



BIANCA LAÍS ZIMMERMANN

**ASPECTOS DA RELAÇÃO SIMBIÓTICA ENTRE AS BACTÉRIAS
Wolbachia (Alphaproteobacteria, Rickettsiales) E OS ISÓPODOS
TERRESTRES (Crustacea, Oniscidea)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Biociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Área de Concentração: Biologia Comparada

Orientadora: Dr^a. Paula Beatriz Araujo

Colaborador: Dr. Maurício Pereira Almerão

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

PORTO ALEGRE

2010

ASPECTOS DA RELAÇÃO SIMBIÓTICA ENTRE AS BACTÉRIAS *Wolbachia*
(Alphaproteobacteria, Rickettsiales) E OS ISÓPODOS TERRESTRES (Crustacea, Oniscidea)

BIANCA LAÍS ZIMMERMANN

Dissertação aprovada em ____/____/_____

Dra. Aline Ferreira de Quadros

Dra. Suzana Bencke Amato

Dr. Victor Hugo Valiati

“The Master Parasite: Meet *Wolbachia*, the parasite that wants to rule the world. *Wolbachia* is tiny, smaller than a single cell, but its powers are enormous. It can change its hosts genetically, tamper with their unborn children, and create whole new species of carriers... whatever it takes to fill the world with *Wolbachia*”.

Trecho do livro *Peeps* de Scott Westerfeld.

Agradecimentos

À Paula, pela orientação, ensinamentos, amizade e exigência. És para mim um exemplo como pessoa e profissional.

Ao Maurício, que foi muito mais que um colaborador. Muito obrigada por todos ensinamentos incentivo e paciência. Sem o seu auxílio este trabalho jamais teria se concretizado. Sou muitíssima grata por tudo.

Aos colegas de laboratório Carina, Ivanklin, Helena, Kelly, Carolina, Daiana, Luciane, Aline, Priscila, Tainã e Diego pelas conversas, risadas e ajudas. Obrigada por alegrarem os meus dias e tornarem o trabalho mais prazeroso e gratificante.

À todos meus amigos, em especial àqueles que me acompanham desde a época da graduação. Obrigada pelos conselhos, amparo, companhia e momentos de descontração.

À Renata, a melhor técnica de todas! Obrigada por toda a assistência, amizade e companhia nos almoços.

Aos meus familiares, que mesmo estando longe sempre foram tão presentes. Em especial agradeço aos meus pais, Vilmar e Inês e a minha irmã Deise por todo o carinho, educação e confiança. Vocês são o bem mais preciso e valioso que possuo.

Ao Jorge, pelo carinho, companheirismo e compreensão. Obrigada amor!

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal e a todos os seus professores e funcionários, à CAPES pela concessão da bolsa de mestrado e ao CNPq pelo financiamento deste projeto (Processos N° 479412/2008-1 e 472381/2009-1).

Ao professor Aldo Mellender de Araújo pelo auxílio na compra de reagentes e à professora Vera Lúcia da Silva Valente Gaiesky por ceder seu laboratório para o trabalho de bancada.

E a todas as pessoas que de alguma forma ou outra contribuíram para a realização deste trabalho.

Sumário

Prefácio	vi
Resumo	vii
Abstract	viii
Introdução Geral	
A bactéria.....	1
Os tatuzinhos-de-jardim.....	5
Objetivos	7
Referências Bibliográficas	8
Capítulo I: “Prevalência e relações filogenéticas entre linhagens de <i>Wolbachia</i> (Alphaproteobacteria: Rickettsiales) em isópodos terrestres neotropicais (Crustacea: Isopoda: Oniscidea)”.....	14
Capítulo II: “Primeiro registro de <i>Wolbachia</i> (Alphaproteobacteria, Rickettsiales) em nematoides endoparasitos de artrópodos (Nematoda, Mermithidae)”.....	42
Capítulo III: “Possíveis rotas de transmissão horizontal de <i>Wolbachia</i> (Alphaproteobacteria, Rickettsiales) entre isópodos terrestres (Crustacea, Oniscidea) e táxons ecologicamente relacionados”.....	58
Considerações finais	78
Anexo: Normas da revista Genetics and Molecular Biology.....	80

Préface

As bactérias *Wolbachia pipientis* Hertig, 1936 (normalmente citadas na literatura apenas como *Wolbachia*) são organismos fascinantes que têm sido amplamente estudados ao redor do mundo. No entanto, trabalhos sobre a relação simbiótica de tais bactérias com seus hospedeiros ainda são incipientes na região Neotropical. No Brasil, os estudos com *Wolbachia* e crustáceos, mais especificamente isópodos terrestres, só iniciaram com o doutorado do Dr. Maurício Pereira Almerão. O mesmo realizou estudos sobre a prevalência de infecção e aspectos filogenéticos das linhagens de *Wolbachia* encontradas nas espécies nativas *Balloniscus glaber* e *B. sellowii*. Além deste trabalho, nada mais foi analisado em relação à bactéria e os isópodos terrestres. Dessa forma, a gama de possibilidades de estudos é muito grande, sendo que questões básicas e essenciais pertinentes ao tema ainda precisam ser respondidas.

A presente dissertação busca responder a algumas perguntas (e levanta tantas outras), trazendo informações novas sobre a relação *Wolbachia*-isópodos terrestres. A dissertação é composta por três capítulos apresentados na forma de artigos científicos. Os mesmos foram redigidos de acordo com as normas dos periódicos aos quais serão submetidos. Antes disso, na seção “Introdução Geral” é realizada uma revisão geral sobre os organismos modelo desse trabalho, as bactérias *Wolbachia* e os isópodos terrestres.

No capítulo I, além da apresentação de novos registros de isópodos infectados pela bactéria, descrevem-se as relações filogenéticas e variações genéticas entre as linhagens de *Wolbachia* encontradas em espécies nativas e introduzidas de isópodos terrestres, do sul da América do Sul, bem como a prevalência de infecção. No capítulo 2 apresenta-se uma grande novidade, o primeiro registro de *Wolbachia* em uma espécie de nematoide da família Mermithidae. Esta novidade se deve ao fato de que é muito raro encontrar a bactéria presente em organismos além de artrópodos e nematoides filariídeos. Já no capítulo 3 inferem-se sobre possíveis rotas de transmissão horizontal da bactéria. Para tanto analisaram-se as linhagens de *Wolbachia* presentes em algumas espécies que possuem associações ecológicas com os isópodos terrestres, a fim de buscar compreender um pouco sobre este intrigante mecanismo. Por fim, comentários gerais, conclusões e perspectivas futuras são abordados no tópico “Considerações Gerais”.

Resumo

Wolbachia é uma alfa-proteobactéria que apresenta simbiose com uma variedade de artrópodos e nematoides, estando entre os mais abundantes gêneros de bactérias intracelulares já descobertos. Na região Neotropical, os estudos sobre tais bactérias e seus hospedeiros, em especial isópodos terrestres, ainda são incipientes. O presente trabalho teve como objetivos: investigar as espécies de isópodos terrestres neotropicais infectados por *Wolbachia*; analisar a prevalência de infecção, variação genética e relações filogenéticas das linhagens presentes nessas espécies; investigar a simbiose de *Wolbachia* em nematoides parasitos de tatuzinhos-de-jardim e inferir sobre as possíveis rotas de transmissão horizontal da bactéria entre os isópodos terrestres e os invertebrados que possuam associações ecológicas com os mesmos. A detecção da bactéria foi realizada através de PCRs diagnósticas, utilizando-se o gene 16S rDNA. A infecção pelo simbiote foi registrada pela primeira vez em *Atlantoscia floridana* e *Burmoniscus meeusei*. As linhagens de *Wolbachia* que infectam as espécies nativas de isópodos terrestres, ao contrário das introduzidas, são muito diversas e não se agrupam dentro do *Oniclado*. Já as sequências presentes em *B. meeusei* não são relacionadas a nenhuma outra linhagem presente em crustáceos, e nem mesmo fazem parte de qualquer supergrupo conhecido de *Wolbachia*. Pela primeira vez foi evidenciada a presença da bactéria em um nematoide da família Mermithidae, *Agamermis* sp., endoparasito do tatu-bola *Armadillidium vulgare*. Uma vez que as sequências do parasito e do hospedeiro são idênticas, é possível que um evento de transmissão horizontal tenha ocorrido entre ambos. Por fim, a presença de *Wolbachia* foi examinada em espécies que possuem relações ecológicas com os isópodos terrestres (predadores, parasitos, foréticos e animais que vivem sob as mesmas condições ecológicas). Entre as espécies associadas, a infecção foi registrada apenas no nematoide parasito e nos ácaros foréticos. Enquanto as linhagens do isópodo hospedeiro e do nematoide se mostraram muito similares, àquelas dos ácaros foréticos não apresentaram relação filogenética com as de seus forontes *Balloniscus glaber*. Interessantemente, as sequências presentes nos ácaros são proximamente relacionadas com aquelas de *B. meeusei*, embora mais estudos sejam necessários para esclarecer tal achado.

Palavras chave: simbiose; *Wolbachia*; isópodos terrestres neotropicais; transmissão horizontal; 16S rDNA.

Abstract

Wolbachia is a genus of alfa-proteobacteria whose members live in symbiosis with a variety of arthropods and nematodes. It is among the richest genera of intracellular bacteria discovered to date. In the Neotropical region, studies on these bacteria and their hosts, especially terrestrial isopods, are still in the initial stages. The objectives of the present study were: to investigate the species of Neotropical terrestrial isopods infected by *Wolbachia*; to analyze the prevalence of infection, genetic variation, and phylogenetic relationships of the lineages present in these isopod species; to investigate the symbiosis of *Wolbachia* in parasitic nematodes of pillbugs; and to provide information to support inferences about the possible routes of horizontal transmission of the bacteria between the terrestrial isopods and the invertebrates that are ecologically associated with them. The bacteria were detected by means of diagnostic PCR's, using the 16S rDNA gene. Infection by this symbiont was recorded for the first time in *Atlantoscia floridana* and *Burmoniscus meeusei*. The lineages of *Wolbachia* that infect the native species of terrestrial isopods, in contrast to the introduced species, are very diverse and do not group within the *Oniclade*. The sequences present in *B. meeusei* are not related to any other lineage present in crustaceans, nor to any other known supergroup of *Wolbachia*. This study is the first to demonstrate the presence of these bacteria in a nematode of the family Mermithidae, *Agamermis* sp., an endoparasite of *Armadillidium vulgare*. Since the sequences from the parasite and the host are identical, it is possible that a horizontal transmission event occurred between the two. Finally, the presence of *Wolbachia* was examined in species that are ecologically associated with terrestrial isopods (predators, parasites, phoretic species, and animals that live under the same ecological conditions). Among the associated species, the infection was recorded only in the parasitic nematode and in the phoretic mites. Whereas the lineages of the isopod host and of the nematode proved to be very similar, those of the phoretic mites showed no phylogenetic relationship with those of their phoront *Balloniscus glaber*. Interestingly, the sequences present in the mites are closely related to those of *B. meeusei*, although further studies are necessary to clarify this finding.

Keywords: symbiosis, *Wolbachia*; Neotropical terrestrial isopods; horizontal transmission; 16S rDNA.

Introdução Geral

A bactéria

As bactérias *Wolbachia* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) evoluíram há aproximadamente 400 milhões de anos, a partir de um clado de alfa-proteobactérias gram-negativas, aeróbicas e obrigatoriamente intracelulares (Bordenstein et al., 2009).

Descobertas em 1924, em células reprodutivas do mosquito *Culex pipiens* Linnaeus, 1758 (Diptera: Culicidae) (Hertig e Wolbach, 1924), as bactérias *Wolbachia* só começaram a ser amplamente estudadas na década de 90, com o advento das técnicas moleculares. A partir destes estudos, descobriu-se que a mesma apresenta uma vasta distribuição, estando entre os mais abundantes gêneros de bactérias intracelulares já descobertos (Werren et al., 2008).

A partir da utilização de técnicas moleculares como a PCR (*Polimerase Chain Reaction*) *Wolbachia* tem sido encontrada em diversos hospedeiros, pertencentes a numerosos táxons de artrópodos e nematoides (Saridaki e Bourtzis, 2010). O gênero é taxonomicamente subdividido em diferentes supergrupos com base em inferências filogenéticas de muitos genes, incluindo 16S rDNA, *wsp* e *ftsZ*. Estudos recentes (Baldo et al., 2006; Bordenstein et al., 2009, Ros et al., 2009) utilizando múltiplos genes (*Multi-Locus Sequence Typing*; Maiden et al., 1998) ampliaram o número de supergrupos de *Wolbachia* para 11, de A a K, sendo que a maioria das linhagens que infectam artrópodos agrupam dentro dos supergrupos A e B, e dos nematoides em C e D (Werren et al., 2008). No entanto, diversas questões sobre a taxonomia de *Wolbachia* ainda precisam ser resolvidas.

Wolbachia utiliza diferentes estratégias simbióticas, atuando como parasito reprodutivo em artrópodos e como mutualista em nematoides (Bordstein et al., 2009). Experimentos recentes que utilizaram antibióticos para curar hospedeiros infectados

mostraram que *Wolbachia* é primariamente benéfica para os nematoides (Taylor et al., 2005), sendo que a bactéria proveria metabólitos essenciais para a reprodução, desenvolvimento e sobrevivência dos hospedeiros (McNulty et al., 2010).

Em artrópodos, a bactéria altera a proporção sexual e as estratégias de reprodução sexuada de modo a garantir vantagem da transmissão maternal (uma vez que só hospedeiras fêmeas são capazes de passar a infecção para a prole) (Werren, 1997, Stouthamer et al., 1999). Estas alterações sexuais incluem a partenogênese, feminização, morte dos machos e a incompatibilidade citoplasmática (Charlat et al., 2003). Em raros casos, artrópodos evoluíram co-dependência com parasitos reprodutivos, ao ponto de *Wolbachia* se tornar essencial para a oogênese destes hospedeiros (Dedeide et al., 2001, Starr e Cline, 2002, Pannebakker et al., 2007).

A indução da partenogênese é bem documentada em espécies nas quais os machos se desenvolvem a partir de ovos não fertilizados, tais como ácaros, himenópteros e tripes (Stouthamer et al., 1990, Weeks e Breeuwer, 2001, Arakaki et al., 2001). Dependendo do hospedeiro, a bactéria induz a supressão total da meiose ou o estágio final da primeira mitose, dobrando o número de cromossomos. Assim, em vez de produzirem filhos de ovos não fertilizados, as fêmeas produzem filhas, que ao contrário dos machos, são capazes de transmitir a bactéria a sua prole (Werren et al., 2008).

A feminização foi descrita para isópodos terrestres e lepidópteros. Nos primeiros, as bactérias *Wolbachia* se proliferam dentro da glândula androgênica, causando a hipertrofia da mesma e inibindo sua função. Consequentemente, machos genéticos adquirem fenótipo de fêmeas (funcionais) e estas possuem duas vezes mais filhas com relação às fêmeas não infectadas (Vandekerckhove et al., 2003, Azzouna et al., 2004). O exato mecanismo responsável pela feminização em insetos ainda não foi esclarecido (Werren et al., 2008).

A morte de machos já foi registrada para os insetos (coleópteros, dípteros, lepidópteros) e aracnídeos (pseudoscorpíões) (Fialho e Stevens, 2000; Dyer e Jaenike, 2004; Jiggins et al., 2001; Zeh et al., 2005). Nesses grupos, a morte dos machos ocorre principalmente durante a embriogênese e aumentaria a aptidão das fêmeas, pois estas poderiam se alimentar dos machos mortos, reduzindo a competição entre os descendentes, ou ainda diminuindo o risco de cruzamentos entre aparentados (Zeh et al., 2005).

A incompatibilidade citoplasmática (IC) é o fenótipo mais comum induzido por *Wolbachia*, e foi descrito para muitos aracnídeos, isópodos terrestres e insetos. Na IC, o esperma de machos infectados é incompatível com os oócitos de fêmeas não infectadas ou de fêmeas infectadas com uma linhagem de *Wolbachia* diferente daquela que ocorre nos machos (Werren, 1997). Em organismos diplóides a IC geralmente resulta na letalidade do embrião, mas em organismos haplodiplóides a haploidia pode resultar no desenvolvimento normal de machos (Reed e Werren, 1995).

Em relação aos efeitos de *Wolbachia* sobre a aptidão dos hospedeiros, os estudos indicam relações que incluem parasitismo (Hoffmann e Turelli, 1988, Hoffmann et al., 1990, Fleury et al., 2000, Tagami et al., 2001, Riegler et al., 2004) comensalismo (Zchori-Fein et al., 2000, Bordenstein e Werren, 2000; Montenegro et al., 2006, Lachat et al., 2007) e mutualismo (Bandi et al., 1999, Dobson et al. 2002, Dong et al., 2007, Weeks et al., 2007).

Uma vez que a bactéria apresenta estratégias distintas em artrópodos e nematoides, as linhagens presentes em cada um desses hospedeiros também apresentam diferenças marcantes. Em artrópodos, onde a simbiose é facultativa, *Wolbachia* está presente na maioria dos tecidos, incluindo ovários e testículos (Saridaki

e Bourtzis, 2010), apresenta transmissão horizontal, e possui genomas dinâmicos, com bacteriófagos, elementos móveis e rearranjos (Moran et al., 2008).

Em nematoides a simbiose é obrigatória. *Wolbachia* ocorre somente nas células hipodermis dos cordões laterais e nas células reprodutivas das fêmeas (Jeyaprakash e Hoy, 2000), possui longa história evolutiva de diversificação com os hospedeiros, é transmitida exclusivamente de forma vertical e possui uma extrema redução do seu genoma (Moran et al., 2008).

Existem duas formas nas quais a bactéria pode ser transmitida para novos hospedeiros. A primeira delas é a transmissão vertical (da mãe para a sua prole via citoplasma dos ovos), que é mais comumente utilizada e pode ser fortemente influenciada por fatores como temperatura, ocorrência de antibióticos naturais, tempo de duração da relação simbiótica, competição com outros simbiossiontes, etc. (Clancy e Hoffmann, 1998, Merçot e Poinso, 1998, Hurst et al., 2001).

A outra forma é a transmissão horizontal (entre espécies), que embora menos frequente, pode ser evidenciada por duas maneiras: (i) espécies hospedeiras proximamente relacionadas frequentemente diferem no status da infecção ou possuem linhagens de *Wolbachia* distantemente relacionadas (West et al., 1998, Zhou et al., 1998); (ii) a filogenia molecular dos artrópodos hospedeiros e das linhagens de *Wolbachia* que os mesmos possuem é extremamente incongruente (O'Neill et al., 1992, Stouthamer et al., 1993). Logo, a persistência de *Wolbachia* nos artrópodos dependeria de uma contínua invasão de novas espécies (Haine et al., 2005).

O potencial de *Wolbachia* como um agente bio-controlador foi previamente reconhecido, devido a sua distribuição polifilética e a manipulação do sistema reprodutivo dos hospedeiros (Saridaki e Bourtzis, 2010). Muitas estratégias para controle e manejo de pestes e doenças vêm sendo propostas, a maioria delas tirando

vantagem de linhagens virulentas de *Wolbachia* ou da indução da incompatibilidade citoplasmática (Bourtzis, 2008). Além disso, estudos de controle de mosquito vetores de doenças estão mais voltados para estratégias que reduzam a longevidade dos adultos ao invés de diminuir sua abundância populacional (McMeniman et al., 2009, Moreira et al., 2009).

Na posse destas informações é possível perceber que as estratégias da *Wolbachia* são excepcionalmente diversas. Ela atua desde drástica manipuladora sexual à gentil mutualista, mas na evolução os fins justificam os meios, e essa bactéria apresenta a história de sucesso mais espetacular entre os simbioses, representando, provavelmente, a maior biomassa deste grupo funcional (Merçot e Poisot, 2009).

Os tatuzinhos-de-jardim

Os isópodos terrestres, popularmente conhecidos como tatuzinhos-de-jardim, estão todos agrupados dentro da Subordem Oniscidea (Schmidt, 2008). Até o presente momento, são conhecidas aproximadamente 3.600 espécies, as quais são distribuídas em uma variedade de habitat, desde a zona litorânea até desertos, encontrados ainda em cavernas, dossel de florestas, bromélias e ninhos de formigas (Schumalfuss, 2003).

Estes crustáceos são importantes representantes da fauna de solo, constituindo grande parte da mesma e influenciando na sua dinâmica. Além de participarem da formação do solo, são importantes na reciclagem de nutrientes e como fonte alimentar para uma variedade de animais (Araujo, 1999).

Características como a forma achatada do corpo, cutícula espessada, estruturas para troca gasosa aérea, entre outras adaptações fisiológicas e comportamentais permitiram que os oniscídeos pudessem viver de forma completamente independente

dos ambientes aquáticos (Sutton, 1980). No entanto, um dos aspectos mais relevante para o sucesso dos isópodos na terra está relacionado ao sistema reprodutivo.

Embora presente em outros crustáceos da superordem Peracarida, a bolsa incubadora (“marsúpio”) tem papel fundamental nos oniscídeos, pois representa a independência do meio líquido no que diz respeito ao desenvolvimento dos filhotes. Desta forma, o desenvolvimento direto (sem estágios larvais) se dá protegido de todos os perigos da perda de água, pois a bolsa funciona como um micro-aquário (Hoese, 1984). As nascer, os filhotes são semelhantes aos adultos, apenas com um par de pernas a menos (estágio de manca), situação esta que se modifica a partir da terceira muda (Araujo et al., 2004).

Na América do Sul, a fauna de isópodos terrestres ainda é pouco conhecida (Leistikow e Araujo, 2006), sendo que para o Brasil são registradas, até o momento, pouco mais de 120 espécies (Leistikow e Wägele, 1999, Souza-Kury, 1998, Araujo e Quadros, 2005, Araujo e Taiti, 2007, Magrini et al, 2010). Por outro lado, no estado do Rio Grande do Sul existe um número considerável de trabalhos sobre estes organismos. Tais trabalhos abordam questões sobre taxonomia (Lopes e Araujo, 2003, Araujo e Almerão, 2007, Sokolowicz et al., 2008), levantamento da isopodofauna (Lopes et al, 2005, Almerão et al., 2006), desenvolvimento (Araujo et al, 2004, Sokolowicz et al. 2007, Brum e Araujo, 2007), ecologia populacional e biologia reprodutiva (Araujo e Bond-Buckup, 2005, Quadros e Araujo, 2007, Quadros et al., 2007), comportamento (Boelter et al., 2009), entre outros.

Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi analisar aspectos da relação simbiótica entre *Wolbachia* e os seus hospedeiros isópodos terrestres.

Objetivos específicos

- 1) Investigar a presença de *Wolbachia* em espécies de isópodos terrestres Neotropicais;
- 2) Analisar a prevalência da bactéria em populações dessas espécies;
- 3) Examinar a variação genética e as relações filogenéticas das linhagens encontradas;
- 4) Investigar a presença de *Wolbachia* em nematoides parasitos dos isópodos terrestres;
- 5) Investigar a prevalência da bactéria em táxons que apresentem associações ecológicas com os isópodos terrestres e inferir sobre as possíveis rotas de transmissão horizontal de *Wolbachia* entre eles.

Referências bibliográficas

Almerão MP, Mendonça JR MC, Quadros AF, Pedó E, Silva LGR e Araujo PB (2006) Terrestrial isopod diversity in the subtropical neotropics: Itapuã State Park, Southern Brazil. *Iheringia Ser Zool* 96: 473-477.

Arakaki N, Miyoshi T e Noda H (2001) *Wolbachia* mediated parthenogenesis in the predatory thrips *Franklinothrips vespiformis* (Thysanoptera: Insecta). *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 268: 1011-1016.

Araujo PB, Augusto MM e Bond-Buckup G (2004) Postmarsupial development of *Atlantoscia floridana* (van Name) (Crustacea, Isopoda, Oniscidea): the manca stages. *J Nat Hist* 38: 951-965.

Araujo PB e Quadros AF (2005) A new species of *Alboscia* Schultz, 1995 (Crustacea: Isopoda: Oniscidea: Philosciidae) from Brazil. *Zootaxa* 1018: 55-60.

Araujo PB e Bond-Buckup G (2005) Population structure and reproductive biology of *Atlantoscia floridana* (van Name, 1940) (Crustacea, Isopoda, Oniscidea) in southern Brazil. *Acta Oecol* 28: 289-298.

Araujo PB e Almerão MP (2007) Nova espécie de *Trichorhina* (Isopoda, Oniscidea, Plathyarthridae) do Brasil. *Iheringia Ser Zool* 97: 219-222.

Araujo PB e Taiti S (2007) Terrestrial isopods (Crustacea, Oniscidea) from Rocas Atoll, Northeastern Brazil. *Arq Mus Nac* 65: 347-355.

Araujo PB (1999) Subordem Oniscidea (isópodos terrestres, "tatuzinhos"). In: L. Buckup; Bond-Buckup, G. (Eds.): Os Crustáceos do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Ed. Universidade/UFRGS, 1999. P. 237-256.

Azzouna A, Greve P e Martin G (2004) Sexual differentiation traits in functional males with female genital apertures (σ^{f} fga) in the woodlice *Armadillidium vulgare* Latr. (Isopoda, Crustacea). *Gen Comp Endocrinol* 138 (1): 42-49.

Baldo L, Dunning Hotopp JC, Jolley KA, Bordenstein SR, Biber SA, Choudhury RR, Hayashi C, Maiden MC, Tettelin H e Werren JH (2006) Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Appl Environ Microbiol* 72: 7098-7110.

Bandi C, McCall JW, Genchi C, Corona S, Venco L e Sacchi L (1999) Effects of tetracycline on the filarial worms *Brugia pahangi* and *Dirofilaria immitis* and their bacterial endosymbionts *Wolbachia*. *Int J Parasitol* 29: 357-364.

Boelter JF, Quadros AF e Araujo PB (2009) The feeding rates and preferences of a neotropical terrestrial isopod (Oniscidea). *Nauplius* 17 (2): 107-113.

Bordenstein SR e Werren JH (2000) Do *Wolbachia* influence fecundity in *Nasonia vitripennis*? *Heredity* 84: 54-62.

Bordenstein SR, Paraskevopoulos C, Hotopp JC, Sapountzis P, Lo N, Bandi C, Tettelin H, Werren JH e Bourtzis K (2009) Parasitism and mutualism in *Wolbachia*: what the phylogenomic trees can and cannot say. *Mol Biol Evol* 26(1): 231–241.

Bourtzis K (2008) *Wolbachia*-based technologies for insect pest population control. *Adv Exp Med Biol* 627: 104-113.

Brum PED e Araujo PB (2007) The manca stages of *Porcellio dilatatus* Brandt (Crustacea: Isopoda: Oniscidae). *Rev Bras Zool* 24 (2): 493–502.

Charlat S, Hurst GDD e Merçot H (2003) Evolutionary consequences of *Wolbachia* infections. *Trends Genet* 19 (4): 217-223.

Clancy DJ e Hoffmann AA (1998) Environmental effects on cytoplasmic incompatibility and bacterial load in *Wolbachia*-infected *Drosophila simulans*. *Entomol Exp Appl* 86: 13–24.

Dedeine F, Vavre F, Fleury F, Loppin B, Hochberg ME e Bouletreau M (2001) Removing symbiotic *Wolbachia* bacteria specifically inhibits oogenesis in a parasitic wasp. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 6247–6252.

Dobson SL, Marsland EJ e Rattanadechakul W (2002) Mutualistic *Wolbachia* infection in *Aedes albopictus*: accelerating cytoplasmic drive. *Genetics* 160: 1087–1094.

Dong P, Wang JJ, Hu F e Jia FX (2007) Influence of *Wolbachia* infection on the fitness of the stored-product pest *Liposcelis tricolor* (Psocoptera: Liposcelididae). *J Econ Entomol* 100 (4): 1476-1481.

Dyer KA e Jaenike J (2004) Evolutionarily stable infection by a male-killing endosymbiont in *Drosophila innubila*: molecular evidence from the host and parasite genomes. *Genetics* 168: 1443–1455.

Fialho RF e Stevens L (2000) Male-killing *Wolbachia* in a flour beetle. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 267: 1469–1473.

Fleury F, Vavre F, Ris N, Fouillet P e Boulétreau M (2000) Physiological cost induced by the maternally-transmitted endosymbiont *Wolbachia* in the *Drosophila* parasitoid *Leptopilina heterotoma*. *Parasitology* 121: 493-500.

Haine ER, Pickup NJ e Cook JM (2005) Horizontal transmission of *Wolbachia* in a *Drosophila* community. *Ecol Entomol* 30 (4): 464-472.

Hertig M e Wolbach SB (1924) Studies on rickettsia-like microorganisms in insects. *J Med Res* 44: 329-374.

Hoese e Janssen HH (1989) Morphological and physiological studies on the marsupium in terrestrial isopods. *Monitore Zoologico Italiano (Nuova Serie) Monografia* 4: 153-157.

Hoffmann AA e Turelli M (1988) Unidirectional incompatibility in *Drosophila simulans*: inheritance geographic variation and fitness effects. *Genetics* 119: 435-444.

Hoffmann AA, Turelli M e Harshman LG (1990) Factors affecting the distribution of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*. *Genetics* 126: 933–948.

Hurst GDD, Jiggins FM e Robinson SJW (2001) What causes inefficient transmission of male-killing *Wolbachia* in *Drosophila*? *Hereditary* 87: 220-226.

Jeyaprakash A e Hoy MA (2000) Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: *wsp* sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Mol Biol* 9: 393–405.

Jiggins FM, Hurst GD, Schulenburg JH e Majerus ME (2001) Two male-killing *Wolbachia* strains coexist within a population of the butterfly *Acraea encedon*. *Heredity* 86: 161–166.

Lachat M, Caubet Y e Bouchon D (2007) Does *Wolbachia* influence survival in starved *Armadillidium vulgare*? In: Proceedings of the international symposium on terrestrial isopod biology. Zimmer M, Charfi-Cheikhrouha F and Taiti S. Shaker (eds). Verlag, Aachen, pp 125-130.

Leistikow A e Wägele JW (1999) Checklist of the terrestrial isopods of the new world (Crustacea, Isopoda, Oniscidea). *Rev Bras Zool* 16 (1): 1-72.

Leistikow A e Araujo PB (2006) The systematic position of *Benthanoscia longicaudata* Lemos de Castro, 1958 (Isopoda: Oniscidea: Crinocheta). *System Biodivers* 4 (3): 243-254.

Lopes ERC e Araujo PB (2003) Nova espécie de *Novamundoniscus* Schultz (Isopoda, Oniscidea, Dubioniscidae) para o Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev Bras Zool* 20 (4): 611-614.

Lopes ERC, Mendonça JR MC, Bond-Buckup G e Araujo PB (2005) Oniscidea diversity across three environments in an altitudinal gradient in northeastern Rio Grande do Sul, Brazil. *Eur J Soil Biol* 41 (3-4): 99-107.

Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, et al (1998). Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3140–3145.

Magrini MJ, Araujo PB e Prado MU (2010) Crustacea, Isopoda, Oniscidea Latreille, 1802: new continent record and distribution extension in Brazil. *Check List* 6: 217-219.

McMeniman CJ, Lane RV, Cass BN, Fong AWC, Sidhu M, Wang Y e O'Neill SL (2009) Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* strain into the mosquito *Aedes aegypti*. *Science* 323: 141-144.

McNulty SN, Foster JM, Mitreva M, Hotopp JC, Martin J, Fischer K, Wu B, Davis PJ, Kumar S, Brattig NW, et al (2010) Endosymbiont DNA in endobacteria-free filarial nematodes indicates ancient horizontal gene transfer. *PLoS One* 5 (6): e11029.

Merçot H e Poinso D (1998) *Wolbachia* transmission in a naturally bi-infected *Drosophila simulans* strain from New-Caledonia. *Entomol Exp Appl* 86: 97-103.

Merçot H e Poinso D (2009) Infection by *Wolbachia*: from passengers to residents. *C R Biol* 332: 284-297.

Montenegro H, Petherwick AS, Hurst GDD e Klaczko LB (2006) Fitness effects of *Wolbachia* and *Spiroplasma* in *Drosophila melanogaster*. *Genetica* 127: 207–215.

Moran NA, McCutcheon JP e Nakabachi A (2008) Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annu Rev Genet* 42: 165-190.

Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JA, Lu G, Pyke AT, Hedges LM, Rocha BC, Hall-Mendelin H, Day A, Riegler M, et al (2009) A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, chikungunya, and *Plasmodium*. *Cell* 139 (7): 1268-1278.

O'Neill EA, Giordano R, Colbert AME, Karr TL e Robertson HM (1992) 16S rDNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 2699-2702.

Pannebakker BA, Loppin B, Elemans CP, Humblot L e Vavre F (2007) Parasitic inhibition of cell death facilitates symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 213–215.

Quadros AF e Araujo PB (2007) Ecological traits of two neotropical oniscideans (Crustacea: Isopoda). *Acta Zoologica Sinica* 53 (2): 241-249.

Quadros AF, Sokolowicz CC e Araujo PB (2007) Reproduction of neotropical isopods (Crustacea: Oniscidea) in southern Brazil: similarities and differences relative to temperate and tropical species. In: *Proceedings of the international symposium on terrestrial isopod biology*. Zimmer M, Charfi-Cheikhrouha F and Taiti S. Shaker (eds). Verlag, Aachen, pp 81-90.

Reed KM e Werren JH (1995) Induction of paternal genome loss by the paternal-sex-ratio chromosome and cytoplasmic incompatibility bacteria (*Wolbachia*): a comparative study of early embryonic events. *Mol Reprod Dev* 40: 408–418.

Riegler M, Charlat S, Stauffer C e Merçot H (2004) *Wolbachia* transfer from *Rhagoletis cerasi* to *Drosophila simulans*: investigating the outcomes of host-symbiont coevolution. *Appl Environ Microbiol* 70 (1): 273-279.

Ros VI, Fleming VM, Feil EJ e Breeuwer JA (2009) 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: 1036-1043.

Saridaki A e Bourtzis K (2010) *Wolbachia*: more than just a bug in insects genitals. *Curr Opin Microbiol* 13: 67-72.

Schmalzfuss H (2003) World catalog of terrestrial isopods (Isopoda, Oniscidea). *Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde A* 654: 1-341.

Schmidt C (2008) Phylogeny of the terrestrial Isopoda (Oniscidea): a review. *Arthropod Syst Phylogeny* 66: 191–226.

Sokolowicz CC e Araujo PB (2007) Postmarsupial mancae of *Benthana cairensis* Sokolowicz, Araujo e Boelter (Isopoda: Philosciidae). In: Proceedings of the international symposium on terrestrial isopod biology. Zimmer M, Charfi-Cheikhrouha F e Taiti S. Shaker (eds). Verlag, Aachen, pp 91-99.

Sokolowicz CC, Araujo PB e Boelter JF (2008) A new species of *Benthana* (Crustacea: Isopoda: Philosciidae) from southern Brazil. *Rev Bras Zool* 25 (2): 314–318.

Souza-Kury LA (1998) Malacostraca - Peracarida, Isopoda, Oniscidea. In: young, p.s. (Ed.). Catalogue of Crustacea of Brazil. Museu Nacional, Rio de Janeiro, pp. 653-674.

Starr DJ e Cline TW (2002) A host parasite interaction rescues *Drosophila* oogenesis defects. *Nature* 418: 76–79.

Stouthamer R, Breeuwer JA, Luck JRF e Werren JH (1993) Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis. *Nature* 361: 66-68.

Stouthamer R, Breeuwer JAJ e Hurst GDD (1999) *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annu Rev Microbiol* 53: 71–102.

Stouthamer R, Luck RF e Hamilton WD (1990) Antibiotics cause parthenogenetic *Trichogramma* (Hymenoptera/Trichogrammatidae) to revert to sex. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 2424–2427.

Sutton, S.L. 1980. Woodlice. Pergamon Press, Oxford.

Tagami Y, Miura K e Stouthamer R (2001) How does infection with parthenogenesis-inducing *Wolbachia* reduce the fitness of *Trichogramma*? *J Invertebr Pathol* 78: 267–271.

Taylor MJ, Makunde WH, McGarry HF, Turner JD, Mand S e Hoerauf A (2005) Macrofilaricidal activity after doxycycline treatment of *Wuchereria bancrofti*: a double-blind, randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 365: 2116-2121.

Vandekerckhove TTM, Watteyne S, Bonne W, Vanacke D, Devaere S, Rumes B, Maelfait J, Gillis M, Swings JG, Braig HR e Mertens J (2003) Evolutionary trends in feminization and intersexuality in woodlice (Crustacea, Isopoda) infected with *Wolbachia pipientis* (α -Proteobacteria). *Belg J Zool* 133 (1): 61-69.

Weeks AR e Breeuwer JA (2001) *Wolbachia*-induced parthenogenesis in a genus of phytophagous mites. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 268: 2245–2251.

Weeks AR, Turelli M, Harcombe WR, Reynolds T e Hoffmann AA (2007) From parasite to mutualist: rapid evolution of *Wolbachia* in natural populations of *Drosophila*. *PLOS Biol* 5 (5): 997-1005.

Werren JH (1997) Biology of *Wolbachia*. *Annu Rev Entomol* 42: 587-609.

Werren JH, Balbo L e Clark ME (2008) *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat Rev Microbiol* 6: 741-751.

West SA, Cook JM, Werren JH e Godfray HCJ (1998) *Wolbachia* in two insect host-parasitoid communities. *Mol Ecol* 7: 1457-1465.

Zchori-Fein E, Gottlieb Y e Coll M (2000) *Wolbachia* density and host fitness components in *Muscidifurax uniraptor* (Hymenoptera: Pteromalidae). *J Invertebr Pathol* 75: 267-272.

Zeh DW, Zeh JA e Bonilla MM (2005) *Wolbachia*, sex ratio bias and apparent male killing in the harlequin beetle riding pseudoscorpion. *Heredity* 95: 41-49.

Zhou W, Rousset F e O'Neill S (1998) Phylogeny and PCR based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 265: 509-515.

Capítulo I

“Prevalência e relações filogenéticas entre linhagens de *Wolbachia* (Alphaproteobacteria: Rickettsiales) em isópodos terrestres neotropicais (Crustacea: Isopoda: Oniscidea)”

Artigo redigido nas normas da revista *Genetics and Molecular Biology*

Zimmermann BL, Almerao MP, Bouchon D e Araujo PB. Prevalência e relações filogenéticas entre linhagens de *Wolbachia* (Alphaproteobacteria: Rickettsiales) em isópodos terrestres neotropicais (Isopoda: Oniscidea). *Genet Mol Biol*

**Prevalência e relações filogenéticas entre linhagens de *Wolbachia*
(Alphaproteobacteria: Rickettsiales) em isópodos terrestres neotropicais
(Crustacea: Isopoda: Oniscidea)**

Bianca Laís Zimmermann¹, Maurício Pereira Almerão¹, Didier Bouchon² e Paula Beatriz Araujo¹.

1-Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul, Brasil. 2-Laboratoire Ecologie, Evolution, Symbiose, Université de Poitiers. Poitiers, France.

Wolbachia e isópodos terrestres

Palavras-chave. *Wolbachia*, isópodos terrestres, Neotropical, prevalência, 16S rDNA.

Autor correspondente: Bianca Laís Zimmermann. Prédio 43435, sala 214. Avenida Bento Gonçalves, 9500. 91501-970. Porto Alegre, RS, Brasil. 51-3308-7698. bia.lais@gmail.com

Abstract

Wolbachia is an alphaproteobacteria belonging to the order Rickettsiales, a diverse group of intracellular bacteria. The objectives of this study were to investigate the prevalence of infection by the bacteria in native and introduced species of Neotropical pillbugs, as well as to analyze the genetic variation and phylogenetic relationships among the lineages found. The presence of *Wolbachia* was verified by means of diagnostic PCRs, using the 16S rDNA gene. In total, 490 individuals were tested; of the 14 species examined, seven showed the infection, and in two of these this is the first record of the bacteria. The overall prevalence of infection was 8.98%, and was higher for females (12%) than for males (2.55%). The majority of the lineages contained in the introduced species is very similar to each other and group within a monophyletic clade. The infecting lineages present in the native species, although they are included in supergroup B, do not group within the *Oniclade*. The sequence contained in the species introduced from Asia, *B. meesei*, in addition to not being part of the *Oniclade*, is also not part of any known supergroup of *Wolbachia*. Further studies are needed in the Neotropical region for this scenario to be better understood.

Introdução

Wolbachia é uma alfa-proteobactéria pertencente à ordem Rickettsiales, um diverso grupo de bactérias intracelulares que compreende linhagens que possuem relações parasíticas, comensais e mutualísticas com seus hospedeiros (Werren et al., 2008). Primariamente encontrada em tecidos reprodutivos de artrópodos terrestres, *Wolbachia* manipula a reprodução dos mesmos de modo a garantir sua transmissão para a próxima geração de hospedeiros (Merçot e Poisot, 2009). Além de ser um parasito reprodutivo, a bactéria também possui uma antiga relação mutualística com os filariídeos pertencentes ao filo Nematoda (Taylor et al., 2005).

Esse grupo de bactérias tem despertado notável interesse nos últimos anos, principalmente devido a sua natureza pandêmica (Hilgenboecker et al., 2008), dos fascinantes efeitos que causa em seus hospedeiros (Werren et al., 2008), de sua potencial aplicação no controle de pestes e vetores de doenças (Bourtzis, 2008) e da implicação evolutiva de sua infecção, uma vez que a transferência lateral de genes de *Wolbachia* para seus hospedeiros já foi registrada para algumas espécies (Hotopp et al., 2007, Nikoh et al., 2008).

Existem diferentes formas de se detectar a presença de *Wolbachia* em organismos hospedeiros, entre elas a análise de microscopia eletrônica (Louis e Nigro 1989, Louis et al. 1993), de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) (Heddi et al., 1999) e de PCRs diagnósticas utilizando-se *primers* específicos para *Wolbachia*. O último é o método mais comumente utilizado (O'Neill et al., 1997), onde genes tais como *wsp* (Braig et al., 1998, Zhou et al., 1998), 16S rDNA (O'Neill et al., 1992), *groE* (Masui et al., 1997) e *ftsZ* (Holden et al., 1993) são usados para amplificar um ou mais fragmentos de DNA da bactéria. Estudos filogenéticos dos genes acima citados e, mais recentemente, utilizando múltiplos genes através do método MLST (*Multi-Locus Sequence Typing*)

dividem o gênero *Wolbachia* em vários supergrupos, mais precisamente 11 (de A a K) (Baldo et al., 2006, Bordenstein et al., 2009, Ros et al., 2009).

Os isópodos terrestres (Oniscidea) são importantes representantes da fauna de solo, onde participam da formação do mesmo e também da reciclagem de nutrientes, além de constituírem fonte alimentar para uma variedade de animais (Sunderland e Sutton, 1980, Vitt et al., 2000, Van Sluys, 2001). Tal grupo desenvolveu características estruturais, fisiológicas e comportamentais de modo a se tornar totalmente independente do meio aquático para a reprodução, o que lhes permitiu habitar uma variedade de ambientes, desde a zona litorânea até desertos (Schmalfuss, 2003).

