



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

**DETERMINAÇÃO DE CEPAS DE *Wolbachia* EM POPULAÇÕES NATURAIS DE
Solenopsis spp. (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) ANALISADAS VIA MULTILOCUS
SEQUENCE TYPING (MLST): DIVERSIDADE GENÉTICA, COEVOLUÇÃO E
RECOMBINAÇÃO**

CÍNTIA MARTINS

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Rio Claro-SP
2014

CÍNTIA MARTINS

**DETERMINAÇÃO DE CEPAS DE *Wolbachia* EM POPULAÇÕES NATURAIS DE
Solenopsis spp. (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) ANALISADAS VIA
MULTILOCUS SEQUENCE TYPING (MLST): DIVERSIDADE GENÉTICA,
COEVOLUÇÃO E RECOMBINAÇÃO**

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências do Câmpus de Rio
Claro, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor
em Ciências Biológicas (Biologia
Celular e Molecular).

Orientador: Prof. Dr. Odair Correa Bueno

Rio Claro-SP
2014

595.796 Martins, Cíntia

M386d Determinação de cepas de Wolbachia em populações naturais de *Solenopsis* spp. (Hymenoptera: Formicidae) analisadas via Multilocus Sequence Typing (MLST): diversidade genética, coevolução e recombinação / Cíntia Martins. - Rio Claro, 2014
117 f. : il., figs., tabs.

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

1. Formiga. 2. Formigas lava-pés. 3. Endossimbionte. 4. Filogenia molecular. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Aos meus amados pais, que sempre me apoiaram e formaram o alicerce para o que conquistei até hoje.

Ao meu querido marido, que conviveu com meu mau humor, com minha ansiedade, aceitou e entendeu os meus dias de férias que foram passados dentro do laboratório, me ajudou com a leitura crítica de tudo que escrevo (apesar de não ser da área), me deu força nos momentos difíceis e foi meu parceiro em todos os momentos, e principalmente por ter suportado a distância durante o meu período de afastamento.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Odair Correa Bueno, que já se tornou um amigo depois de mais de 10 anos de convivência desde a Iniciação Científica. Obrigada pela confiança em mim depositada quando propus, no início de 2010, que primeiramente acabaria os experimentos para daí então me matricular no programa de Doutorado, em virtude da possibilidade de eu não ter afastamento para cursá-lo. Agradeço por todo o ensinamento, pelas orientações, pela infraestrutura e todos os materiais necessários para a execução do projeto. Aprendi muito com você.

À Necis, pela amizade, e sua sempre pronta disposição em me ajudar, pelas conversas sobre nossas paixões animais, enfim, por ser essa pessoa maravilhosa que foi nesses mais de 10 anos compartilhando o ambiente de trabalho e construindo a amizade.

Às amigas e companheiras de laboratório Catarina, Manuela e Larissa pela companhia, amizade e super ajuda no decorrer desses anos! Por entenderem a minha necessidade e me liberarem o termociclador quando eu tinha apenas 1 mês (ou 1 semana) para fazer muitas PCRs! À querida amiga “Priiii”, companheira de quarto em congressos, profissional maravilhosa que me ajudou muito na melhoria deste texto.

À Dr^a Marina Cortez, que apareceu em nossas vidas no momento perfeito, que sabia tudo sobre o “R”, e que não hesitou em nenhum momento em nos ajudar nas análises, compartilhando seu conhecimento (que é muito) e sendo uma ótima professora na disciplina que ministrou.

Ao meu querido professor, o Dr. José Chaud Netto, que mudou a minha vida acadêmica com suas aulas de Evolução, que como eu já disse outras vezes, me levou a escolher o “caminho da evolução” para estudar, e hoje, é com muito prazer que ministro a disciplina Evolução para meus alunos, levando adiante uma parte daquilo que aprendi com ele!

A Dr^a Laura Baldo da Universidade da Califórnia, Riverside (EUA) que gentilmente cedeu sequencias de sua autoria para que eu pudesse desenhar *primers*.

Aos professores das disciplinas que cursei, tanto na graduação, quanto na pós-graduação, que foram essenciais na construção do que hoje aqui apresento e também na minha atuação como professora.

Aos amigos que fiz em Parnaíba (PI) que tornam a distância de nossa terra natal algo suportável, afinal muitos são como família para nós que escolhemos viver e trabalhar longe de nossos locais de origem! Em especial às queridas amigas Lina, Renata, Keiko e Any.

Aos amigos de graduação, em especial a minha querida amiga e comadre Renata Caritá, pelo carinho e pelos muitos anos de amizade que a distância não separou.

Aos colegas e amigos de trabalho, principalmente aos professores do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Piauí, pelo apoio e pela autorização de afastamento para a conclusão desta tese.

Ao CEIS (Centro de Estudos de Insetos Sociais) e a todos que lá conheci ao longo desses anos, desde a Iniciação Científica até o Doutorado. Em especial à Ita, Marcela, Vivi, Cynara e Sandrinha, que com a alegria contagiante tornaram os dias que muitas vezes eram exaustivos em dias animados e cheios de risadas pelos corredores.

À UNESP, instituição na qual há muitos anos atrás ingressei como uma aluna de Graduação e hoje saio com título de Doutorado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular e aos seus funcionários que sempre cordialmente e profissionalmente me atenderam.

À FAPEPI e a CAPES pela bolsa de estudos concedida.

A todos que direta e indiretamente contribuíram e que não foram citados acima, mas que também fizeram parte do meu crescimento pessoal e profissional e desta conquista.

Muito obrigada!

“We cannot fathom the marvelous complexity of an organic being; but on the hypothesis here advanced this complexity is much increased. Each living creature must be looked at as a microcosm - a little universe, formed of a host of self-propagating organisms, inconceivably minute and as numerous as the stars in heaven.”

