al.*, 2007). Além disso, relações muito mais complexas de transmissão lateral de genes são associadas entre *Wolbachia* e elementos transponíveis de *Drosophila sp.* e também troca de genes via bacteriófagos (WO) deste endossimbionte (LORETO, CARARETO & CAPY, 2008).



Nature Reviews | Microbiology

Figura 4. Esquema de como pode ocorrer a transmissão lateral de genes de *Wolbachia* para seu hospedeiro *Drosophila ananassae*. Quase todo o genoma de *Wolbachia* (verde) é transferido para o segundo cromossomo de *D. ananassae* (azul). Na sequência, os elementos transponíveis (ETs) de *D. ananassae* se inserem entre os genes de *Wolbachia*. Pelo menos 28 genes de *Wolbachia* são transcritos a partir do genoma de *D. ananassae*, embora sua significância funcional seja ainda desconhecida. Reproduzido de Werren, Baldo & Clark (2008).

O meio de transmissão vertical é o mais bem estudado até o momento. A *Wolbachia* é passada através do citoplasma do ovo e, após a fecundação, estes endossimbiontes se ligam aos microtúbulos (Figura 5) durante as divisões celulares, segregando-se simultaneamente com os cromossomos do hospedeiro. Deste modo, *Wolbachia* infecta todas as células de seus organismos hospedeiros, embora somente aquelas presentes nas células germinativas sejam transmitidas à próxima geração. Em hospedeiros adultos, é mais comum encontrar este endossimbionte nos tecidos reprodutivos, sendo possível que a *Wolbachia* possua mecanismos eficientes para encontrar as células germinativas durante o desenvolvimento embrionário do hospedeiro (LANDMANN *et al.*, 2014). Acredita-se que a transmissão vertical tende a selecionar organismos que vivem em mutualismo, e muito se especula também que, devido a este fator, a transmissão vertical tende a levar à coevolução (LANDMANN *et al.*, 2014), já que um organismo depende do outro (ZUG & HAMMERSTEIN, 2014).



Figura 5. Micrografia fluorescente mostrando as bactérias *Wolbachia* (vermelho) associadas aos microtúbulos (verde) de quatro fusos mitóticos no sincício de um embrião de *Drosophila*. Os grumos de bactérias nos polos dos fusos irão segrega-se junto aos cromossomos (não visíveis no equador do fuso). Reproduzido de Alberts, Bray, & Lewis (2009).

Entretanto, quando analisadas as sequências do gene *16S rRNA*, a divergência entre linhagens de *Wolbachia* encontradas em grupos filogeneticamente distantes de artrópodes é baixa (1-2%), o que indica que essa bactéria possui também mecanismo de transmissão horizontal (O'NEILL et al., 1992), ou seja, por transmissão interespecífica via infecção. De acordo com dados da literatura, a transmissão horizontal tende a selecionar organismos parasitas (ZUG & HAMMERSTEIN, 2014). Este meio de transmissão ainda está em estudo e não há muitos dados disponíveis até o momento. Uma das prováveis explicações é que a transmissão se dê via insetos endoparasitas, nos quais a *Wolbachia* presente no hospedeiro pode ser assimilada no estágio imaturo do inseto endoparasita. Para ser completa a transmissão horizontal, ela ainda teria que passar por transmissão vertical e, durante esse processo, a *Wolbachia* pode ser eliminada, pois para transmissão vertical ela primeiro tem que se replicar e segregar em sincronia com a oogênese, o que pode não ocorrer devido à incompatibilidade citoplasmática *Wolbachia*-hospedeiro, eliminando ou reduzindo o nível de infecção (HEATH *et al.*, 1999).

1.3 Interações *Wolbachia*-hospedeiro e efeitos fenotípicos

Há pelo menos quatro efeitos fenotípicos causados pela interação da bactéria endossimbionte *Wolbachia* com seu hospedeiro registrados até o momento, sendo: incompatibilidade citoplasmática (IC), partenogênese, feminização e morte do macho (Figura 6) (WERREN, BALDO & CLARK, 2008). Linhagens que causam mais de um efeito fenotípico são chamadas de "multipotentes" (WERREN, BALDO & CLARK, 2008).



Nature Reviews | Microbiology

Figura 6. Ilustração mostrando os quatro fenótipos reprodutivos distintos em diversas ordens de artrópodes, caudados por *Wolbachia* (topo). Feminização resulta em indivíduos geneticamente machos que se desenvolvem como fêmeas (Hemipera, Isopoda e Lepidoptera). A indução de partenogênese elimina machos na reprodução (Acari, Hymenoptera e Thysanoptera). A morte do macho elimina machos infectados com a vantagem de sobrevivência das irmãs fêmeas (Coleoptera, Diptera, Lepidoptera e Pseudoscorpiones). A incompatibilidade citoplasmática evita que machos infectados tenham sucesso no acasalamento com fêmeas que não possuem o mesmo tipo de *Wolbachia* (Acari, Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Isopoda, Lepidoptera e Orthoptera). Na parte inferior esquerda, um corte transversal de um nematoide filarial macho, *Onchocerca ochengi*, que contém *Wolbachia* (colorida artificialmente em amarelo) em três das quatro células do cordão lateral sincicial. A imagem na parte inferior direita mostra *Wolbachia* (amarelo) nos ovários de uma fêmea de *Drosophila simulans*. Reproduzido e modificado de Werren, Baldo & Clark (2008).

Incompatibilidade citoplasmática (IC): é o fenótipo induzido por *Wolbachia* mais frequentemente observado e têm sido descrito em aracnídeos, isópodes e algumas ordens de insetos. Os espermatozoides de machos infectados por *Wolbachia* são incompatíveis com o citoplasma do ovo de fêmeas que não estão infectadas pelo mesmo tipo de *Wolbachia* (WERREN, BALDO & CLARK, 2008).

A IC compreende dois fatores distintos: a modificação induzida por *Wolbachia* no espermatozoide durante a espermatogênese e o resgate dessa modificação no embrião infectado por esta mesma linhagem. Se o espermatozoide é modificado, mas a *Wolbachia* apropriada não está presente durante o desenvolvimento do embrião, o desenvolvimento embrionário é interrompido (WERREN, 1997). Os mecanismos moleculares envolvidos na IC ainda são desconhecidos (WERREN, BALDO & CLARK, 2008).

Um dos efeitos da IC para o hospedeiro é o distúrbio das mitoses embrionárias iniciais, devido à interrupção do ciclo celular, levando a um desenvolvimento não sincronizado em que o pronúcleo do macho se desenvolve mais lentamente em relação ao da fêmea (Figura 7) (LASSY & KARR, 1993; TRAM & SULLIVAN, 2002; REED & WERREN, 1995). Além disso, diferentes linhagens de *Wolbachia* possuem diferentes mecanismos de resgate da modificação induzida durante a espermatogênese (WERREN, 1997). Assim, o cruzamento entre diferentes linhagens pode levar a incompatibilidade bidirecional, enquanto que o cruzamento entre macho infectado e fêmea não infectada gera incompatibilidade unidirecional (WERREN, BALDO & CLARK, 2008).



Nature Reviews | Microbiology

Figura 7. Ilustração das bases citológicas da incompatibilidade citoplasmática. A coluna à esquerda mostra um desenvolvimento embrionário normal em indivíduos não infectados por *Wolbachia*. A coluna do meio mostra a incompatibilidade citoplasmática, em que o macho está infectado por um tipo de *Wolbachia* diferente da fêmea. Nesse caso, há desenvolvimento embrionário assincrônico dos pronúcleos paterno (azul) e materno (rosa) na primeira divisão mitótica. A quebra do envoltório nuclear no pronúcleo paterno, assim como a condensação da cromatina, ocorre mais lentamente em relação ao pronúcleo materno. Na metáfase, os cromossomos paternos ainda não estão completamente compactados. Na anáfase, os cromossomos paternos não segregam adequadamente. A coluna à direita mostra que a sincronia do desenvolvimento embrionário é restaurada em um embrião infectado por *Wolbachia*. Reproduzido e modificado de Werren, Baldo & Clark (2008).

Um estudo aponta evidências de que o genótipo do hospedeiro pode influenciar o nível e a forma de IC. Pelo menos uma linhagem de *Wolbachia* foi incapaz de resgatar totalmente a modificação após transferência para uma nova espécie hospedeira, evento denominado "infecção suicida" (ZABALOU *et al.*, 2008).

Partenogênese: é menos frequente que a IC, sendo registrada apenas em espécies que possuem desenvolvimento arrenótoco, em que os óvulos partenogenéticos originam indivíduos machos, como ocorre em ácaros (WEEKS & BREEUWER, 2001), hymenópteros (por exemplo, vespas) (STOUTHAMER, LUCK & HAMILTON, 1990) e tripes (Thysanoptera) (ARAKAKI, MYIOSHI & NODA, 2001). Em vez de gerar machos a partir de ovos não fecundados, a *Wolbachia* induz a geração de fêmeas, as quais, ao contrário dos machos, podem transmitir *Wolbachia* à prole. Assim como a IC, a partenogênese induzida por *Wolbachia* interrompe o ciclo celular durante o desenvolvimento embrionário, o que resulta em desenvolvimento diploide de óvulos não fertilizados (telitoquia) (WERREN, BALDO & CLARK, 2008).

Um exemplo ocorre na vespa *Muscidifurax uniraptor*, em que a primeira divisão mitótica se completa e fêmeas diploides se formam a partir da fusão dos núcleos de duas células (GOTTLIEB *et al.*, 2002). Já no ácaro *Bryobria praetiosa* a partenogênese parece ser funcionalmente apomítica, alterando a meiose de forma a gerar gametas diploides (WEEKS & BREEUWER, 2001).

Feminização: foi primeiro descrita em isópodos e, mais recentemente, em insetos, nos quais ocorre por diversos mecanismos. Em um estudo realizado com espécies da ordem de isópodos Oniscidea, foi observado que *Wolbachia* se prolifera nas glândulas androgênicas, causando hipertrofia destas e inibindo sua função (VANDEKERCKHOVE *et al.*, 2003). Em insetos, a feminização ocorre em *Eurema hecabe* (Lepidoptera) (HIROKI *et al.*, 2002) e *Zyginidia pulula* (Hemiptera) (NEGRI *et al.*, 2008). O mecanismo exato pelo qual ocorre é incerto, mas sabe-se que em *E. hecabe* a *Wolbachia* interfere com as vias de determinação sexual e continua agindo durante o desenvolvimento até completa feminização. A remoção de *Wolbachia* durante o desenvolvimento acarreta em desenvolvimento intersexual (NARITA *et al.*, 2007).

Morte do macho: já foi descrita na literatura para as ordens de insetos Coleoptera (FIALHO & STEVENS, 2000), Diptera (DYER & JAENIKE, 2004), Lepidoptera (JIGGINS *et al.*, 2001) e Pseudoscorpiones (ZEH, ZEH & BONILLA, 2005). Em cada um desses casos, a morte do macho ocorre ainda durante a embriogênese, o que pode resultar em melhor nutrição para a prole feminina sobrevivente.