A suspeita de que crustáceos da subordem Oniscidea possuíam organismos intracelulares que causavam efeitos como feminização e o surgimento de indivíduos intersexuados já existia desde a década de 1970 (Martin et al., 1973; Martin et al., 1974). No entanto, a primeira identificação molecular de *Wolbachia* só ocorreu em 1992 em populações francesas de *Armadillidium vulgare* Latreille, 1804 (Isopoda: Armadillidiidae) e *Porcellio dilatatus* Brandt, 1833 (Isopoda: Porcellionidae) (Rousset et al., 1992). Desde então muitas novas infecções foram descobertas, principalmente na Europa. A presença de *Wolbachia* foi detectada por Juchault et al. em populações francesas de *Chaetophiloscia elongata* Dollfus, 1884 (Isopoda: Philosciidae) e *Porcellionides pruinosus* Brandt, 1833 (Isopoda: Porcellionidae) em 1994. Bouchon et al. (1998) encontraram 14 novas espécies de isópodos terrestres infectados por *Wolbachia* na Europa. Nyirő et al., (2002) observaram a presença da bactéria em *Hyloniscus riparius* Koch, 1838 (Isopoda: Trichoniscidae), *Trachelipus rathkii* Brandt, 1833 e *T. ratzeburgii* Brandt, 1833 (Isopoda: Trachelipodidae) na Hungria. A infecção foi detectada em mais 11 espécies de isópodos terrestres da Tunísia por Ben Afia Hatira et al. em 2008. Mais recentemente, foi a vez de Wiwatanaratanabutr et al. (2009) anunciarem a presença do

simbionte em duas espécies tailandesas de *Philoscia* sp. Latreille, 1804 (Isopoda: Philosciidae).

Estudos iniciais baseados nos genes 16S rDNA e *ftsZ* demonstraram que todas as linhagens de *Wolbachia* que infectam isópodos terrestres pertenciam ao supergrupo B (Bouchon et al., 1998). Posteriormente esta informação foi corroborada com trabalhos que utilizavam os genes *wsp* e *groE* (Cordaux et al., 2001, Wiwatanaratanabutr et al., 2009). Ademais, tais filogenias sugerem que a maioria das linhagens presentes em isópodos terrestres forma um clado monofilético bem suportado, conhecido como *Oniclado*, fato que sugere especialização dessas linhagens em isópodos terrestres (Bouchon et al., 1998, Cordaux et al., 2001, Wiwatanaratanabutr et al., 2009).

Apesar de *Wolbachia* ser um organismo amplamente estudado em diferentes partes do globo, pouco se conhece sobre a sua presença em isópodos terrestres neotropicais, cuja riqueza conhecida é de aproximadamente 120 espécies (Souza-Kury, 1998). A presença de *Wolbachia* em isópodos terrestres na América do Sul foi registrada pela primeira vez por Almerão et al. (submetido) em populações de *Balloniscus glaber* Araujo e Zardo, 1995 e *B. sellowii* Brandt, 1833 (Isopoda: Balloniscidae), no sul do Brasil. Nesse estudo foi investigada a prevalência de infecção e aspectos filogenéticos das linhagens de *Wolbachia* encontradas nestas espécies, tendo sido evidenciado um cenário evolutivo distinto em relação aquele já conhecido para espécies de isópodos terrestres e *Wolbachia* provenientes de outras partes do mundo. Considerando estes primeiros resultados mencionados acima, constituem objetivos deste trabalho: (1) ampliar o conhecimento sobre a prevalência de infecção da bactéria em isópodos terrestres neotropicais e (2) analisar a variação genética e as relações filogenéticas entre as linhagens encontradas.

Material e Métodos

Coleta

Espécies de isópodos terrestres nativas e introduzidas foram coletadas em localidades do Brasil, Uruguai e Argentina (Figura 1). Os indivíduos foram manualmente coletados, fixados em etanol absoluto e transportados ao laboratório de Carcinologia da UFRGS. No laboratório os indivíduos foram acondicionados em refrigerador a -20°C, para posterior extração de DNA.

Extração de DNA

Os indivíduos foram dissecados conforme Bouchon et al. (1998). As extrações de DNA foram realizadas a partir de tecido reprodutivo (ovários das fêmeas e utrículos (porção final dos segmentos testiculares) dos machos), parte do cordão nervoso e músculo da base dos pereiópodes, utilizando-se o protocolo Chelex (Bio Rad). O tecido dissecado de cada animal foi macerado em tubos de polipropileno de 1,5 ml, em uma solução de 100 µl de Chelex 5% (fase líquida) e 5 µl de proteinase K (20 mg/ml). Após, foi acrescentado mais 20 µl de Chelex 5% (fase precipitada). A mistura foi mantida em banho-maria a 56°C por 30 minutos para rompimento dos tecidos, membranas celulares e digestão das proteínas pela proteinase K. Posteriormente a solução foi incubada a 95-100°C por 5 minutos, e por fim, centrifugada por 8 segundos, para que nenhum produto ficasse contido na parede do tubo de extração. O DNA extraído foi conservado a -20°C.

Para os indivíduos pequenos, de difícil dissecação, as extrações foram realizadas com auxílio do kit de extração PureLink Genomic DNA Kits (K1820-01) para 50 reações da Invitrogen, utilizando-se os animais inteiros.

Detecção de *Wolbachia* através da PCR

Possíveis falhas nas ampliações com os *primers* 16S rDNA poderiam acontecer devido aos seguintes motivos: (i) ausência de *Wolbachia*; (ii) falha no processo de extração de DNA; e/ou (iii) concentração incorreta da solução de DNA (Werren et al., 1995). De modo a controlar as duas últimas possibilidades, nós testamos as amostras tidas como negativas com *primers* da subunidade I do gene mitocondrial Citocromo Oxidase (COI) (Folmer et al., 1994). Amostras que geraram um produto de tamanho esperado foram consideradas verdadeiramente negativas para presença de *Wolbachia*.

PCR, Purificação e Sequenciamento

As PCRs diagnósticas foram realizadas em condições adaptadas de Bouchon et al. (1998). O gene 16S rDNA mostrou-se mais indicado para diagnose de *Wolbachia* em espécies de *Balloniscus* (Almerão et al., submetido) e, por esse motivo optou-se pela sua utilização.

Parte deste gene foi amplificada utilizando os *primers* (iniciadores específicos de *Wolbachia*) 99F 5'- TTG TAG CCT GCT ATG GTA TAA CT - 3' e 994R 5' – GAA TAG GTA TGA TTT TCA TGT - 3' (O'Neill et al., 1992), os quais geram fragmentos de aproximadamente 900 bp. As PCR's foram realizadas em volumes de 25µl, sendo 1,0 µl de DNA (concentração não determinada), 0,16 µl de Taq Platinum (5U/µl) (Invitrogen), 2,5 µl de tampão 10X (Invitrogen), 1,6 µl de MgCl₂ (50 mM) (Invitrogen), 0,5 µl de iniciador direto (20 µM), 0,5 µl de iniciador reverso (20 µM), 0,5 µl de dNTPs (10 mM) (Invitrogen) e 18,18 µl de H₂O ultra pura. Para as ampliações foram utilizadas as seguintes configurações: 35 ciclos (1 min a 95°C, 1 min a 50.6°C, 1 min a 72°C), incluindo um passo de desnaturação inicial de 95°C por 2 min e um passo de extensão final de

72°C por 5 min. Como controle positivo da reação de PCR foi utilizado DNA extraído de um indivíduo de *B. glaber*, infectado por *Wolbachia*.

Cerca de 4 µl de produto de PCR foram submetidos à eletroforese, a fim de verificar o sucesso da PCR. As eletroforeses foram realizadas em gel de agarose 1%, com tampão de corrida TBE 0,5X (5,4 g de Tris, 2,75 g de ácido bórico, 2 ml de EDTA 0,5M pH 8 e água destilada), a uma voltagem aproximada de 80V. Às amostras aplicadas no gel foram adicionados 2 µl de azul de bromofenol (no qual havia sido previamente acrescentado 1 µl/ml de gel Red), para posterior visualização dos fragmentos de DNA no transluminador UV.

Os fragmentos de DNA amplificados foram enviados para a empresa MACROGEN Advancing through Genomics na Coréia do Sul para purificação e sequenciamento dos mesmos. A empresa utiliza o protocolo BigDye™ Terminator, sendo o sequenciamento conduzido em 3730xl DNA analyzer. Todas as sequências serão posteriormente depositadas no banco de dados do Genbank-EMBL (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Polimorfismo das sequências e construções filogenéticas

Todas as sequências 16S rDNA de linhagens de *Wolbachia* encontradas nos isópodos terrestres foram alinhadas no programa Clustal X (Thompson et al., 1997) e o alinhamento inspecionado visualmente através do programa Bioedit (Hall, 1999). Posteriormente, foram acrescentadas ao alinhamento 17 sequências de linhagens encontradas em *B. glaber*, *B. sellowii* e *Armadillidium nasatum* Budde-Lund, 1885 (Isopoda: Armadillidiidae) (Almerao et al., submetido) e 62 sequências de linhagens (inclusive para outros isópodos terrestres) presentes em todos os supergrupos descritos para *Wolbachia* (A-K, segundo Ros et al., 2009). O alinhamento final foi melhorado

através da verificação da estrutura secundária das sequências de 16S rDNA de acordo com o banco de dados RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/>). Análises para verificar possíveis eventos de recombinação foram realizadas no programa RDP 2.0 (Martin et al., 2005).

O polimorfismo das sequências das linhagens de *Wolbachia* presentes em Oniscidea foi analisado no programa DnaSP 5.10 (Librado e Rozas, 2009) e a divergência média entre as mesmas foi analisada no programa MEGA4 (Tamura et al., 2007). As filogenias das linhagens de *Wolbachia* foram estimadas através do método de Máxima Verossimilhança implementado no programa PAUP*4.10b (Swofford, 2003) e do método Bayesiano implementado no programa MrBayes (Huelsenbeck e Ronquist, 2001). Para o método de Máxima Verossimilhança foi utilizado o modelo evolutivo GTR++ Γ , selecionado no programa Modeltest 3.7 pelo critério de informação Akaike (CIA) (Posada e Crandall, 1998; Posada e Buckley, 2004). Os pesos de Akaike foram utilizados para estimar os valores de parâmetros relevantes no modelo selecionado. As árvores foram geradas por meio de buscas heurísticas com bissecção e reconecção das árvores (*tree bisection and reconnection* - TBR) através de rearranjos (*branch swapping*) aleatórios dos ramos. O suporte para cada agrupamento foi acessado após 1000 replicações de *bootstrap* através da busca heurística de rearranjos (*branch swapping*) dos ramos vizinhos mais próximos (*nearest-neighbor interchange* - NNI). Para o método Bayesiano as árvores foram analisadas simultaneamente através de MCMC com 100,000,000 passos baseado no modelo GTR++ Γ no processo de especiação de Yule e assumindo um relógio molecular log normal relaxado (Drummond et al., 2006). As distâncias genéticas (p) entre os grupos foram calculadas através do programa MEGA4 (Tamura et al., 2007), sendo os grupos definidos com base nos supergrupos de *Wolbachia* (A-K). As sequências de *B. meeusei* foram consideradas com um grupo à parte,

pois em virtude de que em análises filogenéticas prévias, estas sequências não agruparam dentro de nenhum supergrupo de *Wolbachia* descrito até o momento.

Resultados

Prevalência global e específica de *Wolbachia*

Ao todo foram testados 490 indivíduos, 333 fêmeas e 157 machos, pertencentes a 14 espécies (sete introduzidas e sete nativas). Sete espécies apresentaram infecção por *Wolbachia*: *Atlantoscia floridana* van Name, 1940 (Isopoda: Philosciidae), *A. vulgare*, *B. glaber*, *B. sellowii*, *Burmoniscus meeusei* Holthuis, 1946 (Isopoda: Philosciidae), *P. dilatatus* e *P. laevis* Latreille, 1804 (Isopoda: Porcellionidae). A prevalência global foi maior em fêmeas (12%) em comparação aos machos (2,55%). Apesar do grande número de espécies infectadas, a prevalência global de infecção foi baixa (8,98%). Em relação à taxa de infecção específica, a mesma variou de 0 a 100% (Tabela 1).

Em *A. floridana* e *B. meeusei* este constitui primeiro registro de infecção por *Wolbachia* (Figuras 2 e 3). Em *A. nasatum*, *Benthana* sp., *B. cairensis* Sokolowicz, Araujo e Boelter, 2008, *B. taeniata* Araujo e Buckup, 1994 (Isopoda: Philosciidae), *P. pruinus*, *Styloniscus otakensis* Chilton, 1901 (Isopoda: Styloniscidae) e *Trichorhina tomentosa* Budde-Lund, 1893 (Isopoda: Platyarthridae) não foi detectada a presença da bactéria.

Varição genética entre linhagens de *Wolbachia*

No total, 57 sequências foram analisadas com relação à variação genética tanto em espécies nativas (grupo 1) quanto não-neotropicais (grupo 2) (Tabela 2). Com relação aos valores de diversidade nucleotídica relativa (levando-se em consideração o número de espécies), as linhagens que infectam o grupo 1 foram muito mais diversas em relação às linhagens encontradas no grupo 2. Da mesma forma, o número estimado de

linhagens (baseado no gene 16S rDNA) também foi maior para o grupo 1. Apesar dessa aparente maior diversidade genética das linhagens de *Wolbachia* encontradas em espécies nativas, a divergência média entre as linhagens foi quase duas vezes maior no grupo de espécies não-neotropicais.

Relações filogenéticas entre as linhagens de *Wolbachia*

Ambas as árvores 16S rDNA geradas pelas duas metodologias utilizadas (Bayesiana e Máxima Verossimilhança) foram muito similares (na Figura 4 é apresentada somente a árvore de Máxima Verossimilhança com os valores de *bootstrap* e os valores de probabilidades posteriores da árvore Bayesiana). Com uma única exceção (*B. meeusei*), todas as análises agruparam as sequências 16S rDNA dentro do Supergrupo B.

As espécies introduzidas analisadas (com exceção de *B. meeusei*) agruparam suas sequências juntamente com as linhagens de populações européias (de onde, aliás, estas espécies são originárias) no *Oniclado*, sendo que tal agrupamento recebeu altos valores de suporte de *bootstrap* e probabilidades posteriores (MV *bootstrap* 84, BA PCP 0,95). As linhagens de espécies nativas, no caso *A. floridana*, seguiram o mesmo padrão observado para as espécies de *Balloniscus*, ou seja, não se agrupam no *Oniclado*.

As linhagens de *Wolbachia* encontradas em *B. meeusei* não agruparam dentro de qualquer supergrupo conhecido. Além disso, essas linhagens estão a distâncias genéticas (p) dos supergrupos de *Wolbachia*, que variaram de 1,66% a 4,54%.

Discussão

Wolbachia consiste em um grupo de bactérias amplamente distribuído que infecta uma variedade de nematoides e artrópodos (Werren e Windsor, 2000). Nos

isópodos terrestres infectam, por sua vez, um grande número de espécies por todo o mundo (Bouchon et al., 1998, Cordaux et al., 2001, Bouchon et al., 2008, Wiwatanaratnabutr et al., 2009). Na região Neotropical, este cenário foi ampliado, uma vez que a infecção foi registrada, também, em várias espécies, tanto nativas quanto introduzidas, embora as linhagens encontradas neste trabalho possuam características próprias e várias dissimilaridades em comparação àquelas já conhecidas para outros isópodos terrestres.

Prevalência de infecção por *Wolbachia*

Através deste estudo, duas novas espécies de isópodos terrestres entraram para o vasto grupo de hospedeiros infectados por *Wolbachia*: *A. floridana* e *B. meeusei*. *Atlantoscia floridana* ocorre nos Estados Unidos, Ilhas Ascensão e Santa Helena, desde o norte do Brasil até La Plata na Argentina (Araujo, 1999). É uma espécie generalista em termos de habitat (Quadros et al., 2009) ocorrendo em diversos ambientes, e frequentemente em grande número (Almerão et al., 2006). Já *B. meeusei* é uma espécie introduzida da Ásia, que atualmente se distribui pela Inglaterra, Hawaii, Brasil (Santa Catarina) e Taiwan (Schmalfuss, 2003), sendo que a mesma nunca havia sido registrada para o estado do Rio Grande do Sul.

Metade das espécies analisadas na região Neotropical apresentou a infecção e a prevalência global encontrada neste estudo foi de 8,98%. Observou-se também que a taxa de ocorrência da bactéria variou muito conforme a espécie e a população. Em *A. floridana* e *B. meeusei*, a prevalência foi alta (44,64% e 100%, respectivamente), no entanto, nas outras espécies infectadas, esse valor não chegou a 9%.

De acordo com de Bouchon et al. (2008) a taxa de infecção global de *Wolbachia* em espécies de isópodos terrestres é de aproximadamente 61%. Várias populações já

foram analisadas em diferentes continentes, sendo que os valores de prevalência encontrados são bem variáveis, tanto intra quanto interespecificamente. Por exemplo, Nyirõ et al. (2002), testaram a presença do simbionte em 45 indivíduos, pertencentes a oito espécies de isópodos terrestres da Hungria e encontraram prevalências de infecções de 60% a 100% nas populações. Ben Afia Hatira et al. (2008), examinaram 21 espécies de isópodos terrestres na Tunísia e encontraram valores de infecção de 10% a 100%. Almerão et al. (submetido) estudaram isópodos terrestres neotropicais e encontraram prevalências que variavam de 0 a 87,5%.

Neste estudo, os valores de prevalência de infecção encontrados são baixos se comparados aos obtidos em outros trabalhos. No entanto, em análises de prevalência de *Wolbachia*, tanto subestimativas quando superestimativas podem ocorrer. A primeira poderia acontecer porque nem todas as populações de uma determinada espécie estão infectadas, ou porque indivíduos infectados e não infectados geralmente coexistem na mesma população (Cook e Butcher, 1999, Hilgenboecker et al., 2008). Superestimativas poderiam ser resultado de um esquema amostral no qual populações infectadas são mais frequentemente amostradas e também como produto de falsos positivos em análises de PCR (Li et al., 2007). Além disso, as variações encontradas podem ocorrer devido a diferenças geográficas na prevalência, na história da infecção, no tipo de linhagem possuída pelo hospedeiro e nos fenótipos ocasionados pela infecção (Ben Afia Hatira et al., 2008).

Apesar dessas questões relativas à subestimativas, *Wolbachia* pode simplesmente não estar presente em uma determinada população (ou espécie). A ausência da bactéria em algumas espécies poderia ser explicada porque a mesma nunca teria infectado as populações amostradas, ou porque algum mecanismo evolutivo mantém a prevalência de infecção a baixos níveis, o que diminuiria as chances de coletar

indivíduos infectados (Almerão et al., submetido). No primeiro caso, seria provável que nenhum agente transmissor da bactéria teria entrado em contato com tais populações, ou mesmo que tivesse, tal contato não seria suficiente para consumir a transmissão horizontal. No segundo caso os fatores envolvidos seriam muitos, tais como: condições ambientais (Keller et al., 2004), transmissão vertical ineficiente (Rigaud e Juchault, 1992), condições demográficas estocásticas (Rigaud et al., 1999, Jansen et al., 2008), os quais poderiam diminuir o avanço do simbiote dentro e entre as populações ou mesmo eliminar a bactéria da população hospedeira.

Variação genética entre linhagens de *Wolbachia*

Em relação à diversidade nucleotídica, foi observado um valor relativo menor no grupo das espécies não-neotropicais, sendo que o mesmo provavelmente tenha se devido à presença de linhagens mais conservadas em tal grupo (tanto que a maioria delas se agrupa no *Oniclado*). Ou seja, a aparente especialização das linhagens de *Wolbachia* nas espécies não-neotropicais teria, de certo modo, restringido a diversificação das mesmas. Já nas espécies nativas, além do maior número de linhagens por espécie, tais linhagens se mostram bem mais diversas (tanto que se agrupam fora do *Oniclado*). Além disso, é possível que as espécies nativas não sejam suscetíveis as linhagens presentes nas espécies não-neotropicais e/ou quando as espécies nativas são infectadas por linhagens presentes em isópodos terrestres não-neotropicais, elas perderiam a infecção por competição com as linhagens residentes. O caminho inverso também seria válido.

Do mesmo modo, o maior número de linhagens no grupo 1 teria sido ocasionado pois um número maior de populações por espécie foi analisado, e somado a isso, no caso de *B. sellowii* foram encontradas mais de uma linhagem por população, fato

este não observado no grupo 2. No caso da divergência média entre as linhagens, o maior valor observado no grupo 2 provavelmente tenha ocorrido por causa de *B. meeusei* e da maioria das espécies estudadas por Nyirõ et al. (2002). Tais espécies possuem sequências muito contrastantes, o que se deve, talvez, a questões geográficas, e dessa forma teriam “forçado” o valor observado de divergência genética. No entanto, o valor observado no grupo 1 foi bem alto, considerando-se que a área geográfica na qual as espécies foram coletadas é muito pequena (Rio Grande do Sul) em comparação ao grupo 2 (América do Sul e Europa).

Relações filogenéticas das linhagens de *Wolbachia*

Todas as linhagens analisadas (com exceção de *B. meeusei*), tanto de espécies nativas quanto introduzidas, pertencem ao supergrupo B, sendo que resultados similares foram encontrados por outros autores (Bouchon et al., 1998, Cordaux et al., 2001, Wiwatanaratanabutr et al., 2009). O caso de *B. meeusei*, espécie introduzida da Ásia, é o mais intrigante. De acordo com as duas árvores geradas (Bayesiana e de Máxima Verossimilhança), as linhagens de *Wolbachia* contidas nestes organismos não se agrupam nos supergrupos A ou B, nos quais todas as linhagens presentes em crustáceos são encontradas (Ros et al., 2009) e nem em qualquer outro supergrupo conhecido de *Wolbachia*. Além disso, os valores de distância genética apresentados por *B. meeusei* são similares aos utilizados por Ros et al. (2009) para sustentar a criação de um novo supergrupo de *Wolbachia* (2,8% a 5,5%), baseados no gene 16S rDNA. Desse modo, os dados de distância genética reforçam os resultados das árvores filogenéticas, e são um forte indício de que as linhagens presentes em *B. meeusei* poderiam formar um novo supergrupo de *Wolbachia*. No entanto, estudos utilizando um número maior de genes e outras populações de *B. meeusei* seriam necessários para reafirmar tal achado.