Charles Darwin

Resumo

RESUMO

Interações insetos/micro-organismos são amplas e ocorrem das mais diversas maneiras, com as bactérias simbiotes de insetos desempenhando vários papéis, na maioria desconhecidos, na biologia do hospedeiro. O que se considerava apenas um único organismo eucariótico é na verdade um agregado de vários diferentes organismos, o que levou a uma mudança na maneira de se estudar esses organismos, culminando em uma abordagem mais holística. Dentro desse vasto mundo, relativamente pouco conhecido dos micro-organismos em associação com insetos, estão as bactérias do gênero *Wolbachia* (Classe Alphaproteobacteria, Ordem Rickettsiales), amplamente distribuídas nos artrópodes e transmitidas matematicamente, causadoras de diversas alterações reprodutivas no hospedeiro, sendo que sua ocorrência em populações naturais pode ser de grande interesse no controle biológico. A distribuição dessas bactérias em formigas é pouco explorada e existe carência de informações sobre a interação com formigas do gênero *Solenopsis*, que inclui espécies nativas da América do Sul. Este gênero possui espécies distribuídas de forma cosmopolita e no Brasil estão amplamente disseminadas, associadas preferencialmente a áreas de atividade humana. Este trabalho teve como objetivo analisar a diversidade genética da *Wolbachia* de amostras de ninhos de populações nativas de espécies do gênero *Solenopsis*, através do sequenciamento de cinco genes que compõem o *multilocus* de *Wolbachia*, além do gene *wsp*, a fim de caracterizar as cepas e estabelecer inferências filogenéticas entre elas. Além disso, testar as hipóteses de coevolução entre as cepas e as formigas e de recombinação entre as cepas encontradas. Com o sequenciamento e análises dos cinco genes que compõem o *multilocus* de *Wolbachia* (*gatB*, *coxA*, *hcpA*, *ftsZ* e *fbpA*), totalizando 2079 pb, destacam-se os seguintes resultados: i. o registro de 15 novas cepas; ii. o registro de 11 alelos anteriormente desconhecidos; iii. a relação filogenética entre as cepas apresenta um padrão polifilético, indicativo da complexidade da história evolutiva dessas bactérias nas espécies analisadas; iv. os padrões de transmissão de *Wolbachia* nas espécies de *Solenopsis* parece ser tanto vertical quanto horizontal; v. coevolução entre *Wolbachia* e hospedeiro devem estar acontecendo, porém não em padrão de cofilogenias; vi. não há correlação entre as distâncias geográficas e as distribuições das cepas analisadas; vii. a diversidade de cepas detectadas com a metodologia do *multilocus* é maior que aquela encontrada com o gene *wsp*; viii. eventos de recombinação ocorreram entre as cepas analisadas, porém a mutação pontual também contribuiu para a diversificação das cepas; ix. não existem cepas compartilhadas entre as formigas estudadas e aquelas de outros hospedeiros analisados no Brasil. Portanto, a diversidade genética das cepas presentes em espécies de *Solenopsis* é rica, mantém a tendência de agrupamentos entre cepas de Novo Mundo/Velho Mundo como um modelo único em formigas, com padrões evolutivos complexos que indicam a participação de eventos de coevolução e a diversificação das cepas sendo influenciada tanto por eventos de recombinação e mutações pontuais, além de destacar que essa diversidade de cepas pode interagir em processos de diversificação das espécies do gênero *Solenopsis* em populações nativas.

Palavras-chave: Formigas lava-pés. Endossimbionte. Filogenia molecular.

Abstract

ABSTRACT

Insects/microorganisms interactions are broad and occurs in many different ways with symbiont bacteria of insects playing many roles, most unknown, on the biology of its host. What was considered a single eukaryotic organism is actually an aggregate of many different organisms which lead to a change in the way we study organisms, leading to a more holistic approach. Within this vast but relatively unknown world of microorganisms in association with insects are the bacteria of the genus *Wolbachia* (Class Alphaproteobacteria, Order Rickettsiales) widely distributed in arthropods and maternally transmitted, causing several reproductive alterations in the host, and their occurrence in natural populations being of great interest in the biological control of insects. Its distribution in ants is poorly explored and little is known about the interaction with the *Solenopsis* genus which includes native species from South America. This genus includes species cosmopolitan distributed and in Brazil they are widely distributed being preferentially associated with areas of human activity. This study aimed to analyze the genetic diversity of samples of nests from native populations of *Solenopsis* species infected by *Wolbachia* by sequencing the five genes comprising the *Wolbachia multilocus*, and also the *wsp* gene in order to characterize the strains and establish phylogenetic inferences between them. Furthermore test the hypothesis of coevolution between ants and its *Wolbachia* strains and recombination between found strains. With the sequencing and analysis of five genes comprising the *Wolbachia multilocus* (*gatB*, *coxA*, *hcpA*, *ftsZ* e *fbpA*) totaling 2079 bp the following results are highlighted: i. the record of 15 previously unknown new strains, ii. the record of 11 previously unknown new alleles, iii. phylogenetic relationship between the strains found here presents a polyphyletic pattern, indicative of the complexity of the evolutionary history of strains in the species analyzed, iv. the transmission pattern of *Wolbachia* in *Solenopsis* species here examined appears to be both vertically and horizontally, v. host and *Wolbachia* coevolution should be happening but not in standard cophylogeny, vi. no geographical correlation between the analyzed strains was found, vii. the strains diversity here identified with the *multilocus* methodology is greater than found with *wsp* gene, viii. recombination events occurred between the analyzed strains, but point mutation also contributes with the strain diversification, ix. strains are not shared between the ants analyzed here and those of other hosts analyzed in Brazil. Therefore, the genetic diversity of strains found in *Solenopsis* species is rich and keeps the tendency of clusters among strains from New World/Old World as a unique pattern in ants, with a complex evolutionary model that indicates the occurrence of coevolution events and diversification of strains being influenced both by recombination events and point mutations, and also show that this diversity of strains may interact in the process of diversification of native populations of the genus *Solenopsis*.

Keywords: Fire ant. Endosymbiont. Molecular phylogenetics.

Sumário

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO.....	13
2 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 Formigas lava-pés.....	15
2.2 <i>Wolbachia</i> : a bactéria simbiote.....	16
2.3 <i>Wolbachia</i> em formigas lava-pés	19
2.4 Metodologias de estudo de <i>Wolbachia</i> : o <i>wsp</i> e o MLST	20
2.5 Estudos de <i>Wolbachia</i> em formigas utilizando a metodologia MLST	22
2.6 <i>Wolbachia</i> em outras espécies de artrópodes	24
2.7 Aplicabilidade dos estudos com <i>Wolbachia</i>	28
2.8 Um novo nível de compreensão	28
3 OBJETIVOS.....	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1 Extração de DNA.....	38
4.2 Reação de polimerização em cadeia (PCR).....	39
4.2.1 DNA mitocondrial	39
4.2.2 Isolamento de genes da <i>Wolbachia</i>	39
4.3 Sequenciamento do DNA	43
4.4 Análises dos resultados.....	43
4.4.1 Identificação das cepas	43
4.4.2 Network e Diversidade Genética.....	44
4.4.3 Análises de recombinação	44
4.4.4 Análise de eBURST	45
4.4.5 Análises Filogenéticas	45
4.4.5.1 Dados concatenados do MLST X MLST de Formicidae do <i>Wolbachia</i> MLST Database.....	45
4.4.5.2 Dados concatenados do MLST X STs de amostragens do Brasil e diferentes supergrupos.....	48
4.4.5.3 Árvores em espelho: haplótipos dos hospedeiros X variação das cepas de <i>Wolbachia</i>	49
4.4.6 Análises de correlação	50
4.4.7 Mapa de distribuição das cepas	51
5 RESULTADOS	53

5.1 Amplificação dos genes do MLST, Sequenciamento e Identificação dos alelos e cepas	53
5.2 Diversidade Genética.....	58
5.3 Análise de recombinação.....	59
5.4 Análise de eBURST	62
5.5 Network	62
5.6 Análises filogenéticas	65
5.6.1 Dados concatenados do MLST de <i>Solenopsis</i> e de Formicidae do <i>Wolbachia</i> MLST Database.....	65
5.6.2 Dados concatenados do MLST de <i>Solenopsis</i> , STs de amostragens do Brasil e diferentes supergrupos	69
5.6.3 Árvores em espelho: haplótipos dos hospedeiros X variação das cepas de <i>Wolbachia</i> de <i>Solenopsis</i>	72
5.7 Análises de correlação	74
5.8 Mapa de distribuição das cepas	78
5.9 MLST X <i>wsp</i>	80
6 DISCUSSÃO	82
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	95
REFERÊNCIAS	98
APÊNDICE.....	114

Apresentação

1 APRESENTAÇÃO

O interesse em trabalhar com a enigmática endobactéria *Wolbachia* teve início ainda no final da graduação em Ciências Biológicas. Sempre com o fascínio por espécies-praga, especialmente formigas, foi no trabalho de Iniciação Científica com a formiga-argentina (*Linepithema humile*) que ocorreu o primeiro contato com uma publicação sobre *Wolbachia*, o trabalho de Reuter et al. (2005).