Em um estudo com *Ostrinia scapulalis* (Lepidoptera), foi observado que o tratamento com o antibiótico tetraciclina para eliminar a *Wolbachia* resultou no nascimento de machos (KAGEYAMA *et al.*, 2002). Em um estudo subsequente foi observado que indivíduos geneticamente fêmeas morrem durante o desenvolvimento larval na ausência de *Wolbachia*, enquanto que na presença de *Wolbachia*, indivíduos geneticamente machos são feminizados e morrem durante o desenvolvimento larval. Desta forma, a morte do macho parece ocorrer por meio de feminização letal (KAGEYAMA *et al.*, 2004).

Contudo, ainda é incerto o quanto *Wolbachia* pode interferir com a determinação sexual de seus hospedeiros (WERREN, BALDO & CLARK, 2008). Há evidências de que a morte do macho pode atingir altas frequências em alguns casos, resultando em mudanças nos sistemas de acasalamento a fim de acomodar a escassez de machos (CHARLAT *et al*, 2007).

1.4 O "cluster" buzzatii e a espécie Drosophila buzzatii

O gênero *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) possui mais de 1700 espécies de moscas que medem, em média, 3mm de comprimento e possuem coloração variada. Devido ao enorme número e diversidade de espécies, o gênero *Drosophila* é dividido em diversas categorias taxonômicas inferiores, tais como subgêneros, grupos, subgrupos, complexos e "clusters". Um destes agrupamentos é o Grupo *Drosophila repleta*, que é uma das maiores radiações no continente americano dentro do gênero *Drosophila* (OLIVEIRA *et al.*, 2012). A maioria das espécies neste grupo é cactofílica, utilizando tecidos de cactos em decomposição como recurso obrigatório para desenvolvimento de suas larvas (RUIZ & HEED, 1988). Entre essas, na América do

Sul, uma radiação forma o "cluster" *Drosophila buzzatii* (MANFRIN & SENE, 2006). Este "cluster" é composto por sete espécies crípticas: *D. antonietae, D. borborema, D. buzzatii, D. gouveai, D. koepferae, D. serido* e *D. seriema*. Estas espécies são naturalmente endêmicas do continente sulamericano, com exceção de *D. buzzatii,* introduzida em outros continentes por meio de uma de suas plantas hospedeiras, o cacto *Opuntia fícus-indica,* o qual possui diversas finalidades para o homem (BARKER *et al.,* 1985). A associação *Drosophila/*cacto tem ao menos duas consequências: a primeira é que a distribuição atual de suas populações é determinada pela ocorrência de cactáceas, o que inclui os Domínios do Chaco e Caatinga e inúmeras populações, isoladas e restritas em tamanhos, em diferentes domínios fitogeográficos. A segunda consequência é que hipóteses para processos demográficos históricos de diferenciação dentro do "cluster" relacionam estes a expansões e retrações da vegetação aberta na América do Sul devido a alterações paleoclimáticas, como aquelas ocorridas durante os períodos glaciais (SENE, PEREIRA, & VILELA, 1982; MORAES *et al.,* 2009; FRANCO & MANFRIN, 2013).

As relações filogenéticas para o "cluster", determinadas com base em inversões cromossômicas (RUIZ & WASSERMAN, 1993) e sequências de DNA mitocondrial e nuclear (MANFRIN *et al.*, 2001; FRANCO *et al.*, 2006; FRANCO *et al.*, 2010) sugerem sua monofilia. Dentro do "cluster", as espécies podem ser divididas em três linhagens filéticas: a primeira mais basal compreendendo as espécies *D. buzzatii* e *D. koepferae*, a segunda formada pela espécie *D. antonietae*, e a terceira composta pelas espécies *D. seriema*, *D. serido*, *D. borborema* e *D. gouveai* (MANFRIN *et al.*, 2001; FRANCO *et al.*, 2010).

Trabalhos de isolamento reprodutivo realizados no "cluster" *D. buzzatii* mostraram que podemos observar desde acasalamentos ao acaso até isolamento reprodutivo total, sendo que isso varia dependendo da espécie e até mesmo das populações da mesma espécie em que os experimentos estão sendo realizados (BIZZO, 1983; WASSERMAN & RICHARDSON, 1987; MADI-RAVAZZI & BICUDO, 1992; MADI-RAVAZZI, BICUDO & MANZATO, 1997; MACHADO *et al.*, 2002).

As análises filogeográficas desenvolvidas para espécies deste grupo (DE BRITO *et al.*, 2002, 2002; MORALES, 2005; FRANCO, 2009; MORAES *et al.*, 2009) têm identificado, como principal evento que explica a distribuição atual das populações, a

expansão de área de ocorrência, muito provavelmente como consequência da associação com as cactáceas (MANFRIN & SENE, 2006).

A espécie D. buzzatii é mais basal dentro do cluster, possui a maior área de distribuição geográfica, com populações em toda a área conhecida de ocorrência do "cluster", inclusive em simpatria com as demais espécies (MANFRIN & SENE, 2006). Embora tenha uma ampla distribuição geográfica, análises moleculares mostraram que a espécie apresenta baixa diversidade nucleotídica e sugerem que populações desta espécie possam ser divididas em dois grupos: as populações da Caatinga e todas as demais, sugerindo fluxo gênico como evento homogeneizador (SANTOS, 2011). Estas análises também sugerem, para explicar a distribuição atual da variação genética nas populações, que o evento mais antigo de expansão é da Caatinga em direção aos outros biomas. Análises morfológicas de asas e edeagos (apêndice da genitália externa do macho), considerando forma e tamanho, resultaram na divisão das populações entre as da Caatinga e dos outros biomas, concordando análises moleculares (SANTOS, 2009). Por outro lado, considerando informações cromossômicas, as populações do Chaco são altamente variáveis com relação a polimorfimos de inversões e a hipótese para explicar estes dados é que diferentes arranjos cromossômicos tenham sido favorecidos devido a presença de grande diversidade de cactos como recurso alimentar (FANARA & HASSON, 2001)

Para as outras espécies do cluster, por outro lado, análises moleculares sugerem existência de agrupamentos populacionais isolados, com espécies politípicas (MANFRIN & SENE, 2006; SANTOS, 2011; FRANCO *et al.*, 2010; FRANCO & MANFRIN, 2013).

1.5 Justificativa para o desenvolvimento do projeto.

A quantidade de informações existente para o "cluster" *Drosophila buzzatti* faz com que este seja um modelo biológico interessante para explorar diferentes questões biológicas, pois existem para ele informações filogenéticas, descrição de associações ecológicas, áreas de ocorrência, informações sobre comportamento, datações para eventos demográficos e outras. Assim, foi decidido avaliar a ocorrência de *Wolbachia* nas espécies e populações do "cluster" para acrescentar informações sobre a dinâmica evolutiva desta associação com endossimbionte na evolução de suas espécies, da mesma forma que acrescentar informações sobre a dinâmica evolutiva do endossimbionte. Para o desenvolvimento deste projeto, foram analisadas amostras de populações da espécie *D. buzzatii* por ser a mais basal, com ampla distribuição geográfica e, também, por apresentar facilidades técnicas para o desenvolvimento do trabalho.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos: verificar a ocorrência e identificar as linhagens da bactéria endossimbionte *Wolbachia* (Rickettsiales, Anaplasmataceae) em amostras populacionais da espécie cactófila *Drosophila buzzatii*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras

Para realização deste trabalho, foram analisadas amostras de DNA, previamente extraídas, de indivíduos machos coletados na natureza e representativos de populações da espécie Drosophila buzzatii. Foram utilizados indivíduos coletados na natureza para evitar viés da presença do endossimbionte devido à contaminação no laboratório. Devido ao fato de serem espécies crípticas, apenas os machos podem ser identificados até o nível de espécie por meio de análises da genitália externa masculina (edeago) (VILELA, 1983). O DNA foi extraído destes indivíduos machos, fixados em álcool, com auxilio do conjunto de reagentes DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). Este material está armazenado em freezer no laboratório de Genética Evolutiva do Departamento de Biologia da FFCLRP - USP. Inicialmente, foi realizada uma verificação da presença do endossimbionte em todas as espécies do cluster Drosophila buzzatii: D. antonietae, D. borborema, D. buzzatii, D. gouveai, D. koepterae, D. serido e D. seriema. Como controle positivo, foram analisados DNA de linhagens das espécies D. melanogaster e D. willistoni, sabidamente infectadas por linhagens do supergrupo A de Wolbachia, cedidas gentilmente pelo grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Victor Hugo Valiati, da UNISINOS, RS.

Para análises populacionais, foi avaliada a presença de *Wolbachia* em 22 indivíduos da espécie *Drosophila buzzatii*, provenientes de diferentes localidades ao longo de sua distribuição (Tabela 1; Figura 8).

Amostra	Localização	Estado/País	Latitude	Longitude	Domínio
01 - CRA9	La Cruz	Argentina	-32.307222	-64.491944	Chaco
02 - CRN16	La Cruz	Argentina	-32.307222	-64.491944	Chaco
03 - CRUZ6	La Cruz	Argentina	-32.307222	-64.491944	Chaco
04 - H99.2	Sengés	PR/Brasil	-24.083333	-49.483333	M. A.*
05 - J20.3	Nova Ponte	MG/Brasil	-19.133333	-47.683333	Cerrado
06 - J21.1	Sertãozinho	SP/Brasil	-21.150000	-47.966667	Cerrado
07 - J27.3	Santiago	RS/Brasil	-29.183333	-54.833333	Pampas
08 - J66.1	Furnas	MG/Brasil	-20.616667	-46.250000	Cerrado
09 - J78.5	Ibotirama	BA/Brasil	-12.266667	-43.066667	Caatinga
10 - J92.1	Milagres	BA/Brasil	-12.850000	-39.883333	Caatinga
11 - J93.9	Manoel Vitorino	BA/Brasil	-14.133333	-40.233333	Caatinga
12 - N08.1	Praia Joaquina	SC/Brasil	-27.628790	-48.448849	M. A.*
13 - N11.2	Ilha S. Francisco	SC/Brasil	-26.333384	-48.583217	M. A.*
14 - N36.5	Petrolina	PE/Brasil	-9.108528	-40.647028	Caatinga
15 - N37.1	Morro Torre	BA/Brasil	-9.936749	-40.263138	Caatinga
16 - N41.2	Morro do Chapéu	BA/Brasil	-11.548889	-41.168889	Caatinga
17 - N43.1	Irecê	BA/Brasil	-11.333333	-41.783333	Caatinga
18 - N44.5	Xique-Xique	BA/Brasil	-10.866667	-42.716667	Caatinga
19 - N47.6	Juazeiro	BA/Brasil	-9.416667	-40.500000	Caatinga
20 - N57.4	P. Pedra Elefante	MG/Brasil	-19.291277	-43.559444	Cerrado
21 - N58.4	Trilha do Riacho	MG/Brasil	-19.290278	-43.590972	Cerrado
22- SALVA.4	Salvador	BA/Brasil	-12.950000	-38.450000	M. A.*

Tabela 1. Localidades e coordenadas geográficas das populações amostradas deDrosophila buzzatii para identificação da ocorrência do endossimbionte Wolbachia.