As linhagens presentes nos isópodos terrestres introduzidos (com exceção de *B. meeusei*) apresentaram grande silimaridade com as sequências já conhecidas para as mesmas espécies na Europa, e se agrupam no *Oniclado*. Dessa forma, é provável que mesmo depois de serem levadas a outras regiões, estas espécies tenham mantido as linhagens adquiridas em seus locais de origem. Todavia, as espécies nativas, apesar de serem muitas vezes encontradas em simpatria com as introduzidas, não possuem linhagens similares as das últimas, pois formam um clado à parte e não se agrupam no *Oniclado*. Alguns autores já haviam observado que nem todas as linhagens de *Wolbachia* presentes nos isópodos fazem parte do *Oniclado* (Bouchon et al., 1998, Nyirõ et al., 2002, Wiwatanaratanabutr et al., 2009), sendo que os resultados de Wiwatanaratanabutr et al. (2009) demonstram que a expansão de *Wolbachia* dentro de cada clado de hospedeiros pode variar de acordo com a região geográfica.

Outra questão interessante que necessita ser melhor avaliada é a maior diversidade de linhagens presentes nas espécies nativas neotropicais de isópodos terrestres. Aparentemente, as linhagens de *Wolbachia* que infectam *B. glaber* e *B. sellowii* são bem mais diversas (levando-se em consideração o gene 16S rDNA) do que as já conhecidas para as espécies introduzidas, sendo que é possível que *A. floridana* não tenha apresentado tal diversidade porque foi encontrada apenas uma população infectada desta espécie. À medida que novas linhagens vão sendo descobertas, é provável que esse cenário seja cada vez mais corroborado.

Em conclusão, as linhagens de *Wolbachia* encontradas em isópodos terrestres no sul da América do Sul apresentam características únicas no que diz respeito à prevalência, variação genética e relações filogenéticas com as outras linhagens conhecidas para isópodos terrestres. Mais estudos são necessários na região Neotropical para que este cenário seja melhor compreendido, pois nossos resultados, apesar de

iniciais, são muito interessantes e os padrões observados se mostram bem diferentes dos até então conhecidos.

Agradecimentos

A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado a BLZ e ao CNPq pela concessão da bolsa de produtividade em pesquisa a PBA e pelo financiamento deste projeto (PBA – Processo N° 472381/2009-1; Dr. Luiz Roberto Malabarba - Processo N° 479412/2008-1).

Referências Bibliográficas

Almerão MP, Fagundes NJR, Araujo AM, Araujo PB, Grandjean F e Bouchon D (submetido) First record of *Wolbachia* in South American terrestrial isopods: high diversity of *Wolbachia* strains in two species of genus *Balloniscus* (Crustacea: Oniscidea).

Almerão MP, Mendonça Jr MS, Quadros AF, Pedó E, Rabaioli LGS e Araujo PB (2006) Terrestrial isopod diversity in the subtropical Neotropics: Itapuã State Park, southern Brazil. *Iheringia* 96: 473-477.

Araujo PB (1999) Subordem Oniscidea (isópodos terrestres, "tatuzinhos"). In: Backup L e Bond-Backup G (Eds.): Os Crustáceos do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Ed. Universidade/UFRGS, 1999. pp 237-256.

Baldo L, Dunning Hotopp JC, Jolley KA, Bordenstein SR, Biber AS, Choudhury RR, Hayashi C, Maiden MC, Tettelin H e Werren JH (2006) Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Appl Environ Microbiol* 72: 7098–7110.

Ben Afia Hatira H, Charfi Cheikhrouha F e Bouchon D (2008) *Wolbachia* in terrestrial isopods in Tunisia. In: Proceedings of the international symposium on terrestrial isopod biology. Zimmer M, Charfi-Cheikhrouha F e Taiti S. Shaker (eds). Verlag, Aachen, pp 117-124.

Bordenstein SR, Paraskevopoulos C, Hotopp JC, Sapountzis P, Lo N, Bandi C, Tettelin H, Werren JH e Bourtzis K (2009) Parasitism and mutualism in *Wolbachia*: what the phylogenomic trees can and cannot say. *Mol Biol Evol* 26(1): 231–241.

Bouchon D, Cordaux R e Grève P (2008) Feminizing *Wolbachia* and the evolution of sex determination in isopods. In: *Insect Symbiosis*. Bourtzis K e Miller T (eds), CRC Press, pp 273-294.

Bouchon D, Rigaud T e Juchault P (1998) Evidence for widespread *Wolbachia* infection in isopod crustaceans: molecular identification and host feminization. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 265: 1081-1090.

Bourtzis K (2008) *Wolbachia*-based technologies for insect pest population control. *Adv Exp Med Biol* 627: 104-113.

Braig HR, Zhou W, Dobson SL e O'Neill SL (1998) Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *J Bacteriol* 180: 2373–2378.

Cook JM e Butcher RDJ (1999) The transmission and effects of *Wolbachia* bacteria in parasitoids. *Res Popul Ecol* 41: 15-28.

Cordaux R, Michel-Salzat A e Bouchon D (2001) *Wolbachia* infection in crustaceans: novel hosts and potential routes for horizontal transmission. *J Evol Biol* 14: 237-243.

Drummond AJ, Ho SYW, Phillips MJ e Rambaut A (2006) Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLOS Biol* 4, 699-710.

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R e Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol* 3: 294-299.

Hall TA (1999) BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41: 95-98.

Heddi A, Grenier AM, Khatchadourian C, Charles H e Nardon P (1999) Four intracellular genomes direct weevil biology: nuclear, mitochondrial, principal endosymbionts, and *Wolbachia*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 6814-6819.

Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, Telschow A e Werren JH (2008) How many species are infected with *Wolbachia*?—a statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol Lett* 281: 215-220.

Holden PE, Brookfield JF e Jones P (1993) Cloning and characterization of an *fisZ* homologue from a bacterial symbiont of *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet* 240: 213-220.

Hotopp JCD, Clark ME, Oliveira DC, Foster JM, Fischer P, Torres MCM, Giebel JD, Kumar N, Ishmael N, Wang S, et al (2007) Widespread lateral gene transfer from intracellular bacteria to multicellular eukaryotes. *Science* 317: 1753-1756.

Huelsenbeck JP e Ronquist F (2001) MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17: 754-755.

Jansen VAA, Turelli M e Godfray HCJ (2008) Stochastic spread of *Wolbachia*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 275: 2769-2776.

Juchault P, Frelon M, Bouchon D e Rigaud T (1994) New evidence for feminizing bacteria in terrestrial isopods evolutionary implications. *C R Acad Sci Paris III* 317: 225-230.

Keller GP, Windsor DM, Saucedo JM e Werren JH (2004) Reproductive effects and geographical distributions of two *Wolbachia* strains infecting the neotropical beetle, *Chelymorpha alternans* Boh (Chrysomelidae, Cassidinae). *Mol Ecol* 13: 2405-2420.

Li ZX, Lin HZ e Guo X (2007) Prevalence of *Wolbachia* infection in *Bemisia tabaci*. *Curr Microbiol* 54: 467-471.

Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.

Louis C e Nigro L (1989) Ultrastructure evidence of *Wolbachia rickettsiales* in *Drosophila simulans* and their relationships with unidirectional cross-incompatibility. *J Invert Pathol* 54: 39-44.

Louis C, Pintureau B e Chapelle L (1993) Recherches sur l' origine de l'unisexualite: la thermotherapie elimine a la fois rickettsies et parthenogenese thelytoque chez un *Trichogramme* (Hym.,Trichogrammatidae). C R Acad Sci III 316: 27-33.

Martin DP, Williamson C e Posada D (2005) RDP2: recombination detection and analysis from sequence alignments. Bioinformatics 21: 260-262.

Martin G, Juchault P e Legrand JJ (1973) Mise en évidence d'un microorganisme intracytoplasmique symbiote de l'Oniscoïde *Armadillidium vulgare* L. dont la présence accompagne l'intersexualité ou la féminisation totale des mâles génétiques de la lignee théliogène. C R Acad Sci III 276: 2313-2316.

Martin G, Maissiat R, Juchault P e Legrand JJ (1974) Mise en evidence d'un micro-organisme intracytoplasmique symbiotique chez les intersexues (males a oostegites) du Crustace *Ligia oceanica* L. (Isopode, Oniscoïde). C R Acad Sci III 278: 3375-3378.

Masui S, Sasaki T, Ishikawa H (1997) groE-homologous operon of Wolbachia, an intracellular symbiont of arthropods: a new approach for their phylogeny. Zool Sci 14: 701-706.

Merçot H e Poinso D (2009) Infection by *Wolbachia*: from passengers to residents. C R Biol 332: 284-297.

Nikoh N, Tanaka K, Shibata F, Kondo N, Hizume M, Shimada M e Fukatsu T (2008) *Wolbachia* genome integrated in an insect chromosome: evolution and fate of laterally transferred endosymbiont genes. Genome Res 18: 272-280.

Nyirõ G, Oravecz O e Márialigeti K (2002) Detection of *Wolbachia pipientis* infection in arthropods in Hungary. Eur J Soil Biol 38: 63-66.

O'Neill SL, Giordano R, Colbert AME, Karr TL e Robertson HM (1992) 16S rDNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. Proc Natl Acad Sci USA 94: 2699-2702.

O'Neill SL, Hoffmann AA e Werren JH (1997) Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction. 1st edn. New York, Oxford University Press. 228 pp.

Posada D e Buckley TR (2004) Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of akaike information criterion and bayesian approaches over likelihood Ratio Tests. Syst Biol 53(5): 793-808.

Posada D e Crandall KA (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics 14(9): 817-818.

Quadros AF, Caubet Y e Araujo PB (2009) Life history comparison of two terrestrial isopods in relation to habitat specialization. Acta Oecol 35: 243-249.

Rigaud T e Juchault P (1992) Genetic control of the vertical transmission of a cytoplasmic sex factor in *Armadillidium vulgare* Latr. (Crustacea, Oniscidea). *Heredity* 68: 47-52.

Rigaud T, Bouchon D, Souty-Grosset C e Raimond R (1999) Mitochondrial DNA polymorphism, sex ratio distorters and population genetics in the isopod *Armadillidium vulgare*. *Genetics* 152: 1669-1677.

Ros VID, Fleming VM, Feil EJ e Breeuwer JAJ (2009) How diverse is *Wolbachia*? Multiple gene sequencing reveals a putatively new *Wolbachia* supergroup recovered from spider mites (Acari: Tetranychidae). *Appl Environ Microb* 75: 1036–1043.

Rousset F, Bouchon D, Pintureau B, Juchault P e Solignac M (1992) *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 250: 91-98.

Schmalfuss H (2003) World catalog of terrestrial isopods (Isopoda, Oniscidea). *Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde A* 654: 1-341.

Souza-Kury LA (1998) Malacostraca - Peracarida, Isopoda, Oniscidea. In: young, p.s. (Ed.). *Catalogue of Crustacea of Brazil*. Museu Nacional, Rio de Janeiro, pp. 653-674.

Sunderland KD e Sutton SL (1980) A serological study of arthropod predation on woodlice in a dune grassland ecosystem. *J Anim Ecol* 49 (3): 987-1004.

Swofford DL (2003) PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.

Tamura K, Dudley J, e Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596–1599.

Taylor MJ, Makunde WH, McGarry HF, Turner JD, Mand S e Hoerauf A (2005) Macrofilaricidal activity after doxycycline treatment of *Wuchereria bancrofti*: a double-blind, randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 365: 2116-2121.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F e Higgins DG (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 24: 4876-4882.

Van Sluys M, Rocha CFD e Souza MB (2001) Diet, reproduction and density of the Leptodactylid litter frog *Zachaenus parvulus* in a atlantic of southeastern Brazil. *J Herpetol* 35 (2): 322-325.

Vitt LJ, Souza RA, Sartorius SS, Avila-Pires TCS e Espósito MC (2000) Comparative ecology of sympatric Gonatodes (Squamata: Gekkonidae) in the western Amazon of Brazil. *Copela* 1: 83-95.

Werren JH e Windsor DM (2000) *Wolbachia* infection frequencies in insects evidence of a global equilibrium? *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 267: 1277-1285.

Werren JH, Balbo L e Clark ME (2008) *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat Rev Microbiol* 6: 741-751.

Werren JH, Windsor D e Guo LR (1995) Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 262: 197–204.

Wiwatanaratanabutr I, Kittayapong P, Caubet Y e Bouchon D (2009) Molecular phylogeny of *Wolbachia* strains in arthropod hosts bBased on groE-homologous gene sequences. *Zool Sci* 26: 171-177.

Zhou W, Rousset F e O'Neill S (1998) Phylogeny and PCR based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 265: 509-51.

Tabela 1. Prevalência de *Wolbachia* em isópodos terrestres. CV: Campus do Vale, UFRGS; AC: Av. Antônio de Carvalho, Bairro Jardim Carvalho; Bs.As.: Província de Buenos Aires; RS: Rio Grande do Sul; FT: fêmeas testadas; FI: fêmeas infectadas; MT: machos testados; MI: machos infectados; IT: indivíduos testados; II: indivíduos infectados; ITE: indivíduos testados por espécie; IIE: indivíduos infectados por espécie. As espécies em negrito são neotropicais, enquanto as outras são espécies introduzidas. Espécies marcadas com asterisco são aquelas que apresentaram a infecção por *Wolbachia*.

Espécie	Localidade	FT (FI)	MT (MI)	IT (II)	ITE (IIE)	% IIE
<i>Atlantoscia floridana</i>*	CV- Porto Alegre, RS/BR	7 (0)	1 (0)	8 (0)	56 (25)	44,64
	AC- Porto Alegre, RS/BR	38 (25)	2 (0)	40 (25)	-	-
	Barra do Ribeiro, RS/BR	8 (0)	0 (0)	8 (0)	-	-
<i>Armadillidium nasatum</i>	AC- Porto Alegre, RS/BR	12 (0)	16 (0)	28 (0)	38	0
	Barra do Ribeiro, RS/BR	4 (0)	3 (0)	7 (0)	-	-
	Montevidéu/UY	0 (0)	1 (0)	1 (0)	-	-
	Punta del Leste/UY	1 (0)	1 (0)	2 (0)	-	-
<i>Armadillidium vulgare</i> *	AC- Porto Alegre, RS/BR	21 (0)	9 (0)	30 (0)	124 (9)	7,26
	CV- Porto Alegre, RS/BR	22 (0)	18 (0)	40 (0)	-	-
	Barra do Ribeiro, RS/BR	8 (2)	10 (0)	18 (2)	-	-
	Balcarce, Bs.As./AR	8 (4)	14 (0)	22 (4)	-	-
	Montevidéu/UY	4 (3)	6 (0)	10 (3)	-	-
	Punta del Leste/UY	1 (0)	3 (0)	4 (0)	-	-
<i>Balloniscus glaber</i>*	CV- Porto Alegre, RS/BR	8 (1)	4 (0)	12 (1)	12 (1)	8,33
<i>Balloniscus sellowii</i>*	AC- Porto Alegre, RS/BR	31 (0)	18 (3)	49 (3)	81 (3)	3,7
	CV- Porto Alegre, RS/BR	28 (0)	4 (0)	32 (0)	-	-
<i>Benthana cairensis</i>	Taquara, RS/BR	6 (0)	4 (0)	10 (0)	10	0
<i>Benthana taeniata</i>	Augusto Pestana, RS/BR	29 (0)	1 (0)	30 (0)	30	0
<i>Benthana sp.</i>	Barra do Ribeiro, RS/BR	5 (0)	1 (0)	6 (0)	6	0
<i>Burmoniscus meeusei</i> *	CV- Porto Alegre, RS/BR	2 (2)	0 (0)	2 (2)	2 (2)	100
<i>Porcellio dilatatus</i> *	AC- Porto Alegre, RS/BR	16 (1)	14 (1)	30 (2)	32 (2)	6,25
	Punta del Leste/UY	2 (0)	0 (0)	2 (0)	-	-
<i>Porcellio laevis</i> *	Augusto Pestana, RS/BR	12 (2)	12 (0)	24 (2)	24 (2)	8,33
<i>Porcellionides pruinosus</i>	Augusto Pestana, RS/BR	20 (0)	15 (0)	35 (0)	35	0
<i>Styloniscus otakensis</i>	São Francisco de Paula, RS/BR	20 (0)	0 (0)	20 (0)	20	0
<i>Trichorhina tomentosa</i>	CV- Porto Alegre, RS/BR	20 (0)	0 (0)	20 (0)	20	0
Total		333 (40)	157 (4)	490 (44)		

Tabela 2. Diversidade genética de linhagens de *Wolbachia* em espécies de isópodos terrestres nativas e não-neotropicais; * Número de populações consideradas; ^Δ Duas supostas linhagens compartilhadas pelas duas espécies foram consideradas; ¹ Almerão et al. (submetido); ² Linhagens encontradas por Bouchon et al. (1998); ³ Linhagens encontradas por Nyiro et al. (2002); ⁴ Linhagens encontradas neste estudo. O número entre parênteses na diversidade nucleotídica representa o valor relativo (valor absoluto dividido pelo número de espécies analisadas).

	Espécies Nativas (grupo 1)	Espécies Não-Neotropicais (grupo 2)
Diversidade nucleotídica (π)	Todas (3 sp.) 0,009 (0,0030)	Todas (19 sp.) 0,011 (0,0005)
Divergência média entre as linhagens	0,01	0,018
N° de linhagens estimadas por espécie (baseado no gene 16S rDNA)	<i>Atlantoscia floridana</i> (1*) ⁴ 1 <i>Balloniscus glaber</i> (5*) ¹ 5 ^Δ <i>Balloniscus sellowii</i> (9*) ¹ 14 ^Δ	<i>Armadillidium vulgare</i> (8*) ^{2,3,4} 3 <i>Armadillidium nasatum</i> (2*) ^{1,2} 1 <i>Burmoniscus meeusei</i> (1*) ⁴ 1 <i>Chaetophiloscia elongata</i> (1*) ² 1 <i>Cylisticus convexus</i> (2*) ² 2 <i>Haplophthalmus danicus</i> (1*) ² 1 <i>Helleria brevicornis</i> (1*) ² 1 <i>Hyloniscus riparius</i> (1*) ³ 1 <i>Ligia oceanica</i> (1*) ² 1 <i>Oniscus asellus</i> (1*) ² 1 <i>Philoscia muscorum</i> (1*) ² 1 <i>Porcelio laevis</i> (1*) ⁴ 1 <i>Porcellio dilatatus</i> (3*) ^{2,3,4} 3 <i>Porcellio scaber</i> (2*) ^{2,3} 2 <i>Porcellio spinicornis</i> (1*) ² 1 <i>Porcellionides pruinosus</i> (2*) ² 2 <i>Trachelipus politus</i> (1*) ² 1 <i>Trachelipus rathkii</i> (1*) ² 1 <i>Trachelipus ratzeburgii</i> (2*) ³ 2
	1,33 linhagens/pop	0,81 linhagens/pop

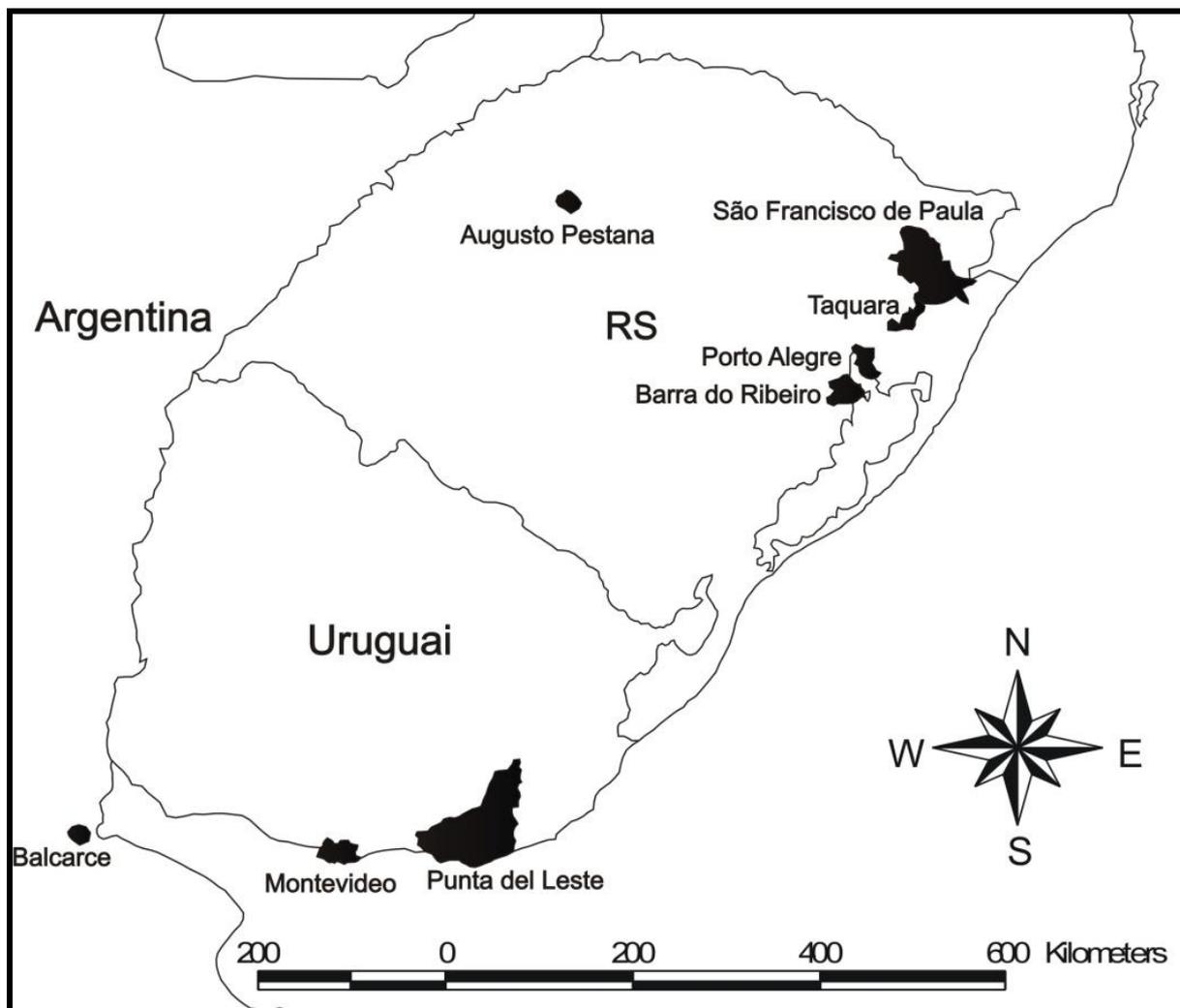


Figura 1: Locais de coleta dos isópodos terrestres na região Neotropical.