Na continuação da vida acadêmica deu-se por escolher o prosseguimento em pós-graduação no programa de Biologia Celular e Molecular da UNESP – Campus Rio Claro com formigas lava-pés (gênero *Solenopsis*) e com a expansão da revisão bibliográfica para a escrita do projeto de mestrado percebeu-se que muitas questões evolutivas das espécies que seriam estudadas poderiam ser respondidas ou até mesmo confundidas na presença da infecção da endobactéria *Wolbachia*. E porque não estudar as formigas e as bactérias para responder as questões evolutivas que se tinha em mente?

Portanto, o interesse pelo assunto abordado no presente trabalho surgiu ainda no andamento do mestrado, cursado neste mesmo programa, que abordou o tema “Análises moleculares das formigas lava-pés (*Solenopsis* spp.) (Hymenoptera: Formicidae) e da presença da endobactéria *Wolbachia*”. O início do trabalho de mestrado foi marcado por um aumento no número de publicações que abordavam uma metodologia nova para o estudo de *Wolbachia*, o “*Multilocus Sequence Typing*”, referido como MLST. Essa metodologia trazia inovações nas interpretações da evolução de *Wolbachia*, e o mais importante, surgiu para substituir a mais usual para o estudo da diversidade de *Wolbachia* até aquele momento: o uso do gene *wsp* (*Wolbachia surface protein*).

Após a defesa de mestrado deu-se início a aplicação de um piloto da metodologia do MLST, nas mesmas amostras anteriormente analisadas com o uso do gene *wsp*, e outras amostras advindas de outro trabalho da equipe (SOUZA, 2011), fundamentalmente com o intuito de confrontar os dados obtidos em Martins (2010), Souza *et al.* (2011) e Martins *et al.* (2012).

Com o sucesso da aplicação da metodologia do MLST nas amostras, foi possível delinear com mais clareza as questões que poderiam ser testadas, e assim o presente projeto de Doutorado foi formulado.

Introdução e Revisão
da Literatura

2 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Formigas lava-pés

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

A espécie *Solenopsis invicta* Buren, 1972 foi disseminada, a partir da América do Sul para vários locais do mundo através de exportação de madeira (TABER, 2000). Atualmente tem-se registros nos Estados Unidos da América, Oeste das Índias, Nova Zelândia, Porto Rico, Austrália (HENSCHAW et al., 2005; TSCHINKEL, 2006), Taiwan (CHEN et al., 2006) e China (YIJUAN et al., 2007).

S. invicta foi introduzida inicialmente de forma não intencional nos Estados Unidos na década de 1930 e tem se expandido por toda a região sul do país. Essa espécie é de grande importância econômica, pois está presente particularmente em ambientes alterados pelas atividades do homem, causando muitos acidentes, alguns graves, chegando a reações alérgicas devido a sua ferroada, além de se alimentarem de diversas plantas e se associarem com hemiptera que são sugadores de seiva das plantas, e também afetar a diversidade local de formigas nativas e outros animais (TSCHINKEL, 2006).

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

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

A taxonomia das formigas lava-pés foi revisada por Trager (1991) e o gênero *Solenopsis* Westwood (Formicidae: Myrmicinae) apresentou 185 espécies. Algumas espécies de *Solenopsis* foram denominadas de “*thief ants*” devido ao hábito de ladras (PITTS et al., 2005), e se caracterizam por viverem no interior dos ninhos de outras espécies de formigas, das quais roubam alimento e cria, e possuem operárias pequenas e a maioria das espécies monomórficas (THOMPSON, 1989; PACHECO; MACKAY, 2013).

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

2.2 *Wolbachia*: a bactéria simbiote

A interação insetos/micro-organismos é ampla, podendo ocorrer tanto dentro quanto fora de seus corpos (BUCHNER, 1965) e das mais diversas maneiras, que vão desde associações de micro-organismos associados ao intestino, endoparasitismo, simbiotes extracelulares e simbiotes intracelulares (ISHIKAWA, 2003). Ainda, descobertas recentes têm demonstrado que simbiotes mutualistas que coevoluiram com as formigas tem desempenhado papéis importantes na evolução dessa família de insetos (RUSSEL, 2012).

Bactérias simbiotes de insetos desempenham importantes papéis na biologia e ecologia de seus hospedeiros, que vão desde abrir novos nichos ecológicos ligados à alimentação do inseto hospedeiro, até a resistência a parasitas, tolerância ao calor, entre outros (FELDHAAR, 2011). O que se considerava apenas um único organismo eucariótico, é na verdade um agregado de vários diferentes organismos, cada um com seu próprio genoma e metabolismo, modificando assim a maneira de se estudar esses organismos, rumo a uma visão holística (FELDHAAR, 2011).

Devido à rápida expansão e a interação com diversos táxons, muitas espécies de formigas podem ter adquirido diversas formas de parasitoides e mesmo endossimbiotes (DEDEINE et al., 2005).

As bactérias do gênero *Wolbachia* (Classe Alphaproteobacteria, Ordem Rickettsiales) são intracelulares, herdadas através do citoplasma do ovo (WERREN, 1997), e são encontradas em grande número nos tecidos reprodutivos de uma ampla variedade de artrópodes. A frequência da endobactéria, analisada em 63 espécies de artrópodes, foi encontrada em 76% deles (JEYAPRAKASH; HOY, 2000) e extrapolações dessas estimativas sugerem que 10^6 espécies de insetos podem estar infectadas por *Wolbachia*, fazendo dessa bactéria um dos principais parasitas dos insetos (HILGENBOECKER et al., 2008; SHOEMAKER et al., 2003). Estimativas recentes realizadas por Zug e Hammerstein (2012) indicam uma proporção menor de espécies de artrópodes infectadas, em torno de 40%, porém ainda bastante alta. Além disso, sugere-se que a *Wolbachia* é uma bactéria comumente encontrada em formigas, infectando mais de 34% de espécies de Formicidae, podendo variar consideravelmente a sua prevalência entre diferentes taxons (RUSSEL, 2012).

As variantes de *Wolbachia* encontradas em formigas do Novo Mundo são similares entre si, porém, diferem de outras cepas que ocorrem em outros grupos de insetos, sugerindo que elas são específicas de formigas (TSUTSUI et al., 2003). Elas podem atuar nos insetos provocando mudanças reprodutivas no hospedeiro, aumentando a taxa relativa de transmissão de linhagens infectadas (BANDI et al., 1998; O'NEILL et al., 1992; STOUTHAMER et al., 1999). Sua ocorrência em populações naturais é um fator importante em termos de controle, existindo grande interesse na possível utilização dessa endobactéria no controle biológico (AESCHILIMANN, 1990; BEARD et al., 1993; GIRIN, 1995; STOUTHAMER, 1993).