*M. A.: Mata Atlântica.



Figura 8. Mapa da América do Sul indicando as localidades de populações amostradas da espécie *Drosophila buzzatii*. Círculos azuis= amostras em que não foi possível detectar infecção por *Wolbachia*; estrela ciano (8)= amostra cujo resultado do sequenciamento foi inconclusivo; estrelas vermelhas (2, 6, 7, 9 e 21)= amostras em que foram detectadas a presença de *Wolbachia*.

3.2 Isolamento e amplificação do gene wsp

A avaliação da presença do endossimbionte *Wolbachia* foi realizada por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) do gene *wsp*, um gene específico deste endossimbionte, que codifica a proteína de membrana *Wolbachia Surface Protein*, e devido a taxas evolutivas maiores é considerado informativo para identificação de linhagens desta bactéria (ZHOU, ROUSSET & O'NEILL, 1998).

Os *primers* utilizados para amplificação do gene *wsp* na verificação das espécies do "cluster" *Drosophila buzzatii* foram: 81F (5' TGG TCC AAT AAG TGA AGA

AAC) e 691R (5' AAA AAT TAA ACG CTA CTC CA) (ZHOU, ROUSSET & O'NEILL, 1998). Estes *primers*, geralmente, são utilizados na identificação de todas as linhagens de *Wolbachia*, resultando em fragmentos de DNA de 590 a 632 pares de bases (ZHOU, ROUSSET & O'NEILL, 1998).

Os *primers* utilizados para amplificação do gene *wsp* na espécie *Drosophila buzzatii* foram: 81F (5' TGG TCC AAT AAG TGA AGA AAC) e 522R (5' ACC AGC TTT TGC TTG ATA) (ZHOU, ROUSSET & O'NEILL, 1998). Estes *primers*, geralmente, são utilizados na identificação de linhagens do supergrupo B de *Wolbachia*, resultando em fragmentos de DNA de cerca de 442 pares de bases (ZHOU, ROUSSET & O'NEILL, 1998).

As PCRs foram realizadas nas condições descritas a seguir, tanto para a verificação no "cluster", quanto na espécie *Drosophila buzzatii*, substituindo apenas o *primer* 522R por 691R quando foi feita a análise no "cluster". Inicialmente, em tubos de microcentrífugas, foram adicionados 5 µL de DNA de cada amostra a ser avaliada. Em seguida foram adicionados 4 µL de tampão 5x *colorless* Go Taq® Flexi Buffer (Promega), 2 µL de MgCl₂ mM (Promega), 2,5 µL de mix de dNTPs 2mM (Fermentas), 0,5 µL de *primer* 81F 20mM, 0,5 µL de *primer* 522R 20mM, 0,2 µL de taq DNA polimerase 5U/µL GoTaq® Hot Start Polymerase (Promega), 5,3 µL de água ultrapura, totalizando um volume final de 20 µL para cada reação. Para isto, foi feita uma solução, ou "mix", dos reagentes da PCR, sem o DNA, multiplicando os valores de uma reação pelo número de reações. Posteriormente, 15 µL de mix desses reagentes foi adicionado a cada tubo de microcentrífuga com o DNA previamente adicionado.

Como controle negativo da PCR, foi preparado um tubo com todos os reagentes, exceto DNA, com o objetivo de detectar uma possível contaminação dos reagentes. Para o controle positivo de infecção foi utilizada uma amostra de *D. buzzatii*, N58-2, proveniente da mesma localidade da amostra N58-4 (Tabela 1; Figura 8), devido à detecção de uma infecção mais forte por *Wolbachia* quando comparada aos demais indivíduos analisados nos testes iniciais com amostras das espécies do "cluster" *D. buzzatii*. A amostra foi sequenciada e analisada, passando a ser utilizada como controle positivo para infecções por linhagens do supergrupo B de *Wolbachia*. Todos estes procedimentos foram realizados com os tubos em gelo. Para a PCR, inicialmente, as condições da reação foram definidas de acordo com Zhou *et al.* (1998). Entretanto, as bandas de DNA, quando presentes, apresentavam baixa intensidade em sua coloração, indicando baixa amplificação dos fragmentos de DNA. Assim, optamos por um processo de otimização da PCR, alterando e testando diversas variáveis (concentração de reagentes, número de ciclos e temperatura). Deste modo, as condições iniciais foram mantidas, exceto pelo número de ciclos, que foi alterado de 35 para 40. Este procedimento se mostrou eficiente para melhora na intensidade das bandas de DNA. Sendo assim, as condições da PCR utilizadas neste trabalho foram: 1 ciclo inicial de 2 minutos a 95°C, 40 ciclos de 1 minuto a 94°C (desnaturação do DNA), 1 minuto a 55°C (anelamento de *primers*) e 1 minuto a 72°C (extensão) e, por fim, um ciclo de 5 minutos a 72°C.

3.3 Eletroforese em gel de agarose

Para verificação da PCR, foi preparado um gel de agarose 1%, utilizando 1g de agarose, 100 mL de TBE 1x (Tris-base 0,89M; Ácido Bórico 0,89M; EDTA 20mM) e 10 μL de *SYBR*® *Safe DNA gel stain* (Life Technologies).

Na aplicação das amostras, foi utilizado um tampão de amostra ("*bluejuice*"), contendo reagente de alta densidade, o qual assegura que os fragmentos de DNA da amostra se depositem no fundo do poço do gel por ação gravitacional, e um corante com velocidade de migração conhecida e próxima da velocidade de migração dos fragmentos de DNA, o qual facilita a aplicação das amostras e o monitoramento destas durante a corrida na matriz do gel, do polo negativo em direção ao polo positivo.

Na cuba de eletroforese foi utilizado tampão TBE 1x e foi pipetado no gel de agarose 4 μ L de uma mistura de 2,5 μ L do produto da PCR de cada amostra e 2,5 μ L de tampão de amostra por poço. O 0,5 μ L excedente de produto da PCR e de tampão de amostra foram utilizados para padronizar o volume para 4 μ L por poço, dado que uma parte do volume poderia se perder por evaporação do líquido, devido ao tempo necessário para pipetar todas as amostras.

Além das amostras, também foi utilizado o marcador de massa molecular de DNA *Low DNA Mass Ladder* Invitrogen® para conferir os pesos das bandas obtidas, caso presentes. Foi utilizada uma mistura de 2 μ L de marcador e 2 μ L de tampão de amostra por poço.

A eletroforese foi realizada em 100V, por aproximadamente 1 hora. O DNA no gel foi visualizado por meio da exposição à luz UV em um transiluminador.

3.4 Purificação do DNA amplificado

A purificação do DNA amplificado foi feita com o conjunto de reagentes *GFX PCR and gel band purification kit* (GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante. Nas reações em que foram observadas mais de uma banda, foi preparado um outro gel de agarose 1% (tópico 3.3) a fim de cortar e separar as bandas em tubos de 1,5 mL diferentes, com a ajuda de um estilete esterilizado em álcool e fogo a cada amostra. Ao material retirado dos géis, foram adicionados 500 µL de Capture buffer type 3 a cada tubo, que foi deixado em banho-maria a aproximadamente 60°C por cerca de 1 minuto, até a total dissolução da banda de agarose com o DNA.

Para a purificação do DNA, tubos de microcentrífuga de 1,5 mL foram previamente identificados com o número das amostras. Em cada tubo foram adicionados 17,5 μ L do produto da PCR de cada amostra e, na sequência, foram adicionados 500 μ L de *Capture buffer type 3*. Esta mistura foi agitada em vórtex e centrifugada brevemente. Após estes procedimentos, o líquido (produto da PCR e *Capture buffer type 3*) de cada tubo foi transferido para tubos coletores, previamente identificados com os respectivos números de cada amostra, contendo uma coluna com membrana de filtração. Para que o líquido atravessasse a membrana e o DNA ficasse aderido a ela, os tubos coletores com as colunas foram centrifugados por 30 segundos a 14.000rpm. Após este processo, os tubos coletores foram descartados.

Para limpeza da membrana e purificação do DNA, foram adicionados 500 μ L de *Wash buffer type 1* na coluna de cada tubo coletor. Os tubos foram então centrifugados por 30 segundos a 14.000rpm, para passagem do líquido pela membrana. Após este

processo, as colunas foram removidas cuidadosamente de cada tubo coletor, tomando o cuidado de não encostar a coluna no líquido (*Wash buffer type 1* e resíduos de reagentes da PCR e *Capture buffer type 3*) e foram colocadas em novos tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, previamente identificados com o número de cada amostra.

Foram adicionados, então, a cada coluna, bem no centro de cada membrana, 10 μ L de *Elution buffer type 6*, seguido de incubação por 1 minuto em temperatura ambiente. Este procedimento tem como objetivo eluir o DNA fixado na membrana da coluna. Logo após, os tubos foram centrifugados a 14.000rpm por 1 minuto fazendo com que o líquido (*Elution buffer type 6*) contendo o DNA atravessasse a membrana para o fundo do tubo.

Por fim, as colunas foram descartadas e os tubos de 1,5 mL contendo o DNA purificado foram armazenados em placa refrigeradora, para depois ser feita a quantificação do DNA.

3.5 Sequenciamento de DNA

O sequenciamento foi feito utilizando o serviço de sequenciamento do Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica – CREBIO, UNESP/FCAV, Jaboticabal – SP e Laboratório de Biologia Molecular de Plantas da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP.

Para o envio para o sequenciamento, o DNA purificado de cada amostra foi quantificado com auxilio de NanoDrop ND-1000-V.3 (tópico 4.1). Foram feitas diluições, quando necessário, a fim de padronizar as amostras para a reação de sequenciamento. Para o sequenciamento, foram utilizados os mesmos *primers* da PCR (81F e 552R) para isolamento e amplificação do fragmento de DNA.

3.6 Análises nucleotídicas

A leitura dos cromatogramas, contendo as sequências nucleotídicas dos fragmentos de DNA obtidos de cada amostra, foi feita utilizando os programas "Chromas Lite" versão 2.1.1 (*Copyright*© 1998-2012 Technelysium Pty Ltd). O alinhamento das sequências foi realizado com o programa "ClustalW Multiple alignment" (THOMPSON et al., 1994), implementado no programa "BioEdit Sequence Alignment Editor" (*Copyright*© 1997-2013 Tom Hall) versão 7.2.5 (HALL, 1999). Quando necessário, as sequências foram inspecionadas manualmente.