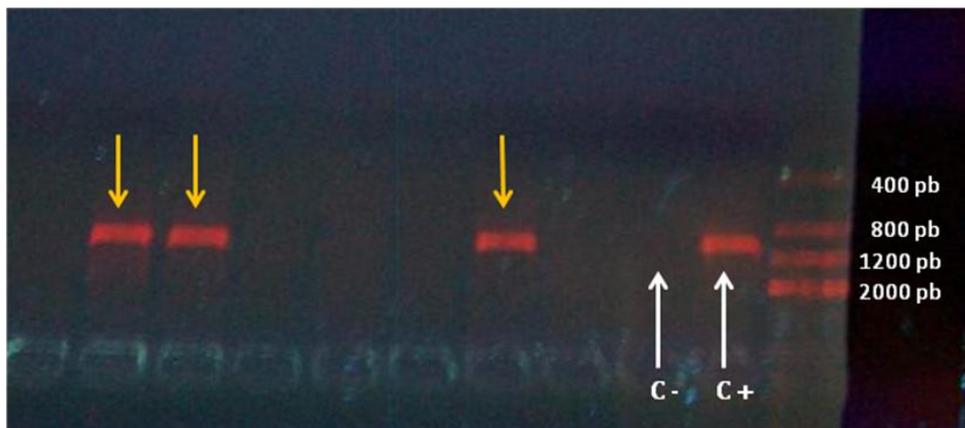


Figura 2. Fotografia do gel de agarose evidenciando a presença de *Wolbachia* em *Atlantoscia floridana* (as três bandas positivas). C +: controle positivo, C -: controle negativo (sem DNA).

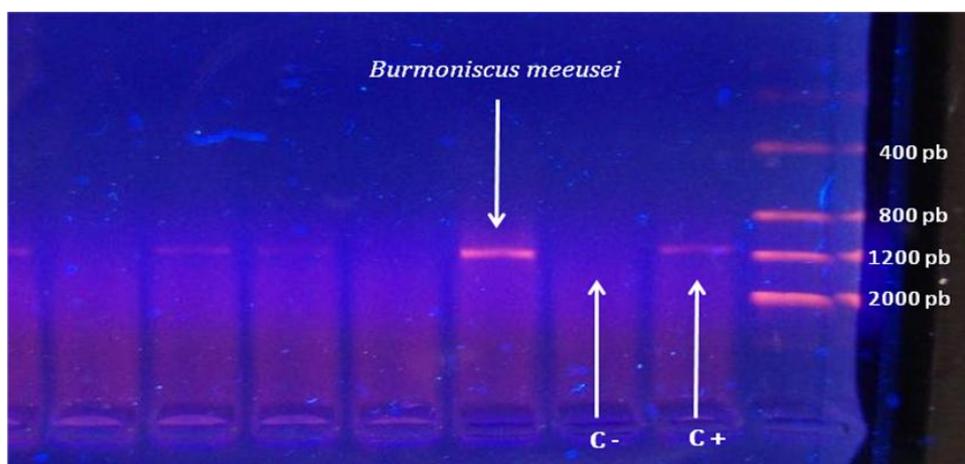


Figura 3. Fotografia do gel de agarose evidenciando a presença de *Wolbachia* em *Burmoniscus meeusei*. C +: controle positivo, C -: controle negativo (sem DNA).



Figura 4: Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança das linhagens de *Wolbachia*. As linhagens destacadas em vermelhos são aquelas encontradas no presente estudo; as destacadas em verde foram encontradas por Almerão et al. (submetido) no Rio Grande do Sul. AF: *Atlantoscia floridana*; AV: *Armadillidium vulgare*; BE e BU: *Burmoniscus meeusei*; wSel: *Balloniscus sellowii*; wGla: *Balloniscus glaber*; wBal: linhagem encontrada tanto em *Balloniscus sellowii* quanto em *Balloniscus glaber*; wNas: *Armadillidium nasatum*; PD: *Porcellio dilatatus*; PL: *Porcellio laevis*. Foram considerados apenas valores de *bootstrap* acima de 75 (os valores maiores que 75 correspondem a valores ainda mais altos de probabilidade posterior da análise Bayesiana). As sequências do supergrupo H (linhagens encontradas em Isoptera, mas especificamente em espécies do gênero *Zootermopsis*) não foram incluídas, pois aquelas depositadas no NCBI (National Center for Biotechnology Information) para o gene 16S rDNA são muito curtas. Dessa forma, optamos por não incluí-las, pois estaríamos perdendo muito informação dentro do nosso alinhamento.

Capítulo II

“Primeiro registro de *Wolbachia* (Alphaproteobacteria, Rickettsiales) em nematoides endoparasitos de artrópodos (Nematoda, Mermithidae)”

Artigo redigido nas normas da revista Genetics and Molecular Biology

Zimmermann BL, Almerao MP, Bouchon D e Araujo PB. Primeiro registro de *Wolbachia* (Alphaproteobacteria, Rickettsiales) em endoparasitos de artrópodos (Nematoda, Mermithidae). Genet Mol Biol

Primeiro registro de *Wolbachia* (Alphaproteobacteria, Rickettsiales) em nematoides endoparasitos de artrópodos (Nematoda, Mermithidae)

Bianca Laís Zimmermann¹, Maurício Pereira Almerão¹, Didier Bouchon² e Paula Beatriz Araujo¹.

1-Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul, Brasil. 2-Laboratoire Ecologie, Evolution, Symbiose, Université de Poitiers. Poitiers, France.

Wolbachia em Mermithidae

Palavras-chave. *Wolbachia*, isópodos terrestres, Mermithidae, *Agamermis* sp., 16S rDNA. Autor correspondente: Bianca Laís Zimmermann. Prédio 43435, sala 214. Avenida Bento Gonçalves, 9500. 91501-970. Porto Alegre, RS, Brasil. 51-3308-7698. bia.lais@gmail.com

Abstract

Wolbachia is an alphaproteobacteria that lives in symbiosis with a variety of arthropods and nematodes. In spite of several efforts, the bacteria has never been found in representatives of Nematoda that parasitize arthropods, which should be more likely to acquire the infection from their hosts. Therefore, the objective of this study was to investigate the presence of *Wolbachia* infection in a species of nematode that is endoparasitic in arthropods, more precisely in a mermithid that uses the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* as a host. Individuals of *A. vulgare* were collected in different localities in southern South America. Three mermithids of the genus *Agamermis* were found in females of *A. vulgare* collected in Uruguay. Diagnostic PCRs using the 16S rDNA and *wsp* genes revealed that both the isopods and the nematodes were infected by the bacteria. The alignment of the 16S rDNA sequences established that the three sequences from *Wolbachia* present in *A. vulgare* are identical, and that the lineage found in the mermithid also shows a close similarity to that of its host. The phylogenetic closeness of the lineages of *A. vulgare* and *Agamermis* sp. strongly indicates that horizontal transfer may have occurred between these species.

Introdução

Wolbachia é uma alfa-proteobactéria que apresenta simbiose com uma variedade de artrópodos e nematóides (Stouthamer et al., 1999, Stevens et al., 2001). Em artrópodos, a relação com a bactéria é facultativa, sendo que *Wolbachia* garante sua transmissão atuando como um parasito reprodutivo (Merçot e Poisot, 2009). Já em nematóides, mais especificamente na família Filariidae (Ordem Spirurida), grupo que inclui muitos patógenos humanos, tais como *Wuchereria bancrofti* Cobbold, 1877, *Brugia malayi* Brug, 1927 e *Onchocerca volvulus* Bickel, 1982, *Wolbachia* desenvolveu uma relação mutualística, tornando sua presença obrigatória para a fertilidade e sobrevivência destes organismos (Bandi et al., 1999, Hoerauf et al., 1999, Bandi et al., 2001).

Dessa forma, *Wolbachia* parece estar “fixada” nos filariídeos, exceto por poucas espécies que provavelmente tenham perdido secundariamente a infecção (Bandi et al., 1998, Chirgwin et al., 2002). Acredita-se que a aquisição do simbiote tenha ocorrido antes da diversificação de Filariidae e que ambos, bactéria e hospedeiros, tenham co-evoluído por aproximadamente 100 milhões de anos (Casiraghi et al., 2001). De fato, a relação mutualística parece ter se dado entre uma linhagem ancestral de *Wolbachia* e uma linhagem ancestral dos filariídeos, pois mesmo aqueles que são naturalmente livres da infecção possuem fragmentos de DNA da bactéria em seus genomas nucleares (McNulty et al., 2010).

Interessantemente, *Wolbachia* foi encontrada em apenas uma espécie de nematoide não filariídeo (Tsai et al., 2007), estando ausente inclusive em grupos proximamente relacionados com os últimos (Bordenstein et al., 2003). Mesmo em representantes de Nematoda (tais como os membros da família Mermithidae) e de Nematomorpha que parasitam artrópodos, os quais seriam mais suscetíveis à aquisição

da infecção de seus hospedeiros, a presença da bactéria nunca foi documentada (Duron e Gavotte, 2007, Hudson e Floate, 2009).

A família Mermithidae constitui um grupo de nematoides que parasitam uma vasta gama de artrópodos (especialmente insetos), em uma variedade de ambientes, causando a morte, esterilizando ou alterando o desenvolvimento de seus hospedeiros (Poinar, 1983, Pettersen, 1985). As larvas dos mermitídeos são usualmente encontradas nas cavidades corporais de insetos, onde crescem e se alimentam dos fluidos corporais (Nickle, 1972). Mermitídeos quase sempre emergem dos seus hospedeiros em sua última fase larval (larva pós-parasítica). Essa emergência é necessária para o desenvolvimento do adulto, uma vez que o parasito somente muda para o último estágio larval momentos antes de deixar seu hospedeiro. É esta muda que predispõe fisiologicamente o mermitídeo para sua vida no exterior. Após deixá-lo, o parasito não mais se alimenta, dependendo exclusivamente de suas reversas estocadas (Nickle, 1972).

Crustáceos são hospedeiros não usuais dos mermitídeos, sendo que os organismos mais acometidos por estes parasitos são os anfípodos, incluindo as famílias Gammaridae (Rubstov e Bekman, 1979), Corophiidae (Bacescu, 1948), Hyaellidae (Camino, 1989) e Talitridae (Poinar et al. 2002). Em isópodos terrestres, o único registro de parasitismo por mermitídeos foi realizado nas espécies *Armadillidium vulgare* Latreille, 1804 (Isopoda: Armadillidiidae) e *Porcellio scaber* Latreille, 1804 (Isopoda: Porcellionidae) (Poinar, 1981).

Uma vez que os isópodos terrestres são largamente infectados por *Wolbachia* (Bouchon et al., 2008) e são poucos os trabalhos que investigam a presença da bactéria em grupos além de artrópodos e filariídeos nematoides, o objetivo do presente estudo

foi investigar a infecção por *Wolbachia* em nematoides mermitídeos endoparasitos de *A. vulgare*.

Material e Métodos

Coleta

Indivíduos de *A. vulgare* foram coletados em Porto Alegre, Barra do Ribeiro e Augusto Pestana, no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, em Montevideu e Punta del Leste, Uruguai e em Balcarce na Argentina.

Extração DNA

Antes de ter seu DNA extraído, o mermitídeo foi mantido por 10 dias em etanol absoluto e posteriormente lavado com água destilada para remover as bactérias que poderiam ter ficado aderidas em sua superfície. A extração do mesmo foi realizada com auxílio do kit de extração PureLink Genomic DNA Kits (K1820-01) para 50 reações da Invitrogen, utilizando-se o animal inteiro. O DNA extraído foi conservado a -20°C.

As fêmeas de *A. vulgare* das quais foram coletados os nematoides também tiveram seu DNA extraído para checar a presença de *Wolbachia*. As extrações foram realizadas a partir dos ovários das fêmeas hospedeiras utilizando-se o protocolo Chelex (Bio Rad). O tecido dissecado de cada animal foi macerado em tubos de polipropileno de 1,5 ml, em uma solução de 100 µl de Chelex 5% (fase líquida) e 5 µl de proteinase K (20 mg/ml). Após foi acrescentado mais 20 µl de Chelex 5% (fase precipitada). A mistura foi mantida em banho-maria a 56°C por 30 minutos para rompimento dos tecidos, membranas celulares e digestão das proteínas pela proteinase K. Posteriormente a solução foi incubada a 95-100°C por 5 minutos, e por fim ela foi centrifugada por 8

segundos, para que nenhum produto ficasse contido na parede do tubo de extração. O DNA extraído também foi conservado a -20°C.

PCR, purificação e sequenciamento

As PCR's diagnósticas foram realizadas utilizando-se os genes 16S rDNA e *wsp*. Os *primers* do 16S rDNA foram: 99F 5'- TTG TAG CCT GCT ATG GTA TAA CT - 3' e 994R 5' - GAA TAG GTA TGA TTT TCA TGT - 3' (O'Neill et al., 1992). Já os iniciadores específicos de *Wolbachia* para o gene *wsp* foram: 81F 5' - TGG TCC AAT AAG TGA TGA AGA AAC - 3' e 691R 5' - AAA AAT TAA ACG CTA CTC CA - 3' (Braig et al., 1998; Zhou et al., 1998). As PCR's foram realizadas em volumes de 25µl, sendo 1,0 µl de DNA (concentração não determinada), 0,16 µl de Taq Platinum (5U/µl) (Invitrogen), 2,5 µl de tampão 10X (Invitrogen), 1,6 µl de MgCl₂ (50 mM) (Invitrogen), 0,5 µl de iniciador direto (20 µM), 0,5 µl de iniciador reverso (20 µM), 0,5 µl de dNTPs (10 mM) (Invitrogen) e 18,18 µl de H₂O ultra pura. Para as amplificações do gene 16S rDNA foram utilizadas as seguintes configurações: 35 ciclos (1 min a 95°C, 1 min. a 50.6°C, 1 min a 72°C), incluindo um passo de desnaturação inicial de 95°C por 2 min e um passo de extensão final de 72°C por 5 min. Já para o *wsp* as configurações foram: 35 ciclos (1 min a 95°C, 1 min a 55°C, 1 min a 72°C), incluindo um passo de desnaturação inicial de 95°C por 2 min. e um passo de extensão final de 72°C por 5 min. Como controle positivo das reações de PCR foi utilizado DNA extraído do isópodo terrestre *Balloniscus glaber* Araujo e Zardo, 1995 (Isopoda: Balloniscidae), o qual possuía infecção previamente conhecida por *Wolbachia*.

Cerca de 4 µl de produto de PCR foram submetidos à eletroforese, a fim de checar o sucesso da PCR. As eletroforeses foram realizadas em gel de agarose 1%, em cubas horizontais, com tampão de corrida TBE 0,5X (5,4 g de Tris, 2,75 g de ácido bórico,

2 ml de EDTA 0,5M pH 8 e água destilada), a uma voltagem aproximada de 80V. Às amostras aplicadas no gel foram adicionados 2 µl de azul de bromofenol (no qual havia sido previamente acrescentado 1 µl/ml de gel Red), para posterior visualização dos fragmentos de DNA no transluminador UV.

Os fragmentos de DNA amplificados foram enviados para a empresa MACROGEN Advancing through Genomics na Coréia do Sul para purificação e sequenciamento dos mesmos. A empresa utiliza o protocolo BigDye™ Terminator, sendo o sequenciamento conduzido em 3730xl DNA analyzer. Todas as sequências serão posteriormente depositadas no banco de dados do Genbank-EMBL (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Análise das sequências

Todas as sequências encontradas foram alinhadas no programa Clustal X (Thompson et al., 1997) e o alinhamento inspecionado visualmente através do programa Bioedit (Hall, 1999). O polimorfismo das linhagens de *Wolbachia* encontradas foi analisado no programa DnaSP 5.10 (Librado e Rozas, 2009).

Resultados

Ao todo foram examinados 300 indivíduos de *A. vulgare*, 166 fêmeas e 134 machos para a presença do endoparasito (Tabela 1). Três mermitídeos do gênero *Agamermis* Cobb, Steiner e Christie, 1923 (Mermithida: Mermithidae) foram encontrados em fêmeas de *A. vulgare* (um indivíduo por isópodo) coletados em Montevideú. Dois indivíduos foram enviados para identificação (e posteriormente depositados na coleção Helminológica do Museu de La Plata, Argentina (MLP) sob o

número 6260), sendo o terceiro fixado em etanol absoluto para posterior extração de DNA. Este é o primeiro registro do parasitismo de *Agamermis* sp. em *A. vulgare*.

Através das PCRs diagnósticas, constatou-se que tanto o mermitídeo (Figura 1) quanto as fêmeas de *A. vulgare* (Figura 2) estavam infectados. As sequências obtidas foram confirmadas através do algoritmo Blastn no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A partir do alinhamento das sequências, constatou-se que as três sequências de *Wolbachia* presentes em *A. vulgare* são idênticas. Já a linhagem encontrada no mermitídeo também apresentou grande similaridade com aquela encontrada em seu hospedeiro.

Discussão

Neste trabalho foram testados, para infecção por *Wolbachia*, nematoides da família Mermithidae, os quais parasitam o isópodo terrestre *A. vulgare*. Tanto os mermitídeos quanto os isópodos apresentaram a simbiose com a bactéria quando testados com primers do gene 16S rDNA. Não houve amplificação do *wsp* (o outro gene utilizado para detectar a presença de *Wolbachia*), o que provavelmente se deva ao fato deste ser um gene de evolução rápida, que possui uma alta taxa de recombinação (Werren e Bartos, 2001). Além disso, *A. vulgare* nunca antes havia sido descrito como hospedeiro de uma espécie de *Agamermis*. Representantes do gênero *Agamermis* são animais usualmente grandes (30-465 mm), parasitos de artrópodos terrestres e apresentam distribuição cosmopolita (Nickle, 1972, Baker e Poinar Jr, 1995). O único registro de um mermitídeo parasitando esta espécie de isópodo terrestres foi feito por Poinar et al. (1981), e o organismo em questão era *Thaumamermis cosgrovei* Poinar, 1981 (Mermithida: Mermithidae).

São poucos os trabalhos que investigaram a presença de *Wolbachia* em nematoides não-filariídeos parasitos de artrópodos. Bordenstein et al. (2003) fizeram uma primeira avaliação da distribuição de *Wolbachia* em nematoides não-filariídeos. Eles testaram a presença da bactéria em 21 espécies, representando todos os maiores grupos de Nematoda, mas não encontraram nenhum positivo. Algumas das razões para a ausência de *Wolbachia* seriam: houve apenas uma aquisição da bactéria no filo Nematoda, a qual provavelmente se deu em uma linhagem ancestral dos filariídeos; a maioria das associações de nematoides de vida livre com artrópodos é temporária, o que limitaria a potencial permuta da bactéria entre os grupos; *Wolbachia* poderia não ser capaz de tolerar o ambiente celular de um não-filariídeo.

Duron e Gavotte (2007) testaram a presença da bactéria nas três maiores famílias de nematoides não-filariídeos que parasitam artrópodos: Mermithidae, Steinernematidae e Heterorhabditidae. Além disso, eles examinaram duas espécies de Nematomorpha, que além de ser considerado um grupo irmão de Nematoda (Telford et al., 2008), também possui interações íntimas com artrópodos (Bleidorn et al., 2002). Das sete espécies analisadas, nenhuma apresentou infecção por *Wolbachia*. Para os autores, a bactéria seria incapaz de tolerar ambientes celulares que não os de artrópodos e filariídeos, os quais devem dividir alguma singularidade fisiológica que facilite a infecção e interação com o simbiote.

Tsai et al. (2007) documentaram a presença de *Wolbachia* no nematoide não-filariídeo, *Angiostrongylus cantonensis* Chen, 1935 (Strongylida: Metastrongylidae). Todavia, Foster et al. (2008) examinaram outros exemplares da mesma espécie e de *A. costaricensis* Morera e Céspedes, 1971 (Strongylida: Metastrongylidae) e não obtiveram nenhum positivo. Somado a isso, análises filogenéticas e de bioinformática das linhagens previamente descritas para *A. cantonensis* indicaram que elas são, provavelmente,

resultado da contaminação de DNA a partir de artrópodos e nematoides filariídeos (Foster et al., 2008).

Recentemente, Hudson e Floate (2009) apresentaram mais provas sobre a ausência da bactéria em Nematomorpha. Eles utilizaram o gene 16S rDNA para testar *Gordius robustus* Leidy, 1851 (Gordioidea: Gordiidae), parasito do grilo *Gryllus pennsylvanicus* Burmeister 1838 (Orthoptera: Gryllidae). Apesar de a última espécie possuir infecção por *Wolbachia*, os autores acreditam que a associação com um hospedeiro infectado pela bactéria não é suficiente para garantir a transmissão do simbionte do inseto para o nematomorfo.

Dessa forma, nossos resultados constituem o primeiro registro de *Wolbachia* para uma espécie da família Mermithidae, sendo esta a primeira vez que a infecção é noticiada em um nematoide endoparasito de artrópodos. Já que várias famílias de nematoides apresentam associação íntima com seus hospedeiros artrópodos, seria esperada uma transferência interespecífica da infecção, mesmo que fosse uma aquisição independente (Duron e Gavotte, 2007).

Dentre os artrópodos, os isópodos terrestres são o grupo mais frequentemente infectado pela bactéria, com uma taxa de infecção estimada em 61% (Bouchon et al., 2008). Uma vez que a transmissão horizontal é definida como a presença de linhagens similares ou idênticas em duas espécies de hospedeiros não relacionados (Haine et al., 2005), a grande similaridade observada entre as linhagens presentes no mermitídeo *Agamermis* sp. e no isópodos *A. vulgare* é um forte indício que uma transferência horizontal possa ter ocorrido entre ambos.