As alterações reprodutivas que *Wolbachia* pode causar em seus hospedeiros incluem a incompatibilidade citoplasmática, indução de partenogênese, feminilidade de machos genéticos e morte de machos (WERREN, 1997). Em insetos sociais, contudo, é desconhecido se a *Wolbachia* possui influência na reprodução (CHAPUISAT; KELLER, 1999; KELLER et al., 2001; WENSELEERS et al., 1998) e em formigas, não existem evidências concretas sobre as manipulações reprodutivas (RUSSEL, 2012).

Recentemente encontrou-se a relação de *Wolbachia* com a resistência a infecção do hospedeiro por certos vírus. Moreira et al. (2009), identificaram limitação do vírus da dengue e Chikungunya relacionados com a presença de *Wolbachia* no mosquito hospedeiro, além de resistência ao protozoário *Plasmodium*. Bian et al. (2010) documentam a resistência ao vírus da dengue induzido por *Wolbachia* em *Aedes aegypti* e Frentiu et al. (2010) demonstraram que células infectadas com *Wolbachia* inibem a replicação do vírus da dengue.

Situações que beneficiam diretamente o hospedeiro, mas que não se relacionam com a modificação de sua reprodução também são importantes de salientar, como identificado por

Hedges et al. (2008) que descreveram *D. melanogaster* infectadas com *Wolbachia*, menos susceptíveis a mortalidade induzida por uma variedade de vírus de RNA. Teixeira et al. (2008) também identificaram a relação entre presença de *Wolbachia* e a resistência a 3 vírus diferentes de RNA em *D. melanogaster*. Do mesmo modo, Brownlie et al. (2009) relataram a relação com a maior sobrevivência sob stress nutricional também em *D. melanogaster* sugerindo que a *Wolbachia* pode ter um importante papel, anteriormente desconhecido, como mutualistas nutricionais em insetos.

Utilizando um gene do ciclo celular da endobactéria (*ftsZ*), Werren et al. (1995) analisaram a evolução e filogenia de *Wolbachia* nos artrópodes e propuseram a divisão em duas linhagens (A e B). Mais tarde, Zhou et al. (1998) utilizaram o gene *wsp*, que codifica uma proteína de membrana da endobactéria, e confirmaram a divisão em dois grupos, mas sugeriram que dentro de cada grupo existem vários clados que não tinham sido observados nas análises anteriores. Indicaram a existência de oito grupos em potencial dentro do grupo A e quatro dentro do grupo B. Análises posteriores da presença de *Wolbachia* realizadas em nematóides revelaram dois clados adicionais (C e D) (BANDI et al., 1998). Esses clados são chamados desde então de “supergrupos” (LO et al., 2007). Posteriormente, outros supergrupos foram propostos, incluindo o supergrupo E em Collembola (CZARNETZKI et al., 2004; VANDEKERCKHOVE et al., 1999), F em artrópodes e nematóides (CASIRAGHI et al., 2005), G em aranhas (ROWLEY et al., 2004) e H em cupins (BORDENSTEIN et al., 2005). Outras linhagens foram propostas como o supergrupo K em espécies de *Bryobia*, Acari (ROS et al., 2009), M e N em afídeos (AUGUSTINOS et al., 2011), e outras ainda sem definição de supergrupo, como aquelas presentes em: Siphonaptera (GORHAM et al., 2003) e no nematodo *Dipetalonema gracile* (CASIRAGHI et al., 2005), foram propostas por Ros et al. (2009) como pertencentes aos supergrupos I e J respectivamente; além disso, *Radopholus similis* antes proposta como pertencente ao supergrupo I por Haegeman et al. (2009) foi proposta como pertencente ao supergrupo L por Augustinos et al. (2011). Porém, em pseudoescorpiões (*Cordylocheres scorpoides*) (ZEH et al., 2005) a cepa encontrada permanece ainda sem definição de supergrupo. Portanto, pode-se admitir até o momento, sem considerar aqueles ainda sem definição, 14 supergrupos. É importante ressaltar, que não há uma definição rigorosa de supergrupos (ROS et al., 2009), ou seja, para a definição de supergrupos não existe uma regra clara de quais genes devem ser considerados (apesar da existência do sistema de *multilocus* e da sugestão de uso do *multilocus* para definição correta das cepas por Baldo e Werren (2007)), o que explica estas definições e redefinições citadas para *R. similis*.

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

2.3 *Wolbachia* em formigas lava-pés

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

Comparações entre populações de várias espécies do gênero *Solenopsis* nos locais onde foram introduzidas e de locais de origens indicaram dois tipos de linhagens de *Wolbachia* (A e B) através de análises do gene *wsp*, além de alta taxa de variação na frequência da infecção entre regiões diferentes (SHOEMAKER et al., 2000). Shoemaker et al. (2003 a, b) sugerem que há forte associação entre a variante de *Wolbachia* e a linhagem de DNA mitocondrial do hospedeiro.

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

Martins et al. (2012) investigaram a presença e distribuição de *Wolbachia* em populações de algumas espécies do gênero *Solenopsis* com o uso do gene *wsp* e foi determinada uma alta frequência de infecção, com 51% dos ninhos analisados infectados por *Wolbachia*, além de uma tendência de populações ao sul do Brasil apresentarem maiores índices de ocorrência de *Wolbachia*, um indicativo de que pode existir uma relação da infecção por *Wolbachia* com temperaturas mais amenas, como salientado por Rey et al., (2013) e Wenseleers et al., (2002). Além disso, indicaram que pode existir relação de

transmissão horizontal através de *S. daguerrei* para as amostras analisadas, devido ao agrupamento encontrado na análise filogenética realizada.

2.4 Metodologias de estudo de *Wolbachia*: o *wsp* (*Wolbachia* Surface Protein) e o MLST

O uso de definição de cepas de *Wolbachia* através do *wsp* foi muito amplo, porém, o aumento de evidências de que o gene esteja sob a influência de eventos de recombinação (BALDO et al., 2005; JIGGINS, 2001; JIGGINS, 2002; MALLOCH e FENTON, 2005; REUTER; KELLER, 2003; WERREN; BARTOS, 2001) levaram pesquisadores a procurar por alternativas, e dentre as mais aceitas, seria o uso de múltiplos genes. Inicialmente, Paraskevopoulos et al. (2006) deram o primeiro passo na direção de um sistema de MLST (*Multilocus Sequence Typing*) e logo em seguida, Baldo et al. (2006) desenvolveram uma metodologia padrão para identificação de cepas de *Wolbachia* através do *multilocus*, que funciona com eficiência ampla para indivíduos infectados por apenas uma cepa.