Para identificação das sequências obtidas em relação às linhagens já descritas para *Wolbachia*, foi feita uma busca em bancos de dados. Para isso, com auxilio de literatura, foi realizada buscas por sequências das diferentes linhagens já descritas para *Wolbachia* a partir do gene *wsp*, tanto no gênero *Drosophila* quanto em outros grupos taxonômicos, no banco de dados NCBI GenBank®, com auxilio do algoritmo BLAST (ALTSCHUL, 1990). Estas sequências foram então incorporadas ao trabalho e alinhadas com o programa MUSCLE versão 3.8.31 (EDGAR, 2004).

As distâncias genéticas, para identificação das linhagens de *Wolbachia* obtidas neste trabalho com as descritas na literatura, foram calculadas de acordo com o modelo Kimura-2-parâmetros (KIMURA, 1980), que considera dois fatores: substituições múltiplas que podem ocorrer em um determinado sítio da sequência e a razão entre transições e transversões. Foi feito um "bootstrap" com 1000 réplicas e valores acima de 50%. A matriz de distância resultante foi utilizada para construção de um dendograma pelo método de "Neighbor-Joining", ou "agrupamento de vizinhos", (SAITOU & NEI, 1987), que permitiu a visualização das relações fenéticas entre as sequências obtidas. Este procedimento foi realizado com o programa MEGA versão 6.06 (TAMURA *et al.*, 2013).

Para uma avaliação das sequências de DNA obtidas neste trabalho, estas foram alinhadas com a sequência nucleotídica do isolado ALB001 de *Wolbachia* (555 pb) em *Pseudacysta perseae* (nº de acesso no banco de dados NCBI GenBank®: JN859608) para determinar o início das trincas de base que codificam aminoácidos. Com auxilio do programa MEGA 6.06 (TAMURA *et al.*, 2013), sequências de aminoácidos foram

preditas a partir das sequências nucleotídicas das amostras de *D. buzzatii*, usando como parâmetro o código de plastídio retirado do banco de dados NCBI GenBank® (nº de acesso da proteína codificada pela sequência obtida do isolado ALB001: AFC98467; códon de iniciação: 2; tabela de tradução 11: código de plastídio). Posteriormente, foi feita uma tabela comparativa das sequências de aminoácidos obtidas e as posições de mudança de aminoácidos (Tabela 2), com o auxílio da tabela de nomenclatura de aminoácidos e peptídios IUPAC-IUB (1984), disponível no banco de dados NCBI.

As análises estatísticas das sequências obtidas foram feitas com o auxílio do programa DnaSP: *DNA Sequence Polymorphism* v 5.1 (LIBRADO & ROZAS, 2009).

4. RESULTADOS & DISCUSSÃO

4.1 Amplificação do DNA

Para a verificação inicial da presença do endossimbionte em todas as espécies do "cluster" *Drosophila buzzatii* (*D. antonietae*, *D. borborema*, *D. buzzatii*, *D. gouveai*, *D. koepterae*, *D. serido* e *D. seriema*), os resultados foram inconclusivos (Figura 9), dado que o controle negativo da PCR apresentou bandas, indicando contaminação dos reagentes. Sendo assim, estes dados não foram analisados.



Figura 9. Fotografia de gel de agarose 1%, com 3,5 segundos de tempo de exposição, mostrando a amplificação por PCR de segmentos de DNA do gene *wsp* de *Wolbachia* em amostras de DNA extraído de espécies do "cluster" *Drosophila buzzatii*, usando os *primers* 81F e 691R. M= marcador de massa molecular *Low DNA Mass Ladder* Invitrogen®, cujas bandas indicam, de cima para baixo, 2.000 pb, 1.200 pb, 800 pb, 400 pb, 200 pb e 100 pb, respectivamente. Poços: 1 e 2=D. *borborema* (N70 e N68); 3 e 4=D. *seriema* (N45.12 e N40.1); 5 e 6=D. *serido* (R32.12 e R32.13); 7 e 8=D. *gouveai* (J78 e J67); 9 e 10= *D. koepterae* (B27 e B20); 11 e 12=D. *buzzatii* (N58.2 e N58.3); 13 e 14=D. *antonietae* (R63.2 e J98.8); 15 e 16= controles positivos de infecção, *D. melanogaster* e *D. willistoni*, respectivamente; 17= controle negativo da PCR.

O resultado desta amplificação (Figura 9) esta em desacordo com o esperado, pois quando há contaminação dos reagentes, todas as amostras apresentam as mesmas bandas que o controle negativo. No entanto, não é o que ocorre, pois a amostra 5 (*D. serido* - R32.12) não apresenta o mesmo padrão de bandas que as demais. Não é possível explicar, neste momento, o que ocorreu neste caso, é possível que não se trate de uma contaminação das soluções estoque ou do mix de reagentes, e sim um erro procedimental de manipulação das amostras.

Contudo, as amostras da espécie *D. buzzatii* apresentaram bandas muito discrepantes das demais bandas geradas por contaminação (Figura 9: amostra 11= N58.2 e 12= N58.3), com fragmentos de aproximadamente 600 pares de bases, sendo a amostra 11= N58.2 tão intensa quanto os controles positivos utilizados, indicando infecção por *Wolbachia*.

Para a verificação da presença de *Wolbachia* na espécie *Drosophila buzzatii*, foram amplificados fragmentos de aproximadamente 400 pares de bases nas amostras da espécie *Drosophila buzzatii*, indicando a presença de *Wolbachia*. Para as análises populacionais em *Drosophila buzzatii*, considerando as bandas de DNA e seus pesos moleculares, as amostras viáveis selecionadas para análises posteriores foram: 2, 6, 7, 8, 9 e 21 (Tabela 1; Figura 10). As concentrações do DNA destas amostras, após purificação (tópico 3.4), foram as seguintes: 2= 5,1 ng/µL; 6= 6,2 ng/µL; 7= 13,8ng/µL; 8= 5,3 ng/µL; 9= 5,0 ng/µL; 21= 11,9 ng/µL, += 31,8 ng/µL. Como estas concentrações são consideradas suficientes, estas amostras foram enviadas para sequenciamento.



Figura 10. Fotografia de gel de agarose 1%, com 3,5 segundos de tempo de exposição, mostrando a amplificação por PCR de segmentos de DNA do gene *wsp* de *Wolbachia* em amostras de DNA extraído de *Drosophila buzzatii*, usando os *primers* 81F e 522R. M= marcador de massa molecular *Low DNA Mass Ladder* Invitrogen®, cujas bandas indicam, de cima para baixo, 2.000 pb, 1.200 pb, 800 pb, 400 pb, 200 pb e 100 pb, respectivamente; Poços 1 a 22 = amostras de DNA de *Drosophila buzzatii* (Tabela 1); + = controle positivo de infecção; - = controle negativo da PCR.

As bandas obtidas a partir da amostra 3 (Figura 10) são relativamente muito fracas e possuem tamanhos de fragmento fora do esperado para as linhagens B de *Wolbachia* (cerca de 400 pares de bases), por isso não foram utilizadas para sequenciamento. Além disso, é importante ressaltar que não é possível afirmar que as amostras nas quais não apareceram bandas não estão infectadas por *Wolbachia*. Já foi relatado na literatura que a detecção de *Wolbachia* por PCR padrão pode gerar falso negativo, possivelmente pela interferência do DNA do hospedeiro (JEYAPRAKASH & HOY, 2000) ou pela baixa densidade deste endossimbionte nos tecidos (MILLER, EHRMAN & SCHNEIDER, 2010).

Quanto às amostras sequenciadas (Figura 10: 2, 6, 7, 8, 9 e 21), as bandas obtidas foram muito fracas. Este resultado pode indicar baixa densidade de infecção que, devido à técnica utilizada, não permite continuar os procedimentos do trabalho para identificação das eventuais linhagens de *Wolbachia*.

Para a identificação de *Wolbachia* com maior precisão, são necessários experimentos com maior tamanho amostral e testes com outros métodos mais eficientes de detecção. Dado que *Wolbachia* é encontrada principalmente nos tecidos reprodutivos (DOBSON *et al.*, 1999), a extração de genitálias pode melhorar os resultados de amplificação. Além disso, existem métodos alternativos à PCR padrão, alguns deles mais sensíveis para a o diagnóstico de infecção por *Wolbachia* (MÜLLER, 2013). Experimentos como hibridação de membrana (*Dot-blot*) (BOURTZIS *et al.*, 1996), *Long* PCR (JEYAPRAKASH & HOY, 2000), *Real-time* PCR (SIMONCINI *et al.*, 2001), *Southern blot* (MILLER & RIEGLER, 2006), *Nested* PCR (SUN, CUI & LI, 2007), microscopia de imunofluorescência (CASPER-LINDLEY *et al.*, 2011) e qPCR/*HRM* (*High Resolution Melting*) (LEE *et al.*, 2012) têm sido empregados no diagnóstico de infecção.

Os *primers* escolhidos são muito específicos, pois amplificam somente linhagens do supergrupo B, assim, este é um fator que limitou a detecção desta bactéria. Além das técnicas e *primers* escolhidos, diversos fatores podem afetar a densidade de infecção por *Wolbachia* (BERTICAT *et al.*, 2002). Fatores ambientais, tais como temperatura, tipo de alimentação ou densidade de criação (estoque) de insetos hospedeiros afetam a densidade de *Wolbachia* no indivíduo hospedeiro e na transmissão deste endossimbionte para a prole (HOFFMANN, TURELLI & HARSHMAN, 1990; SINKINS, BRAIG & O'NEILL, 1995). Considerando que neste trabalho cada amostra é equivalente a extração de DNA de apenas um indivíduo, e que este indivíduo é proveniente diretamente da natureza, esta poderia ser uma explicação para os baixos níveis de infecção identificados através da amplificação de DNA.

Ademais, a baixa expressão de incompatibilidade citoplasmática pode diminuir a densidade de infecção em machos (CLANCY & HOFFMANN, 1998; SINKINS, BRAIG & O'NEILL, 1995; NODA *et al.*, 2001). Dado que não foi realizado um estudo de identificação das linhagens dos isolados de *Wolbachia* obtidos, ainda não é possível saber se estes podem induzir incompatibilidade citoplasmática em *D. buzzatti*. Deste modo, ainda não é possível saber quais implicações a incompatibilidade citoplasmática

4.2 Estatística descritiva

Os resultados do sequenciamento foram inconclusivas para a amostra 8 [J66.1] (Tabela 1; Figura 10), dado que o cromatograma não apresentou dados consistentes para análise. Desta forma, as amostras de *D. buzzatti* analisadas foram 2 [CRN16], 6 [J21.1], 7 [J27.3], 9 [J78.5], 21 [N58.4] (Tabela 1; Figura 10) e o controle positivo + [N58.2] (item 3.2). O alinhamento destas sequências é mostrado na Figura 11. Sendo assim, das 23 amostras analisadas (as 22 amostras e o controle positivo), foi encontrada uma frequência de 26% de infecção por *Wolbachia* em *Drosophila buzzatii* utilizando o método de PCR padrão, o que corrobora dados da literatura, visto que a frequência de infecção na literatura para este método de amplificação é de cerca de 20% (WERREN, WINDSOR & GUO, 1995; WERREN & WINDSOR, 2000).