Agradecimentos

A Dra. Nora B. Camino da Universidad Nacional de La Plata (Buenos Aires, Argentina) pela identificação do mermitídeo. A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado a BLZ e ao CNPq pela concessão da bolsa de produtividade em pesquisa a PBA e pelo financiamento deste projeto (PBA - Processo N° 472381/2009-1; Dr. Luiz Roberto Malabarba – Processo N° 479412/2008-1).

Referências Bibliográficas

Bacescu M (1948) Quelques observations sur la faune benthonique du défilé Roumain du Danube: son importance zoogéographique et pratique; la description d'une espèce nouvelle de Mermithidae, *Pseudomermis cazanica* n. sp. Annales Scientifiques de l'Université de Jassy 31: 240-253.

Baker GL e Poinar Jr GO (1995) *Agamermis catadecaudata* n. Sp. (Nematoda: Mermithidae), a parasitoid of Orthoptera in south-eastern Australia. Fundam Appl Nematol 18 (2): 139-148.

Bandi C, Anderson TJ, Genchi C e Blaxter ML (1998) Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. Proc R Soc Lond B Biol Sci 265: 2407-2413.

Bandi C, McCall JW, Genchi C, Corona S, Venco L e Sacchi L (1999) Effects of tetracycline on the filarial worms *Brugia pahangi* and *Dirofilaria immitis* and their bacterial endosymbionts *Wolbachia*. Int J Parasitol 29: 357-364.

Bandi C, Trees AJ e Brattig NW (2001) *Wolbachia* in filarial nematodes: evolutionary aspects and implications for the pathogenesis and treatment of filarial diseases. Vet Parasitol 98: 215-238.

Bleidorn C, Schmidt-Rhaesa e A, Garey JR (2002) Systematic relationships of Nematomorpha based on molecular and morphological data. Invert Biol 121: 357-364.

Bordenstein SR, Fitch DHA e Werren JH (2003) Absence of *Wolbachia* in nonfilariid nematodes. J Nematol 35 (3): 266-270.

Bouchon D, Cordaux R e Grève, P (2008) Feminizing *Wolbachia* and the evolution of sex determination in isopods. In: Insect Symbiosis. Bourtzis K and Miller T (eds), CRC Press, pp 273-294.

Braig HR, Zhou W, Dobson SL e O'Neill SL (1998) Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont. J Bacteriol 180: 2373-2378.

Camino N (1989) *Limnomermis bonaerensis* sp.n. (Nematoda, Mermithidae) parasita de anfipodos (Crustacea, Malacostraca) em Argentina. Rev Iber Parasitol 49: 227-231.

Casiraghi M, Favia G, Cancrini G, Bartoloni A e Bandi C (2001) Molecular identification of *Wolbachia* from the filarial nematode *Mansonella ozzardi*. Parasitol Res 87 (5): 417-420.

Chirgwin SR, Porthouse KH, Nowling JM e Klei TR (2002) The filarial endosymbiont *Wolbachia* sp. is absent from *Setaria equina*. J Parasitol 88: 1248-1250.

Duron O e Gavotte L (2007) Absence of *Wolbachia* in nonfilariid worms parasitizing arthropods. Curr Microbiol 55: 193-197.

Foster JF, Kumar S, Ford L, Johnston KL, Ben R, Graeff-Teixeira C e Taylor MJ (2008) Absence of *Wolbachia* endobacteria in the non-filariid nematodes *Angiostrongylus cantonensis* and *A. costaricensis*. *Parasit Vectors* 1: 31.

Haine ER, Pickup NJ e Cook JM (2005) Horizontal transmission of *Wolbachia* in a *Drosophila* community. *Ecol Entomol* 30 (4): 464-472.

Hall TA (1999) BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41: 95-98.

Hoerauf A, Nissen-Pahle K, Schmetz C, Henkle-Duhrsen K, Blaxter ML, Buttner D, Gallin MY, Al-Qaoud KM, Lucius R e Fleischer B (1999) Tetracycline therapy targets intracellular bacteria in the filarial nematode *Litomosoides sigmodontis* and results in filarial infertility. *J Clin Invest* 103: 11-18.

Hudson AJ e Floate KD (2009) Further evidence for the absence of bacteria in horsehair worms (Nematomorpha: Gordiidae). *J Parasitol* 95 (6): 1545-1547.

Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.

McNulty SN, Foster JM, Mitreva M, Hotopp JC, Martin J, Fischer K, Wu B, Davis PJ, Kumar S, Brattig NW, Slatko BE, Weil GJ e Fischer PU (2010) Endosymbiont DNA in endobacteria-free filarial nematodes indicates ancient horizontal gene transfer. *PLoS One* 5 (6): e11029.

Merçot H e Poinso D (2009) Infection by *Wolbachia*: from passengers to residents. *C R Biol* 332: 284-297.

Nickle WR (1972) A contribution to our knowledge of the Mermithidae (Nematoda). *J Nematol* 4: 113-146.

O'Neill SL, Giordano R, Colbert AME, Karr TL e Robertson HM (1992) 16S rDNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 2699-2702.

Pettersen JJ (1985) Nematode parasites. In: Chapman HC (ed). *Biological control of mosquitoes*. American Mosquito Control Association, Bulletin No. 6, pp 110-122.

Poinar Jr GO (1981) *Thaumamermis cosgrovei* n. gen., n. sp. (Mermithidae: Nematoda) parasitizing terrestrial isopods (Isopoda: Oniscoidea). *Syst Parasitol* 2: 261-266.

Poinar Jr GO (1983) *The natural history of nematodes*. Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice-Hall, 323 pp.

Poinar Jr GO, Latham ADM e Poulin R (2002) *Thaumamermis zealandica* n. sp. (Mermithidae: Nematoda) parasitising the intertidal marine amphipod *Talorchestia quoyana* (Talitridae: Amphipoda) in New Zealand, with a summary of mermithids infecting amphipods. *Syst Parasitol* 53: 227-233.

Rubstov IA e Bekman MY (1979) Mermithids from gammarids of Baikal. *Zool Zhurnal* 58: 751- 754.

Stevens L, Giordano R e Fialho RF (2001) Male-killing, nematode infections, bacteriophage infection, and virulence of cytoplasmic bacteria in the genus *Wolbachia*. *Annu Rev Ecol Syst* 32: 519–545.

Stouthamer R, Breeuwer JAJ e G.D.D. Hurst GDD (1999) *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annu Rev Microbiol* 53: 71–102.

Telford MJ, Bourtat SJ, Economou A, Papillon D and Rota-Stabelli O (2008) The evolution of the ecdysozoa. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 363: 1529–1537.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F e Higgins DG (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 24: 4876-4882.

Tsai KH, Huang CG, Wang LC, Yu YW, Wu WJ e Chen WJ (2007) Molecular evidence for the endosymbiont *Wolbachia* in a non-filaroid nematode, *Angiostrongylus cantonensis*. *J Biomed Sci* 14: 607–615.

Werren JH e Bartos JD (2001) Recombination in *Wolbachia*. *Curr Biol* 11: 431–435.

Zhou W, Rousset F e O'Neill S (1998) Phylogeny and PCR based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 265: 509-515.

Tabela 1: Indivíduos de *Armadillidium vulgare* examinados quanto a presença de mermitídeos endoparasitos. Bs.As.: Província de Buenos Aires; RS: Rio Grande do Sul; BR: Brasil; AR: Argentina; UY: Uruguai.

♀	♂	Total de indivíduos testados	Localidade	Coordenadas geográficas
15	11	26	Augusto Pestana, RS/BR	28°29'02"S/53°57'60"O
8	14	22	Balcarce, Bs.As./AR	37°50'18"S/58°15'27"O
8	10	18	Barra do Ribeiro, RS/BR	30°15'22"S/51°19'20"O
1	3	4	Punta del Leste/UY	34°52'30"S/55°05'19"O
130	90	220	Porto Alegre, RS/BR	30°04'31"S/51°08'26"O
4	6	10	Montevideo/UY	34°53'05"S/56°08'15"O
166	134	300	Total	

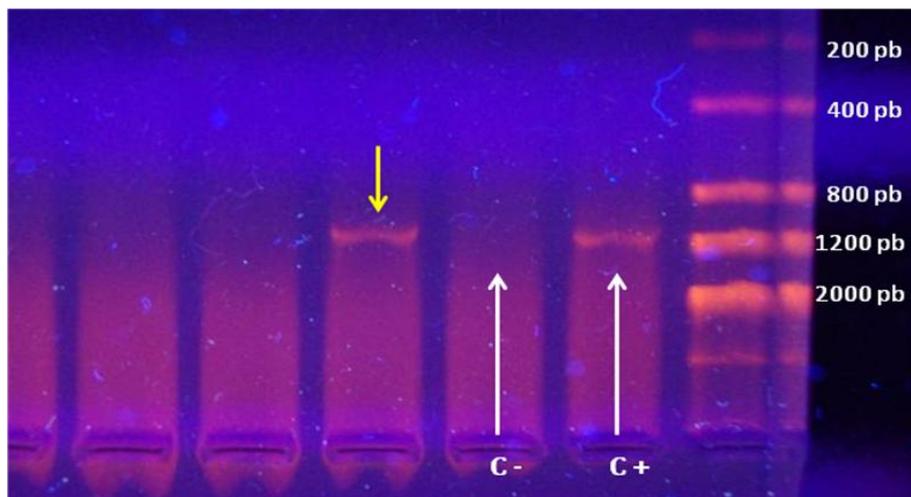


Figura 1. Fotografia do gel de agarose evidenciando a presença de *Wolbachia* no mermitídeo *Agamermis* sp. C +: controle positivo, C -: controle negativo (sem DNA).

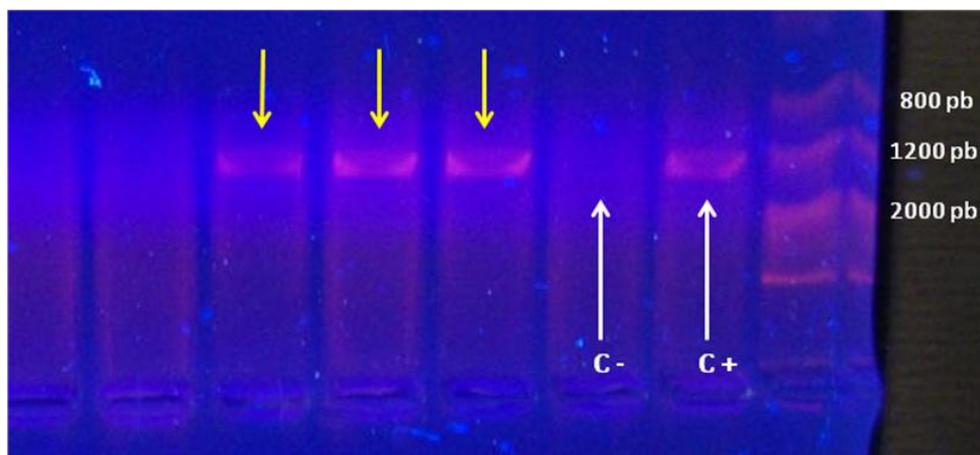


Figura 2. Fotografia do gel de agarose evidenciando a presença de *Wolbachia* em *Armadillidium vulgare*. C +: controle positivo, C -: controle negativo (sem DNA).

Capítulo 3

“Possíveis rotas de transmissão horizontal de *Wolbachia*
(Alphaproteobacteria, Rickettsiales) entre isópodos terrestres
(Crustacea, Oniscidea) e táxons ecologicamente relacionados”

Artigo redigido nas normas da revista *Genetics and Molecular Biology*

Zimmermann BL, Almerao MP, Bouchon D e Araujo PB. Possíveis rotas de transmissão horizontal de *Wolbachia* (Alphaproteobacteria, Rickettsiales) entre isópodos terrestres (Crustacea, Oniscidea) e táxons ecologicamente relacionados. *Genet Mol Biol*

Possíveis rotas de transmissão horizontal de *Wolbachia* (Alphaproteobacteria, Rickettsiales) entre isópodos terrestres (Crustacea, Oniscidea) e táxons ecologicamente relacionados

Bianca Laís Zimmermann¹, Maurício Pereira Almerão¹, Didier Bouchon² e Paula Beatriz Araujo¹.

1-Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul, Brasil. 2- Laboratoire Ecologie, Evolution, Symbiose, Université de Poitiers. Poitiers, France.

Rotas transmissão *Wolbachia*

Palavras-chave. *Wolbachia*, isópodos terrestres, transmissão horizontal, espécies associadas, 16S rDNA.

Autor correspondente: Bianca Laís Zimmermann. Prédio 43435, sala 214. Avenida Bento Gonçalves, 9500. 91501-970. Porto Alegre, RS, Brasil. 51-3308-7698. bia.lais@gmail.com

Abstract

Wolbachia is a group of bacteria that are obligate endosymbionts of arthropods and nematodes. The objective of this study was to investigate the occurrence of *Wolbachia* in species that are ecologically associated with terrestrial isopods, generating information to support inferences about the possible routes of horizontal transfer of the bacteria. A total of 12 associated species were analyzed (predators, parasites, phoretics, and animals that share the habitat). Only the mermithid nematode *Agamermis* sp., a parasite of the isopod *Armadillidium vulgare*, and mites of the family Scutacaridae, which are phoretics of *Balloniscus glaber*, proved to be infected by the bacteria. The sequences obtained for the endoparasite *Agamermis* sp. and for its isopod host *A. vulgare* are very similar to each other, and therefore the hypothesis that horizontal transmission between the two has occurred via the bacteria cannot be discarded. The sequences found in the mites, although distantly related to those of their host *B. glaber*, group close to those of *Burmoniscus meeusei*. This scenario is intriguing, and should be better investigated so that the phylogenetic proximity existing between these lineages can be understood.

Introdução

Wolbachia constitui um grupo de bactérias endossimbiontes obrigatórios de artrópodos e nematoides, as quais mantêm interações parasíticas e mutualísticas com seus hospedeiros (Bordenstein et al., 2009). Além de estarem entre os simbiontes mais vastamente distribuídos na face da terra, tais bactérias representam uma das maiores pandemias da história da vida (Riegler e O'Neill, 2006, Hilgenboecker et al., 2008).

A falta de congruência filogenética entre as espécies de artrópodos e as linhagens de *Wolbachia* que as parasitam sugere que a grande maioria dos hospedeiros adquiriu o simbionte via transmissão horizontal (Baldo et al., 2006). Ou seja, a manutenção global da bactéria dependeria das taxas de aquisição e perda de infecção, relacionadas à sua habilidade de ser transmitida entre as espécies (Werren et al., 2008).

De acordo com Stahlhut et al. (2010) três fatores são potencialmente importantes na troca de linhagens de *Wolbachia* entre as espécies de artrópodos na natureza. Primeiramente, a transmissão horizontal seria afetada pela similaridade filogenética da espécie hospedeira doadora e receptora. Em outras palavras, seria esperado que organismos muito relacionados possuíssem linhagens de *Wolbachia* similares. Tais similaridades já foram registradas em alguns estudos (Rigaud et al., 1995, Baldo et al., 2008, Russell et al., 2009). Todavia, tal fenômeno, embora menos provável, também poderia estar relacionado a fatores como recombinação e introgressão (Baldo et al., 2006, Verne et al., 2007, Raychoudhury et al., 2009).

Segundo, uma vez que a transferência horizontal requer o movimento físico da bactéria entre um artrópodo e outro, a proximidade geográfica entre a espécie doadora e receptora seria um pré-requisito para a transmissão. Logo, seria previsto que espécies simpátricas contivessem linhagens mais semelhantes do simbionte.

Por último, associações ecológicas poderiam proporcionar meios para a transmissão horizontal. Estas associações, entre outros fatores, envolveriam a divisão de parasitóides (Heath et al., 1999, Vavre et al., 1999), plantas hospedeiras (Sintupachee et al., 2006), substratos alimentares (Huigens et al., 2004, Stahlhut et al., 2010), predadores, parasitos e foréticos (Cordaux et al., 2001).

Tendo em vista estas hipóteses de possíveis rotas de troca de *Wolbachia* entre espécies, o objetivo deste trabalho foi investigar a ocorrência da bactéria em espécies que possuem associações ecológicas com os isópodos terrestres, no sul da América do Sul e inferir sobre as possíveis rotas de transferência horizontal da mesma.

Material e Métodos

Coleta

Para as análises foram selecionados animais que possuem associações ecológicas já conhecidas com os isópodos terrestres. Como predadores foram selecionados formigas e opiliões, que além de utilizarem os isópodos como item de sua dieta (Sunderland e Sutton, 1980, Santos e Gnaspini, 2002) são muito abundantes nos locais de coleta dos mesmos. Os predadores foram coletados com auxílio de armadilhas, utilizando-se isópodos terrestres como iscas. Endoparasitos, no caso, nematoides, e ácaros foréticos foram coletados na cavidade interior e sobre a cutícula dos isópodos terrestres, respectivamente. Além destes, também foram testados anfípodos terrestres, que são filogeneticamente relacionados e muitas vezes ocorrem em simpatria com os últimos. Os animais associados e os isópodos terrestres foram coletados em municípios do Rio Grande do Sul e em Montevideu no Uruguai, e fixados em etanol absoluto para posterior extração de DNA.

Extração DNA

Os isópodos terrestres utilizados neste estudo foram dissecados conforme condições previstas por Bouchon et al. (1998). As extrações de DNA foram realizadas a partir de tecido reprodutivo (ovários das fêmeas e utrículos (porção final dos segmentos testiculares) dos machos), parte do tecido nervoso (cordão nervoso) e parte do tecido muscular (musculatura da base dos pereiópodos), utilizando-se o protocolo Chelex (Bio Rad). O tecido dissecado de cada animal foi macerado em tubos de polipropileno de 1,5 ml, em uma solução de 100 µl de Chelex 5% (fase líquida) e 5 µl de proteinase K (20 mg/ml). Após foi acrescentado mais 20 µl de Chelex 5% (fase precipitada). A mistura foi mantida em banho-maria a 56°C por 30 minutos para rompimento dos tecidos, membranas celulares e digestão das proteínas pela proteinase K. Posteriormente a solução foi incubada a 95-100°C por 5 minutos, e por fim ela foi centrifugada por 8 segundos, para que nenhum produto ficasse contido na parede do tubo de extração. O DNA extraído foi conservado a -20°C.

A extração dos ácaros, nematoides, opiliões, formigas e anfípodos foi realizada com auxílio do kit de extração PureLink Genomic DNA Kits (K1820-01) para 50 reações da Invitrogen, utilizando-se o animal inteiro. O DNA extraído foi também conservado a -20°C.

Detecção de *Wolbachia* através da PCR

De modo a controlar duas possíveis falhas nas amplificações com os *primers* 16S rDNA, (i) falha no processo de extração de DNA; e/ou (ii) concentração incorreta da solução de DNA (Werren et al., 1995) foram testadas as amostras tidas como negativas com *primers* da subunidade I do gene mitocondrial Citocromo Oxidase (COI) (Folmer et

al., 1994). Amostras que geraram um produto de tamanho esperado foram consideradas verdadeiramente negativas para presença de *Wolbachia*.

PCR, Purificação e Sequenciamento

As PCR's diagnósticas foram realizadas utilizando-se o gene 16S rDNA, utilizando-se os seguintes *primers*: 99F 5'- TTG TAG CCT GCT ATG GTA TAA CT - 3' e 994R 5' - GAA TAG GTA TGA TTT TCA TGT - 3' (O'Neill et al., 1992), os quais geram fragmentos de aproximadamente 900 bp. As PCR's foram realizadas em volumes de 25µl, sendo 1,0 µl de DNA (concentração não determinada), 0,16 µl de Taq Platinum (5U/µl) (Invitrogen), 2,5 µl de tampão 10X (Invitrogen), 1,6 µl de MgCl₂ (50 mM) (Invitrogen), 0,5 µl de iniciador direto (20 µM), 0,5 µl de iniciador reverso (20 µM), 0,5 µl de dNTPs (10 mM) (Invitrogen) e 18,18 µl de H₂O ultra pura. Para as ampliações foram utilizadas as seguintes configurações: 35 ciclos (1 min a 95°C, 1 min a 50.6°C, 1 min a 72°C), incluindo um passo de desnaturação inicial de 95°C por 2 min e um passo de extensão final de 72°C por 5 min. Como controle positivo da reação de PCR foi utilizado DNA extraído de um indivíduo da espécie *Balloniscus glaber* Araujo e Zardo, 1995 (Isopoda: Balloniscidae), infectado por *Wolbachia*.

Cerca de 4 µl de produto de PCR foram submetidos à eletroforese, a fim de checar o sucesso da PCR. As eletroforeses foram realizadas em gel de agarose 1%, em cubas horizontais, com tampão de corrida TBE 0,5X (5,4 g de Tris, 2,75 g de ácido bórico, 2 ml de EDTA 0,5M pH 8 e água destilada), a uma voltagem aproximada de 80V. Às amostras aplicadas no gel foram adicionados 2 µl de azul de bromofenol (no qual havia sido previamente acrescentado 1 µl/ml de gel Red), para posterior visualização dos fragmentos de DNA no transluminador UV.

Os fragmentos de DNA amplificados foram enviados para a empresa MACROGEN Advancing through Genomics na Coréia do Sul para purificação e sequenciamento dos mesmos. A empresa utiliza o protocolo BigDye™ Terminator, sendo o sequenciamento conduzido em 3730xl DNA analyzer. Todas as sequências serão posteriormente depositadas no banco de dados do Genbank-EMBL (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Análises filogenéticas

Além das sequências 16S rDNA de linhagens de *Wolbachia* encontradas nos isópodos terrestres (já descritas no capítulo 1), foram utilizadas quatro sequências de *Wolbachia* de uma espécie de ácaro forético de *B. glaber* e uma sequência de um nematoide parasita (*Agamermis* sp. Cobb, Steiner e Christie, 1923 (Mermithida: Mermithidae)) de *Armadillidium vulgare* Latreille, 1804 (Isopoda: Armadillidiidae). Todas as sequências foram alinhadas no programa Clustal X (Thompson et al., 1997) e o alinhamento inspecionado visualmente através do programa Bioedit (Hall, 1999). O alinhamento foi melhorado através da verificação da estrutura secundária das sequências de 16S rDNA de acordo com o banco de dados RDP (Ribosomal Database Project) (<http://rdp.cme.msu.edu/>). Análises para verificar possíveis eventos de recombinação foram realizadas no programa RDP 2.0 (Martin et al., 2005).