O *Multilocus Sequence Typing* foi originalmente criado para estudos epidemiológicos e consiste na definição de cepas como uma sequência tipo (*sequence type* – ST, equivalente a um haplótipo) baseada na combinação de alelos (perfis alélicos), fundamentado no sequenciamento de cinco genes (BALDO et al., 2006). O sistema inclui um banco de dados (<http://pubmlst.org/wolbachia/>) criado por Keith Jolley (JOLLEY; MAIDEN, 2010) no qual se pode organizar, armazenar e analisar dados.

O esquema MLST desenvolvido para *Wolbachia* envolve o estudo da variação de cinco genes conservados, sendo eles o *ftsZ* (proteína de divisão celular), *gatB* (glutamil-tRNA amidotransferase, subunidade B), *coxA* (citocromo C oxidase, subunidade I), *hcpA* (proteína hipotética conservada) e *fbpA* (frutose aldolase bifosfato). Segundo Baldo et al. (2006) estudos filogenéticos e outros algoritmos de agrupamento podem ser aplicados para os cinco genes individualmente ou concatenados para análises adicionais sobre a relação das cepas, porém, ainda deve-se ter precaução devido a eventos de recombinação.

Apesar da metodologia do *multilocus* ter contribuído extensivamente nos estudos para o entendimento de várias questões sobre a *Wolbachia*, existe uma questão que é de difícil resolução com o uso dessa metodologia: quando existe a presença de múltiplas infecções em um indivíduo. Para se obter a designação de uma determinada ST, é necessária a combinação dos cinco alelos que a compõem e no caso de uma múltipla infecção, pode existir, por exemplo, a presença de alelos diferentes de um mesmo supergrupo em um mesmo indivíduo

tornando uma tarefa indecifrável a designação do alelo correto a uma infecção específica por *Wolbachia*.

Raychoudhury et al. (2009) conseguiram sanar problemas de resolução de múltiplas infecções em vespas utilizando a cultura celular que separaram as múltiplas infecções em culturas com simples infecção (culturas realizadas por Bordenstein; Werren (2007); Perrot-Minnot; Werren (1999)). Contudo, o isolamento desse tipo não é uma constante e tornam-se escassos na literatura, provavelmente devido à dificuldade em se ter sucesso na metodologia; porém existem protocolos que permitam o isolamento através do sequenciamento de genomas e que possibilitaram a separação de dupla infecção (ELLEGARD et al., 2013).

A presença de múltiplas infecções pode facilitar a troca de material genético entre cepas de *Wolbachia* dentro de um mesmo hospedeiro (MORAN et al., 2008) e diante desse cenário, os eventos de recombinação devem ser cuidadosamente avaliados e estimados. Eventos de recombinação já foram detectados em alguns trabalhos que fizeram o uso do *multilocus*, como em Baldo et al. (2008) no gene *gatB* em *Wolbachia* infectando aranhas do gênero *Agelenopsis*; em Raychoudhury et al. (2009) em *coxA* de *Wolbachia* infectando espécies de *Nasonia*; em Yun et al. (2011) com recombinação no gene *hcpA* em *Wolbachia* infectando aranhas do gênero *Hylyphantes*; em Osei-Poku et al. (2012) nos genes *fbpA*, *coxA* em mosquitos que atuam como vetores de doenças; em Salunke et al. (2012) em *Wolbachia* infectando borboletas do oeste da Índia; em Zhang Y. K. et al. (2013) com recombinação nos genes *fbpA*, *ftsZ* e *wsp* da *Wolbachia* infectando Hemiptera, além de trabalhos que fizeram uso de genomas completos como o de Ellegaard et al. (2013).

A recombinação homóloga é uma das causas da variação em espécies de bactérias, assim como a mutação pontual (FEIL; SPRATT, 2001). Nesse sentido, a metodologia do MLST aliada com a determinação de complexos clonais (*clonal complexes*) é uma ferramenta importante para estudar a relação de diferentes genótipos de bactérias. Complexos clonais são compostos de um único genótipo predominante com um número menos comum de genótipos relacionados a este (FEIL; SPRATT, 2001). A formação desses complexos clonais, dificilmente pode ser reconstruída com técnicas tradicionais de agrupamento, pois esses modelos não consideram a maneira como os complexos clonais surgem e se diversificam (FEIL et al., 2004). Para solucionar o problema, esses autores criaram um algoritmo denominado eBURST, capaz de dividir uma amostragem de MLST de qualquer tamanho em grupos de isolados relacionados e complexos clonais além de predizer os genótipos fundadores de cada complexo clonal. A utilização desse algoritmo é simples e de livre acesso, pois tem seu funcionamento online e permite que se trabalhe com um grande número de

isolados, além de poder ser aplicada diretamente no banco de dados *Wolbachia* MLST Database. A aplicação consiste em agrupar as cepas que compartilham alelos do MLST com pelo menos um dos membros do grupo, sendo que aquelas que compartilham apenas um alelo com uma amostra considerada “a fundadora” são denominados “variante de locus único” (*single-locus variant*, ou SLVs) e aqueles que compartilham dois alelos são denominados “variantes de locus duplo” (*double-locus variant* ou DLVs) e assim por diante.

O algoritmo eBURST foi criado inicialmente para estudos epidemiológicos, onde são analisados 7 genes do MLST geralmente em micro-organismos patogênicos, porém o uso está sendo aplicado em amostras de *multilocus* de *Wolbachia* e estão retornando agrupamentos interessantes, agrupando as cepas de acordo com os alelos por elas compartilhados, inferindo assim sua relação (GERTH et al., 2013; ROS et al., 2012; RUSSEL et al., 2009).

2.5 Estudos de *Wolbachia* em formigas utilizando a metodologia MLST

Estudos de caracterização do endossimbionte *Wolbachia* em insetos através do MLST são pouco frequentes na literatura, especialmente quando se procura por publicações onde o hospedeiro é uma espécie de formiga. Nos últimos anos, foram publicados três artigos em 2011, oito em 2012 e oito em 2013, com o uso da metodologia (dados relativos às publicações informadas no *Wolbachia* MLST website: <http://www.pubmlst.org/wolbachia/> [JOLLEY; MAIDEN, 2010]), sendo que apenas um deles estava relacionado com a presença de *Wolbachia* em Formicidae.

Baldo et al. (2006) além de descreverem a metodologia do *multilocus* para *Wolbachia*, também foram os pioneiros a fazer uso da metodologia em Formicidae; os autores realizaram uma ampla investigação de cepas de *Wolbachia* em diferentes artrópodes hospedeiros através do MLST, e sequenciaram algumas cepas encontradas em formigas, dentre elas aquela presente em *Solenopsis invicta* (ST29). Os pesquisadores notaram que a cepa encontrada em *Solenopsis invicta*, quando comparada com cepas provenientes de diversos gêneros de insetos apresentou agrupamentos contraditórios para os dados de MLST e *wsp* analisados. Para explicar a contradição por eles encontrada, os autores sugerem que pode ter ocorrido uma transferência horizontal do gene *wsp* de um supergrupo B e eventos de recombinação. Além disso, concluíram que houve grande incongruência entre MLST e *wsp* (para todos os gêneros por eles analisados) para os dois supergrupos e as definições de cepas para os supergrupos, o que reforça a necessidade de separação ou identificação de cepas via *multilocus*.