Dentre as seis sequências de *D. buzzatti*, foram obtidas duas sequências nucleotídicas distintas. A sequência da amostra J78.5 (Figura 11) é idêntica ao isolado GD13101, descrita para o organismo *Culex quinquefasciatus* (n° de acesso GenBank: KJ140129) e também à linhagem *w*No de *Drosophila simulans* (n° de acesso GenBank: AF020074), podendo ser descrita como pertencente ao supergrupo B. As sequências das amostras CRN16, J21.1, J27.3, N58.2 e N58.4 (Figura 11) são mais semelhantes ao isolado ALB001 identificada em *Pseudacysta perseae* (n° de acesso GenBank®: JN859608). Porém, este isolado ainda não foi classificado como linhagem nem inserido oficialmente em algum supergrupo da espécie *Wolbachia pipientis*.

[1 111111112 222222223 333333334 444444445 555555556 6666666667 777777778] Γ 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890] #Drosophila buzzatii [N58.2] ACAAAAGTTG ATGGTATTAC AAATGCAAAA GATAAAGAAA AGGATAGTCC CTTAACAAGA TCTTTTATAG CTGGTGGTGG #Drosophila buzzatii [CRN16] #Drosophila buzzatii [J27.3] #Drosophila buzzatii [N58.4] #Drosophila buzzatii [J21.1] #Drosophila buzzatii [J78.5]G.A... .C...C....GA .T..AA.... .GA.CC...G TTC..GA... T....A.GC.G.C

 [
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1
 1

Figura 11. Alinhamento contendo seis sequências do gene *wsp* das linhagens de *Wolbahia* encontradas na espécie *Drosophila buzzatii* (Tabela 1). N58.2: MG/Brasil; CRN16: La Cruz/Argentina; J27.3: RS/Brasil; N58.4: MG/Brasil; J21.1: SP/Brasil; J78.5: BA/Brasil.

46

]	1111111111	1111111111	1111111111	1111111112	2222222222	2222222222	2222222222	222222222]
]	6666666667	777777778	8888888889	99999999990	000000001	1111111112	222222223	333333333]
]	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890]
#Drosophila_buzzatii_[N58.2]	GTA-GATACT	T-CTGAAACA	AATGTTGCAG	ACAGTTTAAC	AGCATTTTCA	GGATTGGTTA	ACGTTTATTA	TGATATAGCG
#Drosophila_buzzatii_[CRN16]								
#Drosophila_buzzatii_[J27.3]								
#Drosophila_buzzatii_[N58.4]								
#Drosophila_buzzatii_[J21.1]							C.	
#Drosophila_buzzatii_[J78.5]	GCA.C.T.	.ACC	.CA	G.GG.				C
]	2222222222	2222222222	2222222222	2222222222	2222222222	2222222223	33333333333	33333]
]	444444445	555555556	6666666667	777777778	8888888889	99999999990	000000001	11111]
[1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	12345]
#Drosophila_buzzatii_[N58.2]	ATTGAAGATA	TGCCTATCAC	TCCATACGTT	GGTGTTGGTG	TTGGTGCAGC	ATATATCAGC	AATCCTTCAA	AAGCT
#Drosophila_buzzatii_[CRN16]								
#Drosophila_buzzatii_[J27.3]								
#Drosophila_buzzatii_[N58.4]								
#Drosophila_buzzatii_[J21.1]						A.		
#Drosophila_buzzatii_[J78.5]				N	NNNNNNNNN	NNNNNNNNN	NNNNNNNNN	NNNNN
Figura 11. Continuação.								

Foram sequenciados fragmentos com cerca de 315 pares de bases a partir do gene *wsp* de *Wolbachia* presente nestas seis amostras de *Drosophila buzzatii*, apresentando 56 sítios polimórficos e 3 haplótipos (ou "isolados"), sendo que um deles é referente à sequência obtida a partir de J78.5 (BA/Brasil), o segundo foi obtido a partir das amostras CRN16 (La Cruz/Argentina), J27.3 (RS/Brasil), N58.2 (MG/Brasil) e N58.4 (MG/Brasil) e o terceiro haplótipo é referente à sequência de J21.1 (SP/Brasil). A proporção de bases encontradas nas sequências foi em média: T = 31,1%, C= 14,2%, A= 32,5% e G=22,2%. Neste trabalho, o terceiro haplótipo (obtido de J21.1) é considerado uma variação do segundo haplótipo, dado que há apenas três nucleotídeos diferentes em uma sequência de 315 nucleotídios (0,95% de diferença). Para saber se esta diferença é real, já que pode ser um erro de sequenciamento, um novo sequenciamento deveria ser feito.

Para uma avaliação das sequências do gene *wsp*, estas foram traduzidas em sequências de aminoácidos, que geraram duas proteínas distintas (Tabela 2) de 104 aminoácidos (Figura 12). Pode ser observado que, nesta região específica da proteína codificada pelo gene *wsp*, ou seja, a região utilizada para identificar linhagens do supergrupo B de *Wolbachia*, houve variação de quase 28% (29 mudanças em uma sequência de 104 aminoácidos) entre as duas sequências obtidas, indicando que elas são significativamente distintas.

[1	1111111112	222222223	3333333334	444444445	555555556	6666666667]
[1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890]
#Drosophila_buzzatii_N58.2	TKVDGITNAK	DKEKDSPLTR	SFIAGGGAFG	YKMDDIRVDV	EGLYSQLAKD	TA?S?IL?ET	NVADSLTAFS	
#Drosophila_buzzatii_CRN16						?.??		
#Drosophila_buzzatii_J27.3						?.??		
#Drosophila_buzzatii_N58.4						?.??		
#Drosophila_buzzatii_J21.1	A					?.??		
#Drosophila_buzzatii_J78.5	.RIEYK.	GT.VHDKA	MA		N.N	DVSGATFTP.	TN.VA	

[1	1111]
[777777778	8888888889	99999999990	0000]
[1234567890	1234567890	1234567890	1234]
#Drosophila_buzzatii_N58.2	GLVNVYYDIA	IEDMPITPYV	GVGVGAAYIS	NPSK
#Drosophila_buzzatii_CRN16				
#Drosophila_buzzatii_J27.3			.?	
#Drosophila_buzzatii_N58.4				
#Drosophila_buzzatii_J21.1	H		N	
#Drosophila_buzzatii_J78.5			????????	????

Figura 12. Alinhamento contendo seis sequências de aminoácidos preditos a partir das sequências de nucleotídeos (Figura 11) das linhagens de *Wolbahia* encontradas na espécie *Drosophila buzzatii* (Tabela 1). N58.2: MG/Brasil; CRN16: La Cruz/Argentina; J27.3: RS/Brasil; N58.4: MG/Brasil; J21.1: SP/Brasil; J78.5: BA/Brasil.

4.3 Relações fenéticas entre as sequências do gene wsp obtidas

Para identificar as sequências obtidas em supergrupos, foi realizada uma análise de relações fenéticas usando sequências do gene *wsp* disponíveis no banco de dados NCBI GenBank®, cujas linhagens já foram previamente descritas na literatura como representantes de um dado supergrupo. Foi incluso o isolado de *Pseudacysta perseae*, pois era a sequência mais semelhante às amostras analisadas neste trabalho, com exceção da amostra J78.5. Além disso, todas as sequências distintas do gene *wsp*, disponíveis até o momento, identificadas em *Drosophila* foram adicionadas a fim de analisar a distribuição de *Wolbachia* em *Drosophila*. Os únicos dados comparáveis foram os obtidos para os supergrupos A, B, C, D, F e G, pois foram os únicos representantes previamente descritos na literatura disponíveis com sequências do gene *wsp*, os demais estudos acerca dos supergrupos utilizam outros genes, como o *ftsZ* e o *16S rRNA*.

A figura 13 mostra as relações fenéticas, geradas com bootstrap superior a 50% (1000 réplicas), para as sequências do gene *wsp* de *Wolbachia* (presente em amostras de *Drosophila buzzatii*) obtidas neste trabalho e sequências do mesmo gene de outras linhagens de *Wolbachia* obtidas da literatura. A figura mostra a presença de duas linhagens distintas em *D. buzzatii*. A sequência nucleotídica da amostra J78.5 em *D. buzzatii* é agrupada com linhagens de *Culex pipiens* (n° de acesso GenBank®: AF020061), *D. pseudoananassae* (n° de acesso GenBank®: DQ412108), *D. mauritiana* (n° de acesso GenBank®: DQ235413), *D. simulans* (n°s de acesso GenBank®: AF020074 e AF020069) e *Aedes albopictus* (n° de acesso GenBank®: AF020059) do supergrupo B. Já as sequências nucleotídicas das amostras e CRN16, J21.1, J27.3, N58.2 e N58.4 são agrupadas em outro grupo, isolado com *Pseudacysta perseae* (n° de acesso GenBank®: JN859608).

A linhagem previamente descrita como pertencente ao supergrupo A escolhida como parâmetro para as análises foi a *w*Mel (*D. melanogaster*) (ELLEGAARD *et al.*, 2013) e formou um grupo coeso com os isolados e linhagens identificados nos hospedeiros do gênero *Drosophila: D. paulistorum, D. septentriosaltans, D. munda, D. testacea, D. neotestacea, D. ambigua, D. equinoxialis, D. prosaltans, D. innubila, D. recens, D. tristis, D. orientacea, D. borealis, D. teissieri, D. arawakana, D. willistoni e*

D. tropicalis. Este foi o maior agrupamento para o gênero, indicando que há prevalência das linhagens do supergrupo A em *Drosophila*.

Outro representante do supergrupo A escolhido foi a linhagem *w*Ri (*D. simulans*) (ELLEGAARD *et al.*, 2013). Porém, esta agrupou com os isolados em *D. suzukii*, *D. ananassae* e *D. quadraria* em um grupo separado do maior grupo do supergrupo A por dois outros agrupamentos, um deles formado por *D. takahashii*, *D. pseudotakahashii* e *D. bifasciata* e outro grupo formado por *D. baimaii* e *D. relima*.

O último representante escolhido para o supergrupo A foi a linhagem *w*Ha (*D. sechellia*) (ELLEGAARD *et al.*, 2013). Esta linhagem se agrupou com um suposto representante do supergrupo G, encontrado em *Dysdera erythrina* (BALDO & WERREN, 2007). Além disso, os outros dois representantes do suposto supergrupo G, encontrados em *Diaea circumlita* e *Poecilopachys australasiae* (BALDO & WERREN, 2007), ficaram completamente isolados, o que confirma dados da literatura, que excluem o supergrupo G por se tratar de um recombinante (BALDO & WERREN, 2007).

Os representantes escolhidos para o supergrupo B foram as linhagens *w*Pip (*Culex pipiens*), *w*No (*D. simulans*) e *w*AlbB (*Aedes albopictus*) (ELLEGAARD *et al.*, 2013). Estes formaram um grupo coeso com as linhagens *w*Mau (*D. mauritiana*), *w*Ma (*D. simulans*), *w*Pana (*D. pseudoananassae*) e o isolado da amostra J78.5 de *D. buzzatii*.