As filogenias das linhagens de *Wolbachia* foram estimadas através do método de Máxima Verossimilhança implementado no programa PAUP*4.10b (Swofford, 2003) e do método Bayesiano implementado no programa MrBayes (Huelsenbeck e Ronquist, 2001). Para o método de Máxima Verossimilhança foi utilizado o modelo evolutivo GTR++ Γ , selecionado no programa Modeltest 3.7 pelo critério de informação Akaike (CIA) (Posada e Crandall, 1998; Posada e Buckley, 2004). Os pesos de Akaike foram

utilizados para estimar os valores de parâmetros relevantes no modelo selecionado. As árvores foram geradas por meio de buscas heurísticas com bissecção e reconecção das árvores (*tree bisection and reconnection* - TBR) através de rearranjos (*branch swapping*) aleatórios dos ramos. O suporte para cada agrupamento foi acessado após 1000 replicações de *bootstrap* através da busca heurística de rearranjos (*branch swapping*) dos ramos vizinhos mais próximos (*nearest-neighbor interchange* - NNI). Para o método Bayesiano as árvores foram analisadas simultaneamente através de MCMC com 100,000,000 passos baseado no modelo GTR++ Γ no processo de especiação de Yule e assumindo um relógio molecular log normal relaxado (Drummond et al., 2006).

Resultados

Neste estudo, foram testadas para a presença de *Wolbachia*, 12 espécies de artrópodos que apresentam associações ecológicas conhecidas com os isópodos terrestres (predadores, parasitos, foréticos e animais que vivem sob as mesmas condições ecológicas) (Tabela 1). Das relações de predação e compartilhamento de hábitat, nenhuma espécie associada com os isópodos terrestres estava infectada. Apenas o mermitídeo *Agamermis sp.* (Figura 1), parasito de *A. vulgare* e os ácaros da família Scutacaridae (Figura 2), foréticos de *B. glaber* apresentaram a infecção pela bactéria. Além disso, todas as amostras testadas com COI apresentaram resultados positivos, evidenciando que não houve falha no processo de extração nem na concentração de DNA utilizada nas PCRs.

As linhagens de *Wolbachia* obtidas de *Agamermis sp.* e de seu hospedeiro *A. vulgare* são muito similares entre si, estando proximamente agrupadas. Já as sequências de *Wolbachia* encontradas nos ácaros, agruparam fora do supergrupo B (supergrupo típico das linhagens presentes em isópodos terrestres) e, conseqüentemente, muito

distantes das linhagens encontradas em seus forontes. Todavia, as sequências presentes nos foréticos se agruparam próximas as do isópodo terrestre *Burmoniscus meeusei* Holthuis, 1946 (Isopoda: Philosciidae) (Figura 3).

Discussão

A transmissão horizontal desempenha papel fundamental para a bactéria *Wolbachia*, uma vez que permite que a mesma infecte uma grande variedade de organismos por todo o mundo. Mesmo que as evidências da existência da transmissão horizontal sejam fortes, os mecanismos que governam esse modo de transmissão ainda não são totalmente entendidos (Stahlhut et al., 2010).

Uma vez que a transferência horizontal requer um contato íntimo entre as espécies para que ocorra a transmissão da bactéria (Vavre et al., 1999), testamos, neste trabalho, a presença da *Wolbachia* em organismos que apresentam associação ecológica com os isópodos terrestres. Tais associações requeririam um contato próximo entre as espécies participantes, o que facilitaria ou oportunizaria a troca de *Wolbachia* entre as mesmas.

De todas as relações analisadas no presente trabalho, apenas na forésia e no parasitismo os tatuzinhos e as espécies associadas apresentaram a infecção. Tais organismos de fato possuem contato íntimo com seus forontes e hospedeiros, pois conforme Iraola (2001) a forésia de ácaros sobre artrópodos é muito comum, sendo que além do transporte, os ácaros se alimentariam dos excrementos, de substâncias que se fixam na quitina ou até mesmo roubariam o alimento de seu hospedeiro. Membros da família Scutacaridae são encontrados em uma variedade de habitats (solo, húmus, estrume, serapilheira, em pequenos pássaros e ninhos de mamíferos, sobre insetos e outros ácaros) (Delfinado et al., 1976) e são largamente distribuídos (Ebermanna e

Moser, 2008, Rodrigues et al., 2001); e segundo Nickle (1972) nematoides da família Mermithidae são usualmente encontrados nas cavidades corporais de seus hospedeiros artrópodos, onde utilizam os fluídos corporais dos mesmos para seu crescimento e desenvolvimento. Representantes do gênero *Agamermis* são animais usualmente grandes (30-465 mm), parasitos de artrópodos terrestres e apresentam distribuição cosmopolita (Nickle, 1972, Baker e Poinar Jr, 1995)

Neste estudo, nenhum predador associado com os isópodos terrestres apresentou a infecção. No entanto, essa rota de transmissão horizontal seria improvável, uma vez que dificilmente o simbionte sobreviveria ao trato digestivo do predador (Cordaux et al., 2001). Já em relação aos anfípodos, os quais também não apresentaram a infecção, é possível que, apesar dos mesmos viverem sob as mesmas condições ecológicas dos isópodos terrestres, os dois grupos não apresentem um contato tão íntimo que permitiria a permuta da bactéria. Muitas pesquisas têm demonstrado que certos grupos taxonômicos são mais propensos a adquirirem *Wolbachia* do que outros (Werren e Windsor, 2000) e, além disso, a não detecção da bactéria poderia ser explicada porque a mesma nunca teria infectado as populações amostradas, porque algum mecanismo evolutivo manteria a prevalência de infecção a baixos níveis, o que diminuiria as chances de coletar indivíduos infectados (Almerão et al., submetido), ou ainda porque o n amostral utilizado não foi suficientemente adequado.

Em um estudo similar, Cordaux et al. (2001) inferiram sobre as possíveis rotas de transmissão horizontal em crustáceos, em especial em isópodos terrestres. Os autores testaram, para presença de *Wolbachia*, os participantes das associações ecológicas de predação, endoparasitismo, parasitoidismo, forésia e divisão de hábitat para verificar seus potenciais papéis na transferência da bactéria. Segundo os autores, a proximidade filogenética das linhagens de *Wolbachia* encontradas nas moscas

parasitóides (Rhinophoridae) e ácaros foréticos (Oribatida), com aquelas dos isópodos terrestres, suportam a hipótese de uma transmissão horizontal entre esses grupos. Ademais, a similaridade filogenética de linhagens presentes em isópodos estuarinos (*Sphaeroma rugicauda* Leach, 1814, Isopoda: Sphaeromatidae) e isópodos semi-terrestres de zonas costeiras (*Ligia oceanica* Linnaeus, 1767, Isopoda: Ligiidae) apontaria que tal transmissão pudesse ocorrer entre crustáceos não relacionados, mas que vivem sob as mesmas condições ecológicas.

No presente trabalho foi possível observar que a sequência obtida a partir do nematoide endoparasito *Agamermis* sp. apresentou grande similaridade com a de seu hospedeiro *A. vulgare*. Dessa forma, a suposição de que a transferência horizontal de *Wolbachia* tenha ocorrido entre ambos é corroborada pelos nossos resultados. Segundo Noda et al. (2001) a presença de sequências idênticas de *Wolbachia* nos homópteros *Laodelphax striatellus* Fallen, 1826 e *Sogatella furcifera* Horváth, 1899 (Homoptera: Delphacidae) e seu endoparasito o estrepsíptero *Elenchus japonicus* Esaki & Hashimoto, 1931 (Strepsiptera: Elenchidae), suporta fortemente a ideia de que houve uma transferência horizontal entre eles.

Por outro lado, as linhagens presentes nos ácaros foréticos são muito dissimilares daquelas presentes em seus forontes, *B. glaber*, o que não suportaria a hipótese de transmissão horizontal entre eles. Em outras palavras, a origem da infecção nestes dois organismos provém de outras fontes (foi adquirida a partir de algum outro organismo infectado) e não da relação ecológica que ambos mantêm. Da mesma forma, apesar de Cordaux et al. (2001) terem encontrado *Wolbachia* em espécies de aranhas predadoras e em espécies de isópodos terrestres utilizados como suas presas, as linhagens de ambos eram muito dissimilares, o que inviabilizaria a suposição da ocorrência de transmissão horizontal nestes artrópodos.

Além de não serem similares as de seu foronte, as sequências dos ácaros não se agruparam em nenhum supergrupo conhecido de *Wolbachia*, assim como as linhagens presentes em de *B. meeusei*. Tais linhagens formaram um agrupamento, mas seria precipitado afirmar que a bactéria possa ter se movido entre estes organismos, pois além do suporte de *bootstrap* não ser alto (MV *bootstrap* 57), não se sabe se tais ácaros também utilizam *B. meeusei* como forontes. Dessa forma, mais investigações precisam ser realizadas para se tentar esclarecer e compreender a posição filogenética destas linhagens.

Este trabalho é pioneiro no que diz respeito ao estudo da transmissão horizontal de *Wolbachia* entre os isópodos terrestres e espécies que apresentam associações ecológicas com os mesmo na região Neotropical. Todavia, muitos outros estudos são necessários, nos quais mais espécies de predadores (quilópodos, aranhas, besouros), endoparasitos (mais espécies de nematoides e nematomorfos) e de animais que compartilham o mesmo hábitat (diversos insetos) precisam ser testadas, assim como outras relações ecológicas (por exemplo, o parasitoidismo), pois só no momento que possuímos dados mais abrangentes é que será possível visualizar um cenário mais real de como se dá a transferência de *Wolbachia* entre essas espécies.

Agradecimentos

Ao Dr. Aníbal Ramadan Oliveira da Universidade Estadual de Santa Cruz (Ilhéus, BA) pela identificação dos ácaros, ao Dr. Adriano Brilhante Kury do Museu Nacional (Rio de Janeiro, RJ) pela identificação dos opiliões, a Dra. Nora B. Camino da Universidad Nacional de La Plata (Buenos Aires, Argentina) pela identificação do mermitídeo e a Dra. Aline Ferreira de Quadros da Universidade Federal da Integração Latino-Americana (Foz do Iguaçu, PR) pela identificação das formigas. A CAPES pela concessão da bolsa de

mestrado a BLZ e ao CNPq pela concessão da bolsa de produtividade em pesquisa a Dra. PBA e pelo financiamento deste projeto (PBA - Processo N° 472381/2009-1; Dr. Luiz Roberto Malabarba - Processo N° 479412/2008-1).

Referências Bibliográficas

Almerão MP, Fagundes NJR, Araujo AM, Araujo PB, Grandjean F e Bouchon D (submetido) First record of *Wolbachia* in south american terrestrial isopods: High diversity of *Wolbachia* strains in two species of genus *Balloniscus* (Crustacea: Oniscidea).

Baker GL e Poinar Jr GO (1995) *Agamermis catadecaudata* n. Sp. (Nematoda: Mennithidae), a parasitoid of Orthoptera in south-eastern Australia. *Fundam Appl Nemawl* 18 (2): 139-148.

Baldo L, Dunning Hotopp JC, Jolley KA, Bordenstein SR, Biber AS, Choudhury RR, Hayashi C, Maiden MC, Tettelin H e Werren JH (2006) Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Appl Environ Microbiol* 72: 7098–7110.

Baldo L, Nadia A, Ayoub NA, Hayashi CY, Russell JA, Stahlhut JK e Werren JH (2008) Insight into the routes of *Wolbachia* invasion: high levels of horizontal transfer in the spider genus *Agelenopsis* revealed by *Wolbachia* strain and mitochondrial DNA diversity. *Mol Ecol* 17: 557–569.

Bordenstein SR, Paraskevopoulos C, Hotopp JC, Sapountzis P, Lo N, Bandi C, Tettelin H, Werren JH e Bourtzis K (2009) Parasitism and mutualism in *Wolbachia*: what the phylogenomic trees can and cannot say. *Mol Biol Evol* 26(1): 231–241.

Bouchon D, Rigaud T e Juchault P (1998) Evidence for widespread *Wolbachia* infection in isopod crustaceans: molecular identification and host feminization. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 265: 1081-1090.

Cordaux R, Michel-Salzat A e Bouchon (2001) *Wolbachia* infection in crustaceans: novel hosts and potential routes for horizontal transmission. *J Evol Biol* 14: 237-243.

Delfinado MD, Baker and EWe Abbatiello MJ (1976) Terrestrial Mites of New York-III. The Family Scutacaridae (Acarina). 84 (2): 106-145.

Drummond AJ, Ho SYW, Phillips MJ e Rambaut A (2006) Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLOS Biol* 4, 699-710.

Ebermanna E e Moser JC (2008) Mites (Acari: Scutacaridae) associated with the red imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae), from Louisiana and Tennessee, U.S.A. *Intemat J Acarol* 34 (1): 55-69.

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R e Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol* 3: 294–299.

Hall TA (1999) BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41: 95–98.

Heath BD, Butcher RJ, Whitfield WGF e Hubbard SF (1999) Horizontal transfer of *Wolbachia* between phylogenetically distant insect species by a natural occurring mechanism. *Curr Microbiol* 9: 313–316.

Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, Telschow A e Werren JH (2008) How many species are infected with *Wolbachia*?—A statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol Lett* 281: 215–220.

Huelsenbeck JP e Ronquist F (2001) MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17: 754–755.

Huigens ME, Almeida RP, Boons PAH, Luck RF e Stouthamer R (2004) Natural interspecific and intraspecific horizontal transfer of parthenogenesis-inducing *Wolbachia* in *Trichogramma* wasps. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 271: 509–515.

Iraola V (2001) Introducción a los ácaros (II): Hábitats e importancia para el hombre. *Aracnet 7 - Bol. S.E.A., n° 28*: 141—146.

Martin DP, Williamson C e Posada D (2005) RDP2: recombination detection and analysis from sequence alignments. *Bioinformatics* 21: 260-262.

Nickle WR (1972) A contribution to our knowledge of the Mermithidae (Nematoda). *J Nematol* 4: 113-146.

Noda H, Miyoshi T, Zhang Q, Watanabe K, Deng K e Hoshizaki S (2001) *Wolbachia* infection shared among planthoppers (Homoptera: Delphacidae) and their endoparasite (Strepsiptera: Elenchidae): a probable case of interspecies transmission. *Mol Ecol* 10 (8): 2001-2006.

O'Neill SL, Giordano R, Colbert AME, Karr TL e Robertson HM (1992) 16S rDNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 94: 2699-2702.

Posada D e Buckley TR (2004) Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of akaike information criterion and bayesian approaches over likelihood Ratio Tests. *Syst Biol* 53(5): 793–808.

Posada D e Crandall KA (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14(9): 817-818.

Raychoudhury R, Baldo L, Oliveira DCSG e Werren JH (2009) Modes of acquisition of *Wolbachia*: horizontal transfer, hybrid introgression and co-divergence in the *Nasonia* species complex. *Evolution* 63: 165–183.

Riegler M e O'Neill SL (2006) The genus *Wolbachia*, in M.M. Dworkin; S. Falkow; E. Rosenberg; K.H. Schleifer, E. Stackebrandt (Eds.). *The Prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria. Vol 5: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses*, 3rd ed., Springer, New York, NY, pp 547-561.

Rigaud T e Juchault P (1995) Success and failure of horizontal transfers of feminizing *Wolbachia* endosymbionts in woodlice. *J Evol Biol* 8: 249-255.

Rodrigues SR, Marchini LC e Carbonari JJ (2001) Ácaros das Famílias Scutacaridae e Pygmephoridae (Acari: Heterostigmata) Associados a Besouros Coprófagos (Coleoptera: Scarabaeidae) no Brasil. *Neotrop Entomol* 30 (3): 387-390.

Russel JA, Goldman-Huertas B e Moreau CS (2009) Host specificity and geographic isolation among *Wolbachia* from ants and butterflies. *Evolution* 63: 624-640.

Santos FH e Gnaspini P (2002) Notes on the foraging behavior of the Brazilian cave harvestman *Goniosoma spelaeum* (Opiliones: Gonyleptidae). *J Arachnol* 30: 177-180.

Sintuphachee S, Milne JR, Poonchaisri S, Baimai V e Kittayapong P (2006) Closely related *Wolbachia* strains within the pumpkin arthropod community and the potential for horizontal transmission via the plant. *Microb Ecol* 51: 294-301.

Stahlhul JK, Desjardins CA, Clark ME, Baldo L; Russell JA, Werren JH e Jaenike J (2010) The mushroom habitat as an ecological arena for global exchange of *Wolbachia*. *Microb Ecol* 19 (9): 1940-1952.

Sunderland KD e Sutton SL (1980) A Serological study of arthropod predation on woodlice in a dune grassland ecosystem. *J Anim Ecol* 49 (3): 987-1004.

Swofford DL (2003) PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F e Higgins DG (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 24: 4876-4882.

Vavre F, Fleury F, Lepetit D, Fouillet P e Boulétreau M (1999) Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations. *Mol Biol Evol* 16: 1711-1723.

Verne S, Johnson M, Bouchon D e Grandjean F (2007) Evidence for recombination between feminizing *Wolbachia* in the isopod genus *Armadillidium*. *Gene* 397: 58-66.

Werren JH e Windsor DM (2000) *Wolbachia* infection frequencies in insects evidence of a global equilibrium? *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 267: 1277-1285.

Werren JH, Balbo L e Clark ME (2008) *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat Rev Microbiol* 6: 741-751.

Werren JH, Windsor D e Guo LR (1995) Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 262: 197-204.

Tabela 1: Prevalência de infecção por *Wolbachia* nos isópodos terrestres e espécies. NI: espécie não identificada; IT: indivíduos testados; II: indivíduos infectados.

Associação ecológica (isópodo terrestre/espécie associada)	IT	IF	Local de Coleta
Predação			
<i>Atlantoscia floridana</i> , <i>Armadillidium vulgare</i> / <i>Pachycondyla striata</i> (Arthropoda, Hymenoptera, Formicidae)	20	0	Porto Alegre, RS/BR
<i>Atlantoscia floridana</i> , <i>Armadillidium vulgare</i> / <i>Odontomachus</i> sp. (Arthropoda, Hymenoptera, Formicidae)	3	0	Porto Alegre, RS/BR
<i>Atlantoscia floridana</i> , <i>Burmoniscus meeusei</i> / <i>Mischonyx squalidus</i> (Arthropoda, Opiliones, Gonyleptidae)	19	0	Porto Alegre, RS/BR
<i>Atlantoscia floridana</i> / <i>Metalibitia paraguayensis</i> (Arthropoda, Opiliones, Cosmetidae)	1	0	Barra do Ribeiro, RS/BR
<i>Atlantoscia floridana</i> / <i>Pachyloides iheringi</i> (Arthropoda, Opiliones, Gonyleptidae)	1	0	Barra do Ribeiro, RS/BR
<i>Atlantoscia floridana</i> / <i>Geraecormobius sylvarum</i> (Arthropoda, Opiliones, Gonyleptidae)	1	0	Barra do Ribeiro, RS/BR
Parasitismo			
<i>Armadillidium vulgare</i> / <i>Agamermis</i> sp. (Nematoda, Mermithida, Mermithidae)	1	1	Montevideú/UY
<i>Porcellionides pruinosus</i> / sp. 1 NI (Nematoda)	12	0	Augusto Pestana, RS/BR
Foresia			
<i>Balloniscus glaber</i> / <i>Hoplophthiracarus proximus</i> (Arthropoda, Acari, Phthiracaridae)	1	0	Porto Alegre, RS/BR
<i>Balloniscus glaber</i> / sp. 1 NI (Arthropoda, Acari, Ascidae)	2	0	Porto Alegre, RS/BR
<i>Balloniscus glaber</i> / sp. 2 NI (Arthropoda, Acari, Scutacaridae)	23	4	Porto Alegre, RS/BR
Compartilhamento de hábitat			
<i>Talitroides topitotum</i> (Arthropoda, Amphipoda, Talitridae)	20	0	Porto Alegre, RS/BR
Total	104	5	

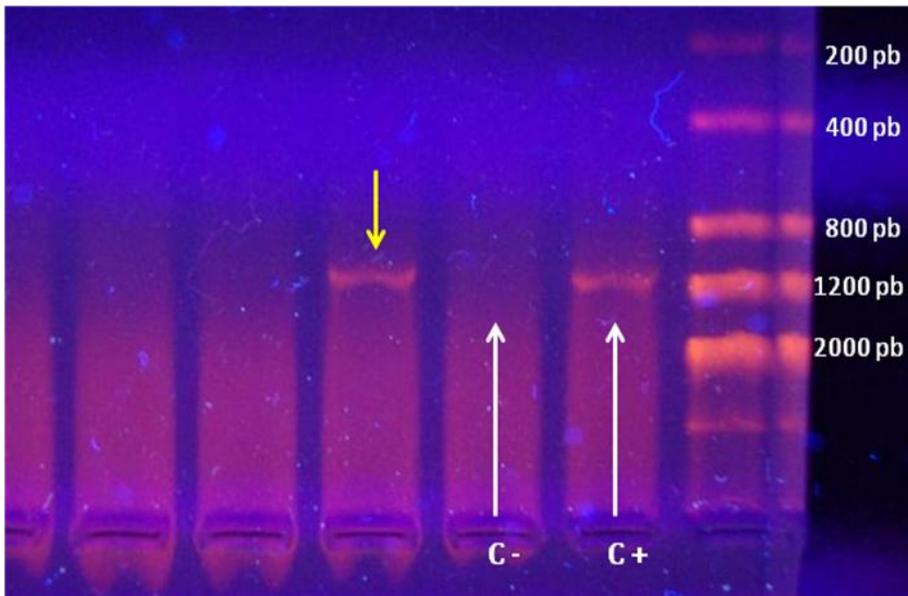


Figura 1. Fotografia de gel de agarose evidenciando a presença de *Wolbachia* no mermitídeo *Agamermis* sp. C +: controle positivo, C -: controle negativo (sem DNA).