Russel et al. (2009) descreveram a evolução da simbiose entre *Wolbachia* e seus hospedeiros, fazendo uso de amostras de formigas e borboletas e da metodologia do *multilocus*. Evidenciaram que as cepas de *Wolbachia* encontradas em formigas do Novo Mundo diferem substancialmente daquelas de formigas do Velho Mundo, possuindo um padrão único de divergência através do Atlântico e do Oceano Pacífico. As análises realizadas revelaram indicativos de que a *Wolbachia* não se dispersou através de co-divergência e introgressão no nível de subfamília ou gênero em Formicidae. Além disso, a falta de relação entre as cepas abrigadas por formigas e borboletas indica que *Wolbachia* relacionadas normalmente infectam hospedeiros relacionados (denominado padrão de associação ao hospedeiro) e este foi mais forte em Formicidae. Concluíram que tanto barreiras geográficas quanto filogenéticas devem promover a divergência evolutiva entre as cepas de *Wolbachia*. É importante ressaltar que no referido estudo foram realizadas coletas em diversos países, porém nenhuma delas foi realizada no Brasil.

O estudo mais específico que fez uso da metodologia do *multilocus* em formigas é o realizado por Frost et al. (2010) para inferir a relação existente entre a *Wolbachia* e a tribo de formigas cultivadoras de fungos (tribo Attini). Encontraram evidências de transmissão vertical através de resultados que indicam cocladogênese, porém, com ocorrência incompleta, uma vez que eles igualmente encontraram evidências de que a transmissão horizontal também aconteceu (mais possivelmente por transmissão via parasitóides). Para os autores, os padrões de infecção encontrados na tribo não são consistentes com os das mudanças na história de vida da tribo, mas os resultados parecem evidenciar que alguns gêneros são mais propensos e outros menos a infecção pela *Wolbachia*.

A *Wolbachia* pode ser eliminada experimentalmente de seus hospedeiros por meio de tratamentos com antibióticos e também através de aquecimento (PINTUREAU et al. 1999; TIMMERMANS; ELLERS, 2009; VAN OPIJNEN; BREEUWER, 1999) e segundo Wenseleers et al. (2002), a exposição de operárias de formigas a condições estressantes do ambiente, como altas temperaturas, também podem levar a eliminação da *Wolbachia*. Recentemente, Rey et al. (2013) encontraram evidências da perda natural de *Wolbachia* por exposição ao calor em populações clonais de formigas da espécie *Wasmannia auropunctata* que ocorrem em habitats com interferência humana. A explicação mais plausível para a perda de *Wolbachia* nas populações por eles analisadas seria o calor natural ou também a seleção relaxada durante a invasão de novos habitats nas populações invasoras.

Rey et al. (2013) inicialmente procuraram investigar a presença de parasitas que interferem na reprodução, dentre eles *Rickettsia*, *Cardinium*, *Arsenophomus*, *Spiroplasma*

ixodetis e *Wolbachia*, na espécie de formiga *Wasmannia auropunctata* tanto em populações sexuais nativas quanto populações clonais (população sexual: fêmeas e machos se reproduzem seguindo o esquema clássico haplodiplóide; população clonal: emergem de populações sexuais e se caracterizam por fêmeas com partenogênese telitoca e reprodução sexual para produzir rainhas não fertilizadas e operárias estéreis respectivamente). Os autores encontraram apenas a presença de *Wolbachia* e através do *multilocus*, determinaram que populações sexuais nativas eram mais amplamente infectadas do que aquelas populações clonais, e quando estas estavam infectadas, as suas cepas eram muito próximas daquelas das populações sexuais, um indicativo de que o peculiar sistema reprodutivo (através de populações clonais) da espécie de formiga não é influenciado pela presença da *Wolbachia*.

Apesar de ainda escassos, os estudos em Formicidae utilizando a metodologia do *multilocus* demonstram resultados complexos, e com o aumento de análises e publicações pode-se esperar um futuro ainda mais instigante quanto ao entendimento da relação de *Wolbachia* e Formicidae.

2.6 *Wolbachia* em outras espécies de artrópodes

Apesar de o MLST ser uma metodologia ainda atual e relativamente pouco explorada, estudos em diversas outras espécies de artrópodes com ocorrência em diversas localidades do mundo estão indicando resultados interessantes e contribuindo para a expansão do conhecimento quanto a relação da *Wolbachia* e seus hospedeiros, a sua distribuição, histórias evolutivas, além de fornecerem suporte para implantação de metodologias de controle de insetos-praga.

Baldo et al. (2008) demonstraram fortes evidências da contribuição da transmissão horizontal para a dispersão de *Wolbachia* entre hospedeiros relacionados, que poderia também explicar o padrão geral de associação específico de *Wolbachia*-hospedeiro quanto ao taxon em artrópode. Diante desses dados, atentaram para o fato de que análises em uma gama mais ampla de taxa de invertebrados são necessárias, utilizando-se de métodos sensíveis de análise (como o MLST), para determinar se o padrão de dispersão de *Wolbachia* por eles encontrados nas aranhas do gênero *Algelenopsis* da América do Norte é de fato um padrão geral de artrópodes.

O mecanismo de transferência de *Wolbachia* em um táxon de hospedeiro demonstrou ser rico e complexo como no gênero de vespas *Nasonia* (provenientes na sua maior parte de amostras da América do Norte, e algumas amostras da França, Rússia e Holanda), pela

metodologia do *multilocus*, evidenciando coespeciação, transferência horizontal e hibridização introgressiva de infecção por *Wolbachia*. Esses resultados demonstraram que vários mecanismos de transferência são possíveis mesmo dentro de um mesmo gênero hospedeiro (RAYCHOUDHURY et al., 2009).

Para testar hipóteses sobre a relação existente entre as cepas de *Wolbachia* em diferentes espécies de moscas provenientes de amostragem dos Estados Unidos, Japão e Panamá e que se alimentam sobre espécies de cogumelos, a metodologia do *multilocus* foi aplicada por Stahlhut et al. (2010). Dentre os muitos resultados encontrados, aqueles que se destacam são a ausência de evidências de especialização no nível de família da Ordem Díptera e a ausência de relação entre cepas de *Wolbachia* de espécies simpátricas de hospedeiros. Atentaram ainda para o fato de que co-especiação ou introgressão inicial pode ter ocorrido em poucos casos, sendo um indicativo de que esses eventos não são principais contribuintes para a diversidade geral de cepas. Por fim, concluíram que a transmissão horizontal de *Wolbachia* pode ser influenciada pela ecologia do hospedeiro e levar a associação de cepas de *Wolbachia* a guildas particulares de insetos.

Yun et al. (2011) utilizando o esquema MLST em populações geográficas da China de aranhas da espécie *Hylyphantes graminicola* não encontraram correlação entre a diversidade de *Wolbachia* e distância geográfica do hospedeiro; porém, uma correlação significativa foi encontrada entre a distância aos pares da citocromo oxidase I de *H. graminicola* e a divergência genética das cepas de *Wolbachia* associadas. É importante destacar que os autores encontraram variação na frequência de infecção nos hospedeiros de acordo com a localidade.