Os representantes escolhidos para o supergrupo C foram os nematoides filariais *Ochocerca ochengi, O. gibsoni* e *Dirofilaria immitis* (AUGUSTINOS *et al.*, 2011). Para o supergrupo D, foram escolhidos os nematoides filariais *Wuchereria bancrofti* e *Brugia malayi* (AUGUSTINOS *et al.*, 2011). E o supergrupo F foi composto por *Cimex lectularius* (cimídio), *Coptotermes lacteus* e *Coptotermes acinaciformis* (cupins) (SALUNKE *et al.*, 2010). Os dados obtidos a partir do dendograma (Figura 13) são congruentes com os dados da literatura, pois os representantes escolhidos se agruparam em seus respectivos supergrupos.



Figura 13. Dendograma gerado por "neighbor-joining" mostrando as relações fenéticas entre as sequências obtidas para o gene *wsp* em isolados de *Drosophila buzzatii* e representantes dos supergrupos de *Wolbachia*, obtidos do NCBI GenBank®. Na lateral são representados os supergrupos aos quais as linhagens pertencem. Os números na base de cada ramo representam os valores de bootstrap maiores que 50% (1000 réplicas). As amostras estão identificadas como: número de acesso| espécie hospedeira (linhagem). As amostras analisadas neste trabalho estão identificadas como: *Drosophila buzzatii* [identificação da amostra]. Amostras que não foram identificadas em nenhum supergrupo não foram classificadas na literatura.

Diversos isolados em *Drosophila* ainda não descritos na literatura formaram alguns grupos, entre eles um grande grupo a parte dos demais, no qual se insere o agrupamento das amostras CRN16, J21.1, J27.3, N58.2 e N58.4 e *Pseudacysta perseae*. Isto pode significar que estes isolados em CRN16, J21.1, J27.3, N58.2 e N58.4 e *Pseudacysta perseae* pertencem à uma linhagem nova ou podem ser recombinantes. No caso de não se tratar de recombinação, poderiam até mesmo tratar-se de um novo supergrupo. Entretanto, as análises feitas neste trabalho não permitem inferir nada sobre as relações filogenéticas entre estes isolados e mais estudos são necessários a fim de elucidar essas questões.

Dado que no gênero *Drosophila* é mais comum encontrar linhagens do supergrupo A de *Wolbachia* e seus recombinantes, sendo *D. simulans*, *D. pseudoananassae* e *D. mauritiana* as únicas exceções que apresentam infecção por linhagens do supergrupo B descritas até o momento (Figura 13), é um dado interessante a se acrescentar na literatura que haja infecção por linhagens do supergrupo B em *D. buzzatii*, pois isto amplia as possibilidades de pesquisas acerca das interações entre estes organismos e os efeitos fenotípicos envolvidos no gênero *Drosophila*.

A partir das sequências de DNA obtidas para o gene *wsp*, foram preditas proteínas com 104 aminoácidos. Foram geradas duas sequências de aminoácidos distintas, com 29 aminoácidos diferentes (Tabela 2).

Tabela 2. Posições divergentes entre as sequências de aminoácidos obtidas a partir das sequências nucleotídicas do gene wsp de Wolbachia em Drosophila buzzatii. Os números indicam a posição em que ocorreu a mudança, a coluna de aminoácidos à esquerda se refere à primeira sequência (J78.5) e a coluna à direita indica a segunda sequência obtida (CRN16, J21.1, J27.3, N58.2 e N58.4).

Posição	Aminoácidos				
2	Arginina	\rightarrow	Lisina		
3	Isoleucina	\rightarrow	Valina		
7	Glutamato	\rightarrow	Treonina		
8	Tirosina	\rightarrow	Asparagina		
9	Lisina	\rightarrow	Alanina		
11	Glicina	\rightarrow	Aspartato		
12	Treonina	\rightarrow	Lisina		
14	Valina	\rightarrow	Lisina		
15	Histidina	\rightarrow	Aspartato		
16	Aspartato	\rightarrow	Serina		
19	Lisina	\rightarrow	Treonina		
20	Alanina	\rightarrow	Arginina		
23	Metionina	\rightarrow	Isoleucina		
27	Alanina	\rightarrow	Glicina		
48	Asparagina	\rightarrow	Alanina		
50	Asparagina	\rightarrow	Aspartato		
51	Aspartato	\rightarrow	Treonina		
52	Valina	\rightarrow	Alanina		
53	Serina	\rightarrow	?		
54	Glicina	\rightarrow	Serina		
55	Alanina	\rightarrow	?		
56	Treonina	\rightarrow	Isoleucina		
57	Fenilalanina	\rightarrow	Leucina		
58	Treonina	\rightarrow	?		
59	Prolina	\rightarrow	Glutamato		
61	Treonina	\rightarrow	Asparagina		
64	Asparagina	\rightarrow	Aspartato		
66	Valina	\rightarrow	Leucina		
67	Alanina	\rightarrow	Treonina		

A primeira sequência foi gerada a partir da amostra J78.5, que é idêntica à linhagem previamente descrita como pertencente ao supergrupo B, como wNo de D. simulans, sendo comparável com dados da literatura. A segunda sequência de aminoácidos foi descrita a partir das amostras CRN16, J21.1, J27.3, N58.2 e N58.4, que são idênticas à sequência de *Pseudacysta perseae*, exceto pela amostra J21.1, que possui mudanças de aminoácidos nas posições: 7, Treonina \rightarrow Alanina; 77, Tirosina \rightarrow Histidina; 100, Serina \rightarrow Asparagina.

A sequência de aminoácido predita para o isolado J78.5 possui três aminoácidos a mais em comparação as obtidas a partir do outros isolados de *D.buzzatii*, cujas lacunas foram preenchidas pelo símbolo de interrogação "?". Entretanto, a duas sequências codificam a proteína de membrana *wsp*, de acordo com a literatura, o que significa ser uma variação e não uma proteína não funcional.

Esta variação entre as linhagens é esperada, pois de acordo com o trabalho de Zhou *et al.* (1998), a sequência do gene *wsp* é altamente variável e por isso pode ser utilizada para a identificação de diferentes linhagens de *Wolbachia*. A comparação entre as sequências do gene *wsp* amplificadas por PCR mostra uma divergência de 23% entre os grupos analisados, quase dez vezes maior do que a divergência encontrada nas sequências do gene *16S rRNA* de *Wolbachia* (ZHOU, ROUSSET & O'NEILL, 1998; O'NEILL *et al.*, 1992; ROUSSET, VAUTRIN & SOLIGNAC, 1992).

5. CONCLUSÃO

As principais conclusões do trabalho são:

- Na espécie *Drosophila buzzatii* existem populações cujos indivíduos estão infectados com o endossimbionte *Wolbachia*, mas a densidade de infecção encontrada é baixa;
- Drosophila buzzatti está infectada por pelo menos dois isolados de Wolbachia pertencentes ao supergrupo B, um deles é semelhante à linhagem wNo e o outro semelhante ao isolado ALB001.
- As proteínas preditas a partir das sequências obtidas do gene *wsp* para amostras de populações de *Drosophila buzzatti* são diferentes em termos de composição de aminoácidos.
- Drosophila buzzatii é hospedeira de linhagens de Wolbachia que não são frequentemente observadas entre espécies do gênero Drosophila, dado que muitas das espécies do gênero estão infectadas por linhagens do supergrupo A;
- Existem muitas linhagens de Wolbachia em Drosophila sp. que não se agrupam em nenhum dos supergrupos mais comuns em artrópodes, A e B, inclusive um dos isolados obtidos em Drosophila buzzatii. É necessário um estudo acerca das relações filogenéticas entre estas linhagens a fim de saber se são recombinantes ou talvez um novo supergrupo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J. **Biologia molecular da célula**. Editora Artmed, 5^a edição, 2009.

ALTSCHUL, S.F. *et al.* Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990.

ARAKAKI, N.; MIYOSHI, T.; NODA, H. *Wolbachia* mediated parthenogenesis in the predatory thrips *Franklinothrips vespiformis* (Thysanoptera: Insecta). **Proc. R. Soc.** Lond., *B* 268, 1011–1016, 2001.

ARCHIBALD, J. M. The Puzzle of Plastid Evolution. **Current Biology**, 19 (2): R81–8, 2009.

AUGUSTINOS, A. A. *et al.* Detection and characterization of *Wolbachia* infections in natural populations of Aphids: is the hidden diversity fully unraveled? **PLoS One**, 6: e28695, 2011.

BALDO, L. *et al. Wolbachia* are present in Southern African scorpions and cluster with supergroup F. **Curr. Microbiol.**, 55:367–373, 2007.

BALDO, L.; WERREN, J. H. Revisiting *Wolbachia* supergroup typing based on *wsp*: spurious lineages and discordance with MLST. **Curr. Microbiol**., 55:81–87, 2007.

BALL, S. *et al.* The evolution of glycogen and starch metabolism in eukaryotes gives molecular clues to understand the stablishment of plastid endosymbiosis. **Journal of Experimental Botany**, 62 (6): 1775-801, 2011.

BANDI, C. T. J. *et al.* Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. **Proc. R. Soc.** Lond. B, 265:2407–2413, 1998.

BARKER, J. S. F. *et al.* Allozyme and chromosomal polymorphism of *Drosophila buzzatii* in Brazil and Argentina. **Genética**, 67:161-170, 1985.

BERTICAT, C. *et al.* High *Wolbachia* density in insecticide-resistant mosquitoes. Proc.Biol. Sci., 269: 1413-1416, 2002.

BING, X. L. *et al.* Diversity and evolution of the *Wolbachia* endosymbionts of Bemisia (Hemiptera: Aleyrodidae) whiteflies. **Ecol Evol.**, 4(13):2714-37, 2014.

BIZZO, N. M. V. Estudos sobre a biologia e isolamento reprodutivo em Drosophila serido. 1983. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Dept. de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Brasil, 1983.

BREEUWER, J. A. J. *et al.*, Phylogeny of cytoplasmic incompatibility micro-organisms in the parasitoid wasp genus *Nasonia* (Hymenoptera: Pteromalidae) based on 16S ribosomal DNA sequences. **Insect Mol. Biol.**, 1:25–36, 1992.

BORDENSTEIN, S.; ROSENGAUS, R. B. Discovery of a novel *Wolbachia* supergroup in Isoptera. **Curr. Microbiol.**, 51:393–398, 2005.

BOURTZIS, K. *et al. Wolbachia* infection and cytoplasmic incomapatibility in *Drosophila* species. **Genetics**, 144: 1063-1073, 1996.

BOURTZIS, K. *Wolbachia*-based technologies for insect pest population control. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 627, 104–113, 2008.

CAMPBELL, N. A.; REECE, J. B. Biology. Pearson Education Inc., 2009.

CANN, R. L.; STONEKING, M.; WILSON, A. C. Mitochondrial DNA and human evolution. **Nature**, 325: 31-36, 1987.