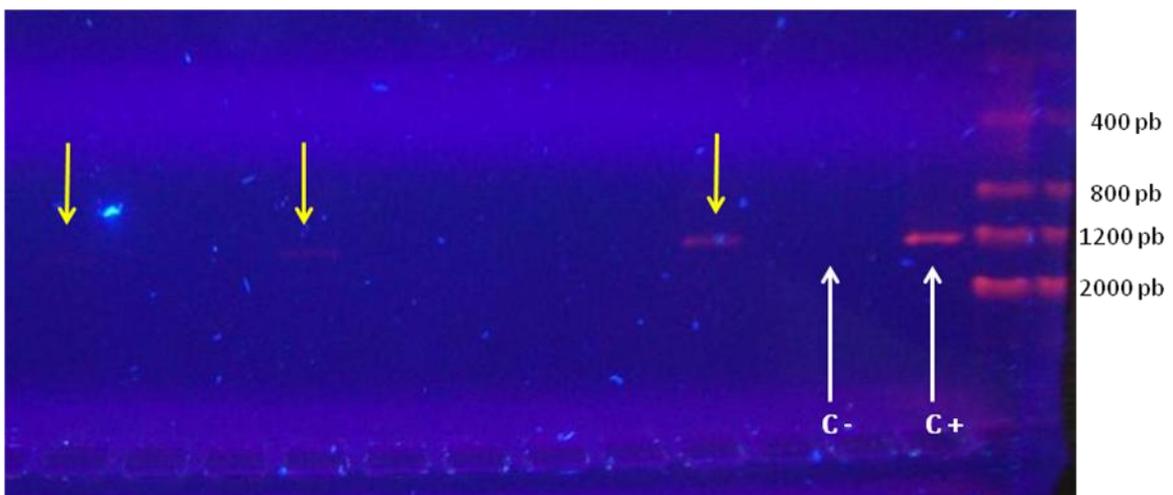


Figura 2. Fotografia de gel de agarose evidenciando a presença de *Wolbachia* ácaros forético da família Scutacaridae. C +: controle positivo, C -: controle negativo (sem DNA).

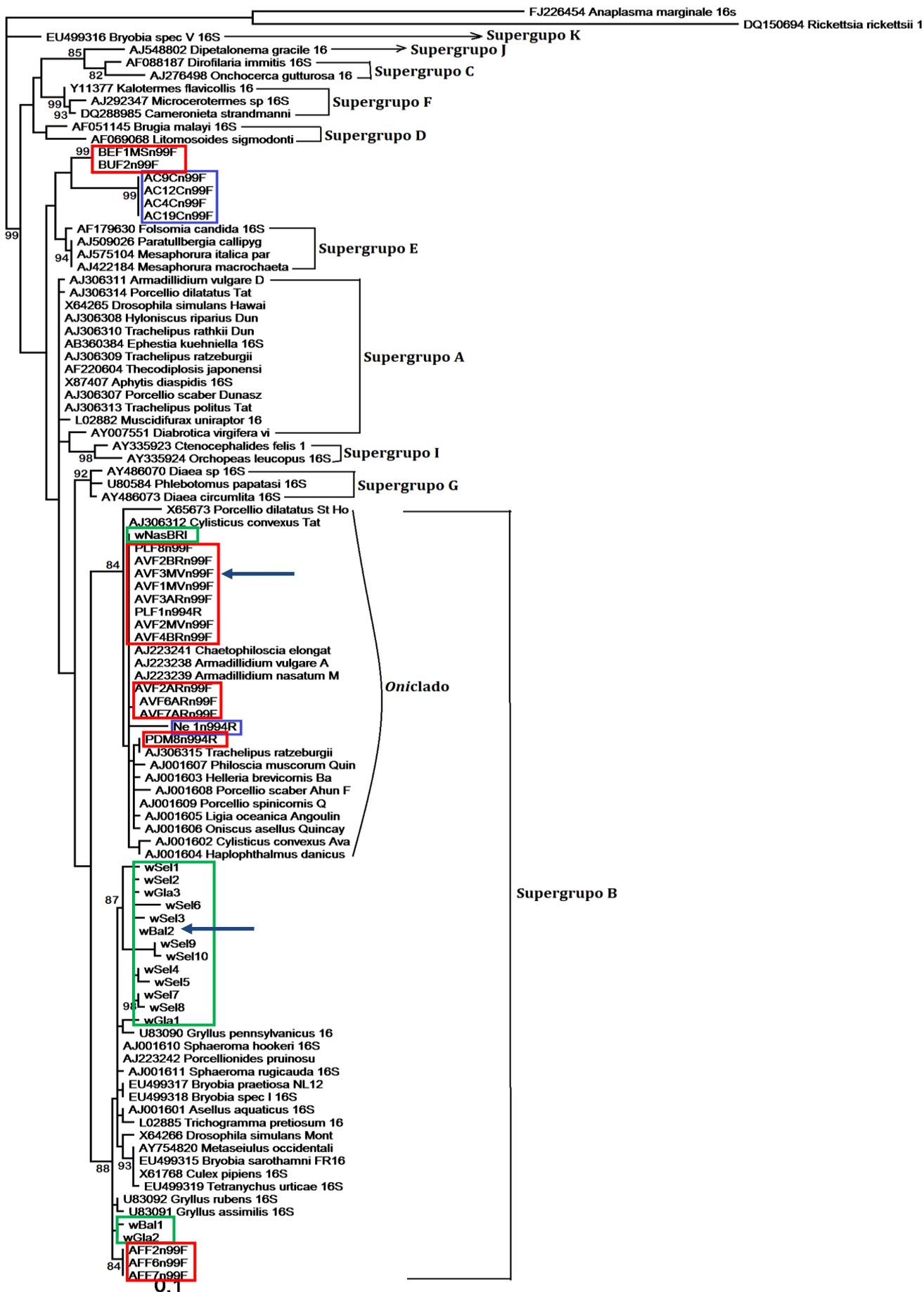


Figura 3: Árvore de Máxima Verossimilhança das linhagens de *Wolbachia*. As linhagens destacadas em azul são aquelas encontradas nas espécies associadas com os isópodos terrestres. As flexas em azul representam as linhagens das espécies de isópodos terrestres cujas espécies associadas apresentaram a infecção por *Wolbachia*. As linhagens destacadas em vermelhos são aquelas encontradas no presente estudo; as destacadas em verde foram encontradas por Almerão et al. (submetido) no Rio Grande do Sul. AC: ácaros foréticos; AF: *Atlantoscia floridana*; AV: *Armadillidium vulgare*; BE e BU: *Burmoniscus meeusei*; wSel: *Balloniscus sellowii*; wGla: *Balloniscus glaber*; wBal: linhagem encontrada tanto em *Balloniscus sellowii* quanto em *Balloniscus glaber*; wNas: *Armadillidium nasatum*; PD: *Porcellio dilatatus*; PL: *Porcellio laevis*; NE: nematoide. Foram considerados apenas valores de *bootstrap* acima de 75 (os valores maiores que 75 correspondem a valores ainda mais altos de probabilidade posterior da análise Bayesiana). As sequências do supergrupo H (linhagens encontradas em Isoptera, mas especificamente em espécies do gênero *Zootermopsis*) não foram incluídas, pois aquelas depositadas no NCBI (National Center for Biotechnology Information) para o gene 16S rDNA são muito curtas. Dessa forma, optamos por não incluí-las, pois estaríamos perdendo muito informação dentro do nosso alinhamento.

Considerações finais

Devido à escassez de estudos sobre as bactérias e seus hospedeiros na região Neotropical, especialmente tratando-se de hospedeiros isópodos terrestres, a presente dissertação busca evidências para elucidar a relação simbiótica acima mencionada.

No presente trabalho, além do registro de novas infecções por *Wolbachia* nos isópodos terrestres, observou-se que as linhagens da bactéria presentes nas espécies nativas são muito distintas daquelas já descritas para estes organismos. Em relação à prevalência de infecção encontrada neste estudo, o valor obtido foi baixo se comparado a estimativa feita por Bouchon et al. (2008) de 61%. Será que tivemos dificuldade em encontrar indivíduos infectados ou apenas a prevalência é menor na região Neotropical? Será que a estimativa de Bouchon et al. é válida para todo o mundo, uma vez que a grande maioria dos estudos são feitos na Europa? Considerando-se a variabilidade genética, por que será que nossas linhagens são tão mais diversas? Assim, há a necessidade de testar mais espécies originárias da América do Sul para compreender melhor esses resultados. Além disso, apesar do 16S rDNA se mostrar mais eficiente na detecção de *Wolbachia* em isópodos terrestres neotropicais, em estudos posteriores seria interessante utilizar mais de um gene para as inferências filogenéticas, pois todos possuem certas limitações quando utilizados de forma isolada, mas em conjunto, eles podem gerar filogenias mais bem resolvidas.

Uma questão intrigante que precisa ser melhor avaliada é a posição filogenética da linhagem da bactéria presente em *Burmoniscus meeusei*, uma espécie de origem asiática, introduzida no Brasil. Tal linhagem não faz parte do supergrupo B (típico dos isópodos terrestres), e nem mesmo de qualquer outro supergrupo conhecido. Ademais, as linhagens presentes nesta espécie são tão divergentes filogeneticamente que suportariam a formação de um novo supergrupo de *Wolbachia*. Mais indivíduos de *B. meeusei* precisam ser examinados, principalmente de outras populações e novos genes precisam ser testados para tentarmos esclarecer esse cenário e para sustentar a formação de um novo supergrupo da bactéria.

Neste estudo também foi evidenciado o primeiro registro de infecção por *Wolbachia* em um nematóide da família Mermithidae. Isso demonstra quão dinâmica é a bactéria, e que seus hospedeiros não se restringem aos grupos já conhecidos.

Infelizmente não houve sucesso na detecção da bactéria no nematoide através do gene *wsp*, mas deverão ser realizados novos testes com os genes *ftsZ* e *groE* para reafirmar a provável transmissão horizontal de *Wolbachia* entre o isópodo *Armadillidium vulgare* e o nematoide *Agamermis* sp.

Em relação à transmissão horizontal da bactéria, acredita-se que organismos que possuem associações ecológicas íntimas podem ser capazes de trocar *Wolbachia* entre si, sendo este um bom direcionamento de pesquisa para se tentar entender esse fascinante mecanismo. No entanto, é preciso ampliar o leque de associações, espécies e genes testados, pois só na posse de dados mais amplos será possível inferir sobre rotas mais precisas e fidedignas de transferência horizontal entre organismos ecologicamente relacionados. Uma questão em especial que necessita ser mais bem esclarecida, é o porquê das linhagens dos ácaros foréticos formarem um agrupamento com as de *B. meeusei* (apesar do valor de suporte do mesmo não ser alto) e não fazerem parte de nenhum supergrupo conhecido. Será que os ácaros também são foréticos desta espécie de tatuzinho? Será que houve transmissão horizontal de *Wolbachia* entre eles? Talvez trabalhos de transmissão artificial das linhagens entre estes organismos, via microinjeções, possam auxiliar a desvendar essas questões.

Muitas ainda são as perguntas a serem respondidas sobre a relação *Wolbachia*-isópodos terrestres. Os estudos estão em fase recente no Brasil, sendo que novas espécies de tatuzinhos-de-jardim precisam ser testadas, e questões básicas sobre prevalência de infecção, transmissão vertical, horizontal, influência da bactéria sobre as espécies infectadas, etc. ainda precisam ser respondidas. Espera-se que este estudo possa servir de subsídio para trabalhos posteriores, os quais ajudarão a compreender melhor todos os caminhos que permeiam a incrível relação deste simbiote com seus hospedeiros.

Anexo



ISSN 1415-4757 *printed version*

ISSN 1678-4685 *online version*

Scope and policy

Genetics and Molecular Biology (formerly named *Revista Brasileira de Genética/Brazilian Journal of Genetics* - ISSN 0100-8455) is published by the Sociedade Brasileira de Genética (Brazilian Society of Genetics).

The Journal considers contributions that present the results of original research in genetics, evolution and related scientific disciplines.

Although **Genetics and Molecular Biology** is an official publication of the Brazilian Society of Genetics, contributors are not required to be members of the Society.

It is a fundamental condition that submitted manuscripts have not been and will not be published elsewhere. With the acceptance of a manuscript for publication, the publishers acquire full and exclusive copyright for all languages and countries.

Manuscripts considered in conformity with the scope of the journal, judged by the Editor in conjunction with the Editorial Board, are reviewed by the Associate Editor and two or more external reviewers. Acceptance by the Editor is based on the quality of the work as substantial contribution to the field and on the overall presentation of the manuscript.

Submission of papers

1. Manuscripts should be submitted to:

Angela M. Vianna-Morgante, Editor-in-Chief
Genetics and Molecular Biology
E-mail: editor@gmb.org.br

2. A submission package sent to the Editorial Office must contain:

a) The manuscript that must be submitted by the Corresponding Author. This is the person who will also check the page proofs, and arranges for the payment that may incur during the editorial process.

b) An accompanying cover letter, signed by the corresponding author, stating that the data have not been published and are not under consideration elsewhere, and that all authors have approved the submission of the manuscript. It must also inform the e-mail

addresses of all other authors so that they can be contacted by the Editorial Office for confirmation of the submission. Possible conflicts of interest (e.g. due to funding, consultancies) must be disclosed.

c) An electronic copy of the text, tables and figures, including supplementary material to be published online only. Formats for text are Word or RTF in Windows platform. Images in TIFF or JPEG formats should be sent in separate files (For Figures, see detailed instructions in 3.1.h).

d) Manuscripts including photos or any other identifiable data of human subjects must be accompanied by a copy of the signed consent by the individual or his/her guardian.

Failure to adhere to these guidelines can delay the handling of your contribution and manuscripts may be returned before being reviewed.

3. Categories of Contribution

3.1. Research Articles

Manuscripts must be written in English in double-spaced, 12-point type throughout; formatted to A4 paper with 2.5 cm margins; marked with consecutive line and page numbers, beginning with the cover page.

The following elements must start on a new page and be ordered as they are listed below:

a) The title page must contain: a concise and informative title; the authors' names (first name at full length); the authors' institutional affiliation, including department, institution, city, state or province and country; different affiliations indicated with superscript Arabic numbers; a short running title of about 35 characters, including spaces; up to five key words; the corresponding author's name, postal address, phone and fax numbers and email address.

b) The Abstract must be a single paragraph that does not exceed 200 words and summarizes the main results and conclusions of the study. It should not contain references.

c) The text must be as succinct as possible. Text citations: articles should be referred to by authors' surnames and date of publication; citations with two authors must include both names; in citations with three or more authors, name the first author and use et al. List two or more references in the same citation in chronological order, separated by semi-colons. When two or more works in a citation were published in the same year, list them alphabetically by the first author surname. For two or more works by the same author(s) in a citation, list them chronologically, with the years separated by commas. (Example: Freire-Maia et al., 1966a, 1966b, 2000). Only articles that are published or in press should be cited. In the case of personal communications or unpublished results, all contributors must be listed by initials and last name (et al. should not be used). Numbers: In the text, numbers nine or less must be written out except as part of a date, a fraction or decimal, a percentage, or a unit of measurement. Use Arabic numerals for numbers larger than nine. Binomial Names: Latin names of genera, species and

infraspecific taxa must be printed in italics; names of orders and families should appear in the Title and also when first mentioned in the text. URLs for programs, data or other sources should be listed in the Internet Resources Section, immediately after the References Section, not in the text.

The text includes the following elements:

Introduction - Description of the background that led to the study.

Material (or Subjects) and Methods - Details relevant to the conduct of the study. Statistical methods should be explained at the end of this section.

Results - Undue repetition in text and tables should be avoided. Comment on significance of results is appropriate but broader discussion should be part of the Discussion section.

Discussion - The findings of the study should be placed in context of relevant published data. Ideas presented in other publications should not be discussed solely to make an exhaustive presentation.

Some manuscripts may require different formats appropriate to their content.

d) **The Acknowledgments** must be a single paragraph that immediately follows the discussion and includes references to grant support.

e) The References Section: references must be ordered alphabetically by the first author surname; references with the same first author should be ordered as follows: first, as single author in chronological order; next, with only one more co-author in alphabetical order by the second author; and finally followed by references with more than two co-authors, in chronological order, independent of the second author surnames. In references with more than 10 authors only the first ten should be listed, followed by et al. Use standard abbreviations for journal titles as suggested by NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/journals/>).

Only articles that are published or in press should be included in this section. Works submitted for publication but not yet accepted, personal communications and unpublished data must be cited within the text. "Personal communication" refers to individuals other than the authors of the manuscript being submitted; "unpublished data" refers to data produced by at least one of the authors of the manuscript being submitted. Works of restricted circulation (e.g., theses not available in public databases, congress abstracts not published in regular journals or public databases) should not be listed in this section.

Sample journal article citation:

Breuer ME and Pavan C (1955) Behaviour of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. *Chromosoma* 7:371-386.

Yonenaga-Yassuda Y, Rodrigues MT and Pellegrino KCM (2005) Chromosomal banding patterns in the eyelid-less microteiid lizard radiation: The X1X1X2X2:X1X2Y sex

chromosome system in Calyptommatus and the karyotypes of Psilophtalmus and Tretioscincus (Squamata, Gymnophthalmidae). Genet Mol Biol 28:700-709.

Sample book citation:

Dobzhansky T (1951) Genetics and Origin of Species. 3rd edition. Columbia University Press, New York, 364 pp.

Sample chapter-in-book citation:

Crawford DC and Howard-Peebles PN (2005) Fragile X: From cytogenetics to molecular genetics. In: Gersen SL and Keagle MB (eds) The Principles of Clinical Cytogenetics. 2nd edition. Humana Press, New Jersey, pp 495-513.

Sample electronic article citation:

Simin K, Wu H, Lu L, Pinkel D, Albertson D, Cardiff RD and Van Dyke T (2004) pRb inactivation in mammary cells reveals common mechanisms for tumor initiation and progression in divergent epithelia. Plos Biol 2:194-205. <http://www.plosbiology.org>.

f) **Internet Resources Section:** this section should contain a list of URLs referring to data presented in the text, software programs and other Internet resources used during data processing. Date of consultation must be stated.

Sample Internet resource citation:

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM> (September 4, 2005)

LEM Software,

http://dir.niehs.nih.gov/dirbb/weinbergfiles/hybrid_design.htm

(September 4, 2005)

g) **Tables** must be in Word format prepared with table tool, inserted at the end of the main text file, each table starting on a new page. A concise title should be provided above the table. Tables must be numbered consecutively in Arabic numerals. Each column must have a title in the box head. Footnotes typed directly below the table should be indicated in lowercase superscript numbers.

h) **Figures** must be numbered consecutively in Arabic numerals. Images should be in TIFF or JPEG format and provided in separate files. Identify each illustration by the first author name and the number of the respective figure. Figures in Word, PowerPoint or Excel format cannot be published. Only sequence data can be presented in Word format. Journal quality reproduction will require grayscale resolution yielding 300 dpi, color figures should be at 600 dpi. These resolutions refer to the output size of the file; if it is anticipated that images will be enlarged or reduced, the resolutions should be adjusted accordingly. Figures composed of several elements should be sent as a single panel, obeying the print size definitions of the journal (single or two columns width). Scanned figures should not be submitted. Color illustrations can be accepted.

Figure legends must be included in the main text file and should be typed on a new page that immediately follows the tables.

i) **Nomenclature** should adhere to current international standards.

j) **Sequences** may appear in text or in figure. DNA, RNA and protein sequences equal to or greater than 50 units must be entered into public databases. The accession number must be provided and released to the general public together with publication of the article.

k) **Data access:** reference should be made to availability of detailed data and materials used for reported studies.

l) **Ethical issues:** reports of experiments on live vertebrates must include a statement that the institutional review board approved the work and the protocol number must be provided. For experiments involving human subjects, authors must also include a statement that informed consent was obtained from all subjects. If photos or any other identifiable data are included, a copy of the signed consent must accompany the manuscript.

m) **Supplementary Material:** Data that the authors consider of importance for completeness of a study, but which are too extensive to be included in the published version, can be submitted as Supplementary Material. This material will be made available together with the electronic version. In case a manuscript contains such material, it should be appropriately identified within the text file. Supplementary material in tables should be identified as Table S1, Table S2, etc., in case of figures, they should be named accordingly, Figure S1, Figure S2. In addition, a list of this material should be presented at the end of the manuscript text file, containing the following statement: Supplementary material - the following online material is available for this article:

- Table S1 < short title >
- Figure S1 - < short title >

This material is available as part of the online article from
<http://www.scielo.br/gmb>

3.2 Short Communications

Present brief observations that do not warrant full-length articles. They should not be considered preliminary communications. They should be 15 or fewer typed pages in double spaced 12-point type, including literature cited. They should include an Abstract no longer than five percent of the paper's length and no further subdivision with introduction, material and methods, results and discussion in a single section. Up to to four items (tables and/or figures) may be submitted. The title page and reference section format is that of full-length article.

3.3 Letters to the Editor

Relate or respond to recent published items in the journal. Discussions of political, social and ethical issues of interest to geneticists are also welcome in this form.

3.4 Review Articles

Review Articles are welcome. The Editor should be contacted prior to submission.

3.5 Book Reviews

Publishers are invited to submit books on Genetics, Evolution and related disciplines, for review in the journal. Aspiring reviewers may propose writing a review.

3.6 History, Story and Memories

Accounts on historical aspects of Genetics relating to Brazil.

4. Proofs and Copyright Transfer

Page proofs will be sent to the corresponding author. Changes made to page proofs, apart from printer's errors, will be charged to the authors. Notes added in proof require Editorial approval. A form of consent to publish and transfer of copyright will have to be signed by the corresponding author, also on behalf of any co-authors.

5. Reprints

Reprints are free of charge and provided as a pdf-file.