A presença de cepas similares de *Wolbachia* em espécies relacionadas foi encontrada por Watanabe et al. (2012) em espécies de *Orius* (Hemiptera) do Japão. As duas cepas de *Wolbachia*, identificadas através do *wsp* e *multilocus*, apresentaram-se bastante similares, sendo diferentes em um único nucleotídeo através de análise de *multilocus*. Os padrões de distribuição nas espécies analisadas foram bastante variáveis e os autores levantaram três hipóteses para explicar a relação encontrada e apontaram que a transmissão vertical a partir de um ancestral comum possa ter ocorrido assim como a transmissão horizontal mediada por interações hospedeiro-parasitóide e predador-presa. As diferenças nos padrões de distribuição podem refletir a história evolutiva entre as espécies de *Orius* e *Wolbachia* e/ou diferenças ecológicas ou fisiológicas entre as espécies analisadas que podem determinar a invasão e a manutenção das duas cepas de *Wolbachia* encontradas.

A filogenia da *Wolbachia* presente em borboletas apresenta um padrão distinto de distribuição (SALUNKE et al., 2012). A análise realizada em populações de borboletas da

Índia através de MLST revelou que cepas das mesmas ou diferentes borboletas hospedeiras estavam relacionadas entre elas e com simbioses de lepidóptera depositados no MLST database, ao mesmo tempo em que uma mesma espécie de hospedeiro carregava distintos isolados de *Wolbachia*. Neste mesmo estudo, os autores concluíram que o MLST produziu uma melhor diferenciação entre as cepas, onde STs completamente diferentes foram caracterizadas para indivíduos compartilhando os mesmos alelos de *wsp*.

Doudoumis et al. (2012) analisando populações africanas de moscas tsé-tsé (gênero *Glossina*) revelaram, através de análise filogenética com os genes que compõem o *multilocus* e do *wsp*, a presença de cepas de *Wolbachia* divergentes nas moscas analisadas, o que suporta a ideia de transmissão horizontal da *Wolbachia* entre espécies de insetos de taxas não relacionados, como extensivamente relatado em outras publicações. Os autores ainda sugerem ocorrência de co-divergência entre hospedeiro-simbionte. Além disso, foi encontrada uma distribuição bastante heterogênea de *Wolbachia* nas populações naturais analisadas.

Um resultado bastante interessante obtido por Doudoumis et al. (2012) é a transmissão de segmentos de genes da *Wolbachia* para o hospedeiro, sendo documentada para os genes *16S rRNA*, *fbpA* e *wsp* evidenciada pela amplificação desses genes em amostras de moscas tratadas com tetraciclina para eliminação da infecção, considerado uma evidência de uma longa coevolução entre a associação entre o hospedeiro e a *Wolbachia*.

Análises em populações do Hemíptera *Bamisia tabaci* revelaram a presença de simbioses secundários, incluindo a *Wolbachia* (TSAGKARAKOU et al., 2012). Através de análise de *multilocus*, foram detectadas apenas duas cepas nas populações analisadas, tendo sido encontradas ocorrendo juntas numa mesma população, porém nunca em um mesmo hospedeiro individual; além disso, a prevalência de *Wolbachia* variou entre populações, assim como nas diferentes localidades. A presença de duas cepas de *Wolbachia* nas populações analisadas pode estar relacionada com a recente invasão de uma nova cepa em populações naturais já infectadas, conforme esses autores.

Em algumas espécies de ácaros, a presença de *Wolbachia* pode ser afetada por fatores ecológicos entre outros fatores (ZHANG Y. K. et al., 2013). Nas populações chinesas de uma mesma espécie de ácaros, foram encontrados padrões de distribuição muito diferentes e evidências de transmissões tanto horizontais quanto verticais. As análises dos genes que compõem o *multilocus* também permitiram aos autores delinearem que não existe correlação com haplótipos de COI (citocromo oxidase I) do hospedeiro, porém alguns exemplos pontuais de co-divergência foram por eles detectados.

Já em abelhas (*Anthophila*) Gerth et al. (2013) fazendo uso do *multilocus* e da filogenia do hospedeiro, sustentaram que associações do hospedeiro com cleptoparasitas não podem ser suportados como único embasamento para a dispersão de *Wolbachia*. Além disso, evidências em pequena escala de que exista codivergência entre abelhas e a *Wolbachia* foram encontradas, embora algumas cepas parecessem ser específicas de abelhas, além de não existirem evidências de que a transmissão horizontal seja frequente entre abelhas relacionadas.

Apesar da relação de *Wolbachia* e hospedeiros ter sido analisada em diversos insetos em várias regiões do mundo, existem apenas dois estudos que envolvem a ocorrência de *Wolbachia* em populações de insetos com ocorrência no Brasil e que fizeram o uso do MLST. O primeiro deles examinou populações exóticas do Hemíptera praga *Diaphorina citri* e determinou que a infecção por *Wolbachia* é fixa nas populações de *D. citri*, porém com baixa densidade. A presença frequente da ST-173 nas populações de *D. citri* e a ocorrência minoritária das demais STs encontradas nas populações sugerem que a primeira acompanhou a população inicialmente introduzida no Brasil, sendo esta hipótese sustentada pela presença do mesmo *wsp* nas populações brasileiras e naquelas infectando *D. citri* em diferentes regiões do mundo, além disso, não verificaram relação entre a *Wolbachia* e o padrão da variação do DNA mitocondrial em populações de *D. citri* no Brasil (GUIDOLIN, 2011, GUIDOLIN; CÔNSOLI, 2013).

O segundo estudo foi realizado em moscas-das-frutas com ocorrência no Brasil e em outras localidades da América do Sul, Central e México. Prezotto (2012) analisou populações das espécies *Anastrepha fraterculus* e *A. obliqua* através da metodologia do *multilocus* e *wsp*, e encontrou apenas infecções do supergrupo A, distribuídas em 19 linhagens diferentes (sendo 17 delas inéditas), que foram agrupadas em clados distintos na análise filogenética, além de uma cepa mais frequente, a ST-1. Isto sugere que a diversidade de cepas encontradas no complexo *fraterculus* aliada a altas taxas de IC também detectadas, indicam a possibilidade da aplicação do controle biológico, utilizando a Técnica do Inseto Incompatível (TII).

Martinez et al. (2012) também analisaram a ocorrência de *Wolbachia* em espécies do gênero *Anastrepha*, coletadas no México e encontraram apenas uma cepa do supergrupo B em *A. striata*, o que pode tornar possível o uso do controle biológico para a espécie na região.

Diante do descrito, é notória a complexidade da relação *Wolbachia*-hospedeiro, existindo situações de co-divergência em algumas espécies e em outras, situações totalmente contraditórias.

2.7 Aplicabilidade dos estudos com *Wolbachia*

Conhecer a distribuição e as cepas de *Wolbachia* relacionadas com determinadas espécies e localidades, além de seus prováveis efeitos reprodutivos nas populações de insetos nas quais elas se encontram associadas, são importantes questões que precisam ser ampliadas, pois a implementação de programas de controle biológico fazendo uso da *Wolbachia* dependem do aprofundamento e conhecimento de todos esses fatores.