CASIRAGHI, M. *et al.* 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 the *Wolbachia* tree. **Microbiology**, 151:4015–4022, 2005.

CASPER-LINDLEY, C. *et al.* Rapid fluorescence-based screening for *Wolbachia* endosymbionts in *Drosophila* germ line and somatic tissues. **Appl. Environ. Microbiol.**, 77: 4788-4794, 2011.

CASTRO, J. A.; PICORNELL, A.; RAMON, M. Mitochondrial DNA: a tool for populational genetics studies. **Int Microbiol.**, 1 (4): 327–32, 1998.

CHAAL, B. K; GREEN, B. R. Protein import pathways in "complex" chloroplasts derived from secondary endosymbiosis involving a red algal ancestor. **Plant Molecular Biology**, 57 (3): 333-42, 2005.

CHARLAT, S. *et al.* Male-killing bacteria trigger a cycle of increasing male fatigue and female promiscuity. **Curr.Biol.**, 17, 273–277, 2007.

CLANSY, D. J.; HOFFMAN, A. A. Environmental effects on cytoplasmic incompatibility and bacterial load in *Wolbachia*-infected *Drosophila simulans*. **Entomol. Exp. Applicata**, 86, 13-14, 1998.

COVACIN, C.; BARKER, S. C. Supergroup F *Wolbachia* bacteria parasitise lice (Insecta: Phthiraptera). **Parasitol. Res**., 100:479–485, 2007.

DE BRITO, R. A.; MANFRIN, M. H.; SENE, F. M. Mitochondrial DNA phylogeography of Brazilian populations of *Drosophila buzzatii*. Genetics and Molecular Biology, 25 (2):161-171, 2002.

DE BRITO, R. A.; MANFRIN, M. H.; SENE, F. M. Nested cladistic analysis of Brazilian populations of *Drosophila serido*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 22 (1):131-143, 2002.

DOBSON, S. L. *et al. Wolbachia* infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 29: 153-160, 1999.

DUNN, A. K.; STABB, E. V. Culture-independent characterization of the microbiota of the ant lion *Myrmeleon mobilis* (Neuroptera: Myrmeleontidae). **Appl. Environ. Microbiol.**, 71:8784–8794, 2005.

DURON, O. *et al.* The diversity of reproductive parasites among arthropods: *Wolbachia* do not walk alone. **BMC Biology**, 6: 27, 2008.

DYER, K. A.; JAENIKE, J. Evolutionarily stable infection by a male-killing endosymbiont in *Drosophila innubila*: molecular evidence from the host and parasite genomes. **Genetics**, 168, 1443–1455, 2004.

EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Res., 32(5):1792-1797, 2004.

ELLEGAARD, K. M. *et al.* Comparative genomics of Wolbachia and the bacterial species concept. **PLoS Genet. 9**, e1003381, 2013.

EMELYANOV, V. V. Rickettsiaceae, rickettsia-like endosymbionts, and the origin of mitochondria. **Biosci. Rep.**, 21 (1): 1-17, 2001.

FANARA, J.J.; HASSON, E. Oviposition acceptance and fecundity schedule in the cactophilic sibling species *Drosophila buzzatii* and *D. koepferae* on their natural hosts. **Evolution**, 55: 2615–2619, 2001.

FENG, D. F.; CHO, G.; DOOLITTLE, R. F. Determining divergence times with a protein clock: update and reevaluation. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 94 (24): 13028-13033, 1997.

FIALHO, R. F.; STEVENS, L. Male-killing *Wolbachia* in a flour beetle. **Proc. R. Soc.** Lond. B, 267, 1469–1473, 2000.

FRANCO, F. F. *et al.* Conservation of pBuM-2 satellite DNA sequences among geographically isolated *Drosophila gouveai* populations from Brazil. **Genética**, 128 (1-3): 287-295, 2006.

FRANCO, F. F. História evolutiva do "cluster" *Drosophila buzzatii* (grupo *D. repleta*): eventos históricos e diversificação de espécies no Brasil. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2009.

FRANCO, F. *et al.* Intra- and interspecific divergence in the nuclear sequences of the clock gene period in species of the *Drosophila buzzatii* cluster. Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research, 48 (4):322-331, 2010.

FRANCO, F. F.; MANFRIN, M. H. Recent demographic history of cactophilic *Drosophila* species can be related to Quaternary palaeoclimatic changes in South America. J. Biogeogr., 40: 142–154 2013.

GARRIGAN, D.; HAMMER, M. F. Reconstructing human origins in the genomic era. **Nature Reviews Genetics**, 7 (9): 669–80, 2006.

GOTTLIEB, Y. *et al.* Diploidy restoration in *Wolbachia*-infected *Muscidifurax uniraptor* (Hymenoptera: Pteromalidae). J. Invertebr. Pathol., 81, 166–174, 2002.

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

HEATH, B. D. *et al.* Horizontal transfer of *Wolbachia* between phylogenetically distant insect species by a naturally occurring mechanism. **Current Biology**, 9: 313-316, 1999.

HERTIG, M. The rickettsia, *Wolbachia pipientis* (gen. et sp. N.) and associated inclusions of the mosquito *Culex pipiens*. **Parasitology**, 28: 453-86, 1936.

HERTIG, M.; WOLBACH, S.B. Studies on rickettsia-like microorganisms in insects. J. Med. Res., 44:329-74, 1924.

HILGENBOECKER, K. *et al.* How many species are infected with *Wolbachia*? - A statistical analysis of current data. **FEMS Microbiology Letters**, 281: 215–220, 2008.

HIROKI, M. *et al.* Feminization of genetic males by a symbiotic bacterium in a butterfly, *Eurema hecabe* (Lepidoptera: Pieridae). **Naturwissenschaften**, 89, 167–170, 2002.

HOFFMANN, A. A.; TURELLI, M.; HARSHMAN, L. G. Factors affecting the distribution of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*. **Genetics**, 126, 933-948, 1990.

HOTOPP, J. C. D. *et al.* Comparative genomics of emerging human ehrlichiosis agents. **PLoS Genet.**, 2: 21, 2006.

HOTOPP, J. C. D. *et al.* Widespread lateral gene transfer from intracellular bacteria to multicellular eukaryotes. **Science**, 317: 1753-1756, 2007.

IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature. Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides. **Eur. J. Biochem.**, 138:9-37, 1984.

JAMES, A. C. *et al.* Dynamics of double and single *Wolbachia* infections in *Drosophila simulans* from New Caledonia. **Heredity**, 88, 182–189, 2002.

JEYAPRAKASH, A.; HOY, M. A. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: *wsp* sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. **Insect Mol. Biol.**, 9: 393–405, 2000.

JIGGINS, F. M. *et al.* Two male-killing *Wolbachia* strains coexist within a population of the butterfly *Acraea encedon*. **Heredity**, 86, 161–166, 2001.

KAGEYAMA, D. *et al.* Feminizing *Wolbachia* in an insect, *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Heredity**, 88, 444–449, 2002.

KAGEYAMA, D.; TRAUT, W. Opposite sex-specific effects of *Wolbachia* and interference with the sex determination of its host *Ostrinia scapulalis*. **Proc. R. Soc.** Lond. B, 271, 251–258, 2004.

KEELING, P. J. Diversity and evolutionary history of plastids and their hosts. **American Journal of Botany**, 91 (10): 1481-93, 2004.

KEELING, P. J. The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids.Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 365 (1541): 729-48, 2010.

KHANNA, P. Essentials of Genetics. I. K. International Pvt Ltd, 2010.

KIM, E.; ARCHIBALD, J. M. Diversity and Evolution of Plastids and Their Genomes.In Sandelius, Anna Stina; Aronsson, Henrik. The Chloroplast. Plant Cell Monographs, 13. pp. 1–39, 2009.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, 16 (2): 111–120, 1980.

KUMAR, K.; MELLA-HERRERA, R. A; GOLDEN, J. M. Cyanobacterial heterocysts. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 2 (4): a000315, 2010.

KUTSCHERA, U.; NIKLAS, K. J. Endosymbiosis, cell evolution, and speciation. **Theory in Biosciences**, 124:1-24, 2005.

LANDMANN, F. *et al.* Co-evolution between an endosymbiont and its nematode host: *Wolbachia* asymmetric posterior localization and AP polarity establishment. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, 8(8): e3096, 2014. LASSY, C. W.; KARR, T. L. Cytological analysis of fertilization and early embryonic development in incompatible crosses of *Drosophila simulans*. **Mech. Dev**., 57, 47–58, 1996.

LEE, S. F. *et al.* High-throughput PCR assays to monitor *Wolbachia* infection in the dengue mosquito (*Aedes aegypti*) and *Drosophila simulans*. Appl. Environ. Microbiol., 78(13): 4740-4743, 2012.

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

LO, N. *et al.* How many *Wolbachia* supergroups exist? **Mol. Biol. Evol.**, 19:341–346, 2002.

LO, N. *et al.* Taxonomic status of the intracellular bacterium *Wolbachia pipientis*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 57: 654–657, 2007.

LORETO, E. L. S.; CARARETO, C. M. A.; CAPY, P. Revisiting horizontal transfer of transposable elements in *Drosophila*. **Heredity**, 100: 545-554, 2008.

MACHADO, L. P. de B.; CASTRO, J. P. de; MADI-RAVAZZI, L. Evaluation of the courtship and of the hybrid male sterility among *Drosophila buzzatii* cluster species (Diptera, Drosophilidae). **Braz. J. Biol.**, 62(4A): 601-608, 2002.

MADI-RAVAZZI, L.; BICUDO, H. E. M. C. Differentiation of *Drosophila serido* (isofemale line A95F3) and *D. koepferae* (isofemale line B20D2) reproductive isolation, development time and polytene chromosome banding patterns. **Rev. Bras. Gen.**, 15: 831-851, 1992.

MADI-RAVAZZI, L.; BICUDO, H. E. M. C.; MANZATO, J. A. Reproductive compatibility and chromosome pairing in the *Drosophila buzzatii* complex. **Cytobios**, 89: 21-30, 1997.

MANFRIN, M. H.; DE BRITO, R. A.; SENE, F. M. Systematics and evolution of the *Drosophila buzzatii* (Diptera: Drosophilidae) cluster using mtDNA. Annals of the Entomological Society of America, 94 (3):333-346, 2001.

MANFRIN, M. H.; SENE, F. M. Cactophilic *Drosophila* in South America: A model for evolutionary studies. **Genética**, 126 (1-2):57-75, 2006.

MARGULIS, L. Symbiosis in Cell Evolution. Second edition. W. 1-1. Freeman, San Francisco, 1993.

MARTIN, W. F.; MÜLLER, M. Origin of mitochondria and hydrogenosomes. Springer Verlag, Heidelberg, 2007.

MCFADDEN, G. I.; VAN-DOOREN, G. G. Evolution: red algal genome affirms a common origin of all plastids. **Current Biology**, 14 (13): R514-16, 2004.