Um exemplo de controle que pode ser realizado e que foi já testada experimentalmente e na forma de modelo em diversas espécies é a Técnica do Inseto Incompatível (TII), que corresponde à introdução de machos infectados por cepas de *Wolbachia* incompatíveis com aquelas encontradas na população natural e que vão induzir a incompatibilidade citoplasmática (IC) (ATYAME et al., 2011; DOBSON et al., 2002; ZABALOU et al., 2004; ZABALOU et al., 2009).

Por outro lado, a introdução de uma população alvo de fêmeas infectadas por *Wolbachia* poderiam expandir genótipos desejados ligados à infecção pela bactéria em uma determinada população, podendo assim reduzir o valor adaptativo de uma população praga (SARIDAKI; BOURTZIS, 2010).

Apesar disso, o uso dessas metodologias em Formicidae pode ser controverso, uma vez que seria difícil prever a época da produção de machos incompatíveis para a implementação da TII, por exemplo. Os estudos publicados até o momento que abordam a presença de *Wolbachia* em Formicidae não alvejam o controle biológico, porém foca-se entender a história evolutiva e a relação da *Wolbachia* com os hospedeiros, que podem esclarecer questões evolutivas importantes e levar a compreensão de processos de especiação que podem ser influenciados pela presença da *Wolbachia* em certas espécies e populações. Além disso, existe o interesse em compreender a relação da *Wolbachia* com a biologia do hospedeiro, com a fisiologia, assim como na sua ecologia.

2.8 Um novo nível de compreensão

A troca de material genético através da transferência de segmentos do genoma de *Wolbachia* ao genoma do hospedeiro, ou mesmo do hospedeiro para a *Wolbachia*, já foi amplamente relatada na literatura por Doudoumis et al. (2012), Hotopp et al. (2007), Duploux et al. (2013), Ioannidis et al. (2013), Klasson et al. (2009), Kondo et al. (2002), Kumar et al. (2012), Le et al. (2012), McNulty et al. (2010), McNulty et al. (2012), McNulty et al. (2013),

Nikoh et al. (2008), Woolfit et al. (2009), sendo que várias delas sugerem que os genes transferidos podem ser funcionais. Além disso, *Wolbachia* já foi documentada alterando o *imprinting* genômico do hospedeiro através de metilações, influenciando a expressão de genes ligados ao desenvolvimento e a diferenciação sexual do hospedeiro (NEGRI et al., 2009). Desta forma, a interação hospedeiro-*Wolbachia*, sua função nos hospedeiros e sua história evolutiva são muito mais complexas do que primeiramente imaginado quando foi pela primeira vez reportada em Hertig; Wolbach (1924), em células de *Culex pipiens*.

Um maior nível de compreensão está sendo desenvolvido através do uso de técnicas mais avançadas de análise genômica. A tipificação de *Wolbachia* fazendo uso de genomas completos é uma abordagem promissora e que irá cooperar na compreensão dos mecanismos que contribuem para a expansão desse simbiote (GERTH et al., 2013). Além disso, a vantagem de análises de genomas completos em relação a análises de sequências parciais, é que o primeiro pode fornecer informações sobre enzimas e rotas que estão deficientes em um organismo (MORAN et al., 2008).

Richardson et al. (2012) reconstruíram genomas completos de cepas de *Wolbachia* de *Drosophila melanogaster*, assim como o genoma do DNA mitocondrial utilizando o sequenciamento de *shotgun*, e com isso estimaram que existe forte congruência entre as genealogias da *Wolbachia* e do DNAm, suportando uma origem de uma única infecção ancestral por *Wolbachia* em *D. melanogaster* e que foi herdada estritamente via transmissão vertical, fato este já suportado em outros trabalhos, para outro grupo de insetos, porém fazendo uso da metodologia de *multilocus* (YUN et al., 2011).

Metodologias com nível máximo de resolução genética, como o uso de genomas completos de *Wolbachia* obtidos por *shotgun*, podem ser facilmente alcançadas através de protocolos relativamente simples e com acurácia predizerem o status de infecção por *Wolbachia* na amostra analisada, tornando as análises de diagnóstico por PCR desnecessárias nos dias de hoje (RICHARDSON et al., 2012).

Ellegaard et al. (2013) criaram um protocolo para purificação da *Wolbachia* a partir do hospedeiro e subsequente amplificação do genoma completo para seu sequenciamento. Além da nova metodologia proposta, compararam os genomas obtidos com outros já sequenciados, e corroboraram através de análises filogenéticas, a separação genética em dois supergrupos (A e B) e sugeriram que esses supergrupos deveriam de fato serem considerados diferentes espécies. Metodologias como a proposta por eles, oferecem a possibilidade de estudos em larga escala que abranjam os genomas de endossimbiontes, o que facilitaria a compreensão dos processos de especiação pelos quais a *Wolbachia* está sujeita.

Diante da complexa relação entre a *Wolbachia* e o genoma do hospedeiro, existe a preocupação sobre qual seria a influência da bactéria em genomas como o mtDNA. Smith et al. (2012) investigaram se o potencial de amplificações involuntárias da COI de *Wolbachia* a partir de extrações de DNA genômico de insetos hospedeiros estaria dificultando as identificações através do uso do *barcode*, que também usa o fragmento COI do inseto. Verificaram que o *barcode* de DNA não é comprometido pela presença de *Wolbachia* nas amostras, pois apesar de ser um dos genes que compõem o *multilocus* utilizado para caracterizar a *Wolbachia*, existe uma limitada sobreposição com o DNA eucariótico da região de *barcode*.

O cenário atual sobre a endobactéria *Wolbachia* e a falta de análises aprofundadas em alguns insetos, especialmente formigas, demonstram a necessidade de levantamentos e estudos relacionados com esse endossimbionte no Brasil. Indica também a necessidade de expansão de análises relacionadas com o *multilocus*, além da nova vertente que relaciona o sequenciamento de genomas completos da *Wolbachia*. Como muito bem levantado por Moran et al. (2008), apesar do grande progresso em entender as funções e dinâmicas da simbiose em populações de insetos, as novas pesquisas tem produzido tantas perguntas quanto respostas.

Objetivos

3 OBJETIVOS

Em formigas do gênero *Solenopsis*, análises fazendo uso da metodologia do *multilocus* são pouco exploradas, com apenas uma cepa registrada em *Solenopsis invicta* por Baldo et al. (2006). Portanto, devido à escassez de estudos e da importância de espécies do gênero *Solenopsis*, tanto por sua distribuição, ecologia e biologia, conhecer a dinâmica da *Wolbachia*, sua história evolutiva e seu impacto tornou-se um trabalho necessário e importante. Assim, objetivou-se analisar a diversidade genética de cepas de *Wolbachia* com a metodologia do *multilocus* em 38 amostras de ninhos de populações nativas de *S. geminata*, *S. invicta*, *S. megergates* e *S. saevissima* previamente diagnosticadas como infectadas por *Wolbachia* através do gene *wsp*, e realizar inferências filogenéticas.

Também foram objetos deste trabalho, testar a hipótese de coevolução do endossimbionte *Wolbachia