MILLER, W. J.; EHRMAN, L.; SCHNEIDER, D. Infectious speciation revisited: impact of symbiont-depletion on female fitness and mating behavior of *Drosophila paulistorum*. **PLoS Pathogens**, 6, 17, 2010.

MILLER, W. J.; RIEGLER, M. Evolutionary dynamics of *w*Au-like *Wolbachia* variants in Neotropical *Drosophila* spp. **Appl. Environ. Microbiol.**, 72: 826-835, 2006.

MONTENEGRO, H.; SOLFERINI, V. N.; KLACZKO, L. B.; HURST, G. D. D. Malekilling *Spiroplasma* naturally infecting *Drosophila melanogaster*. **Insect Molecular Biology**, 14: 281-287, 2005.

MORAES, E. *et al.* Phylogeography of the cactophilic species *Drosophila gouveai*: demographic events and divergence timing in dry vegetation enclaves in eastern Brazil. **Journal of Biogeography**, 36 (11): 2136-2147, 2009.

MORALES, A. C. Análise histórico-evolutiva de populações das espécies cactofílicas *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae* (Diptera: Drosophilidae). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

MOREIRA, L. A. *et al.* A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with Dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. **Cell**, 139, 1268-1278, 2009.

MÜLLER, M. J. Ocorrência, diversidade e efeitos evolutivos do endossimbionte *Wolbachia* (Rickettsiae) em espécies neotropicais de *Drosophila* do subgrupo *willistoni*. 2013. 86f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.

NAKAYAMA, T; ARCHIBALD, J. M. Evolving a photosynthetic organelle. **BCM Biology**, 10: 35, 2012.

NARITA, S. *et al.* Unexpected mechanism of symbiont-induced reversal of insect sex: feminizing *Wolbachia* continuously acts on the butterfly *Eurema hecabe* during larval development. **Appl. Environ. Microbiol.**, 73, 4332–4341, 2007.

NEGRI, I. *et al.* Feminizing *Wolbachia* in *Zyginidia pullula* (Insecta, Hemiptera), a leafhopper with an XX/XO sex determination system. **Proc. R. Soc. Lond. B**, 273, 2409–2416, 2008.

NODA, H. *et al.* Infection density of *Wolbachia* and incompatibility level in two planthopper species, *Laodelphax striatellus* and *Sogatella furcifera*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 31, 727-737, 2001.

O'BRIEN, T. W. Properties of human mitochondrial ribosomes. **IUBMB Life**, 55 (9): 505-13, 2003.

OLIVEIRA, D. C. *et al.* Monophyly, divergence times, and evolution of host plant use inferred from a revised phylogeny of the Drosophila repleta species group. **Molec. Phylog. Evol.**, 64 (3): 533-544, 2012.

O'NEILL, S. L. *et al.* 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, 89: 2699–2702, 1992.

PANARAM, K.; MARSHALL, J. L. F supergroup *Wolbachia* in bush crickets: what do patterns of sequence variation reveal about this supergroup and horizontal transfer between nematodes and arthropods? **Genetica**, 130:53–60, 2007.

REED, K. M.; WERREN, J. H. Induction of paternal genome loss by the paternal-sexratio chromosome and cytoplasmic incompatibility bacteria (*Wolbachia*): a comparative study of early embryonic events. **Mol. Reprod. Dev.**, 40, 408–418, 1995.

ROS, V. I. D. *et al.* How diverse is the genus *Wolbachia*? Multiple-gene sequencing reveals a putatively new *Wolbachia* supergroup recovered from spider mites (Acari: Tetranychidae). **Appl. Environ. Microbiol.**, 75(4): 1036, 2009.

ROUSSET, F.; VAUTRIN, LD.; SOLIGNAC, M. Molecular identification of *Wolbachia*, the agent of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans* and variability in relation with host mitochondrial types. **Proc. Biol. Sci.**, 247: 1163-1168, 1992.

ROWLEY, S. M.; RAVEN, R. J.; MCGRAW, E. A. *Wolbachia pipientis* in Australian spiders. **Curr. Microbiol**., 49:208–214, 2004.

RUIZ, A.; HEED, W. B. Host-plant specificity in the cactophilic *Drosophila mulleri* species complex. Journal of Animal Ecology, 57, 237–249, 1988.

RUIZ, A.; WASSERMAN, M. Evolutionary cytogenetics of the *Drosophila buzzatii* species complex. **Heredity**, 70:582-596, 1993.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.**, 4: 406-425, 1987.

SAKAMOTO, J. M.; FEINSTEIN J.; RASGON, J. L. *Wolbachia* infections in the Cimicidae: museum specimens as an untapped resource for endosymbiont surveys. **Appl. Environ. Microbiol.**, 72:3161–3167, 2006.

SALUNKE, B. K. *et al.* Diversity of *Wolbachia* in *Odontotermes* spp. (Termitidae) and *Coptotermes heimi* (Rhinotermitidae) using the multigene approach. **FEMS Microbiol. Lett.**, 307(1):55-64, 2010.

SANTOS, C. G. Estrutura populacional da espécie Drosophila buzzatii (Diptera, Drosophilidae) determinada através de morfometria da asa. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

SANTOS, M. H. As rotas de dispersão de Drosophila buzzatii na América do Sul. 2011. 128f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011. SENE, F. M.; PEREIRA, M. A. Q. R.; e VILELA, C. R. Evolutionary aspects of cactus breeding *Drosophila* in South America. In **Ecological Genetics and Evolution**. The Cactus–Yeast–Drosophila Model System, edited by J. S. F. B. a. W. T. Starmer. Sydney: Academic Press, 1982.

SIMONCINI, L. *et al.* Real-time PCR for quantification of the bacterial endosymbionts (*Wolbachia*) of filarial nematodes. **Parasitologia**, 43: 173-178, 2001.

SINKINS, S. P.; BRAIG, H. R.; O'NEILL, S. L. *Wolbachia* superinfections and the expression of cytoplasmic incompatibility. **Proc. R. Soc. London B.**, 261, 325-330, 1995.

SMITH, J. M.; SZATHMÁRY, E. The Major Transitions in Evolution. W. H. Freeman, Oxford, 1995.

STONEKING, M. Human origins. The molecular perspective. **EMBO Rep.** 9 (Suppl. 1), 46–50, 2008.

STOUTHAMER, R.; LUCK, R. F.; HAMILTON, W. D. Antibiotics cause parthenogenetic *Trichogramma* (Hymenoptera/Trichogrammatidae) to revert to sex. **Proc. Natl Acad. Sci.**, *USA* 87, 2424–2427, 1990.

SUN, X.; CUI, L.; Li, Z. Diversity and phylogeny of *Wolbachia* infecting *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) populations from China. **Environ. Entomol.**, 36: 1283-1289, 2007.

SUTOVSKY, P. *et al.* Ubiquitin tag for sperm mitochondria. Nature, 402, 371–372, 1999.

TAMURA, K. *et al.* MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0.Molecular Biology and Evolution, 30: 2725-2729, 2013.

TENOVER *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J. Clin. Microbiol., 33: 2233–2239, 1995.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting,

position specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, 1994.

TIMMERMANS, M. J. T. N. *et al.* Evidence for multiple origins of *Wolbachia* infection in springtails. **Pedobiologia**, 48:469–475, 2004.

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

TORRONI, A. *et al.* Harvesting the fruit of the human mtDNA tree. **Trends Genet**., 22 (6): 339–45, 2006.

VAISHAMPAYAN, P. A. *et al.* Molecular evidence and phylogenetic affiliations of *Wolbachia* in cockroaches. **Mol. Phyl. Evol**., 44:1346–1351, 2007.

VANDEKERCKHOVE, T. T. M. *et al.* Evolutionary trends in feminization and intersexuality in woodlice (Crustacea, Isopoda) infected with *Wolbachia pipientis* (a-*Proteobacteria*). **Belg. J. Zool.**, 133, 61–69, 2003.

VILELA, C. R. A revision of the *Drosophila repleta* species group (Diptera; Drosophilidae). **Rev. Bras. Entomol.** 27: 1-114, 1983.

WASSERMAN, M.; RICHARDSON, R. H. Evolution of Brazilian *Drosophila* mullericomplex species. J. Hered., 78: 282-286, 1987.

WEEKS, A. R.; BREEUWER, J. A. *Wolbachia*-induced parthenogenesis in a genus of phytophagous mites. **Proc. R. Soc. Lond**., *B* 268, 2245–2251, 2001.

WEISBURG, W. G. *et al.* Phylogenetic Diversity of the Rickettsiae. **J. Bacteriol**., 171: 4202-6, 1989.

WERREN, J. H. *et al.* Rickettsial relative associate with male-killing in the ladybird beetle (Adalia bipunctata). **J. Bacteriol.**, 176: 388–394, 1994.

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

WERREN, J. H.; BALDO, L.; CLARK, M. E. *Wolbachia*: Master manipulators of invertebrate biology. **Nat Rev Microbiol**, 6:741–751, 2008.

WERREN, J. H.; WÌNDSOR, D. M. *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium?. **Proceedings of Biological Sciences**, 267, 1277–1285, 2000.

WERREN, J. H.; WINDSOR, D.; GUO, L. R.. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. **Proc. R. Soc. Lond. B**, 262:197–204, 1995.

WERREN, J. H.; ZHANG, W. GUO, L. R. Evolution and phylogeny of *Wolbachia* - reproductive parasites of arthropods. **Proc. R. Soc. Lond. B**, 261:55–63, 1995.

WILLIAMS, K. P.; SOBRAL, B.W.; DICKERMAN, A. W. A robust species tree for the alphaproteobacteria. **J. Bacteriol**., 189:4578-4586, 2007.

WU, M. *et al.* Phylogenomics of the reproductive parasite *Wolbachia pipientis w*Mel: a streamlined genome overrun by mobile genetic elements. **PLoS Biol.**, 2, E69, 2004.

ZABALOU, S. *et al.* Multiple rescue factors within a *Wolbachia* strain. Genetics, 178, 2145–2160, 2008.

ZCHORI-FEIN, E.; BOURTIS, K. Manipulative Tenants: Bacteria Associated with Arthropods. CRC Press, Boca Raton, 2011.

ZEH, D. W.; ZEH, J. A.; BONILLA, M. M. *Wolbachia*, sex ratio bias and apparent male killing in the harlequin beetle riding pseudoscorpion. **Heredity**, 95, 41–49, 2005.

ZHOU, W.; ROUSSET, F. & O'NEILL, S.L. Phylogeny and PCR based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. **Proc R Soc Lond B**, 265: 1-7, 1998.

ZUG, R.; HAMMERSTEIN, P. Still a host of hosts for *Wolbachia*: analysis of recent data suggests that 40% of terrestrial arthropod species are infected. **PLoS ONE**, 7: e38544, 2012.

ZUG, R.; HAMMERSTEIN, P. Bad guys turned nice? A critical assessment of *Wolbachia* mutualism in arthropod hosts. **Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.**, 2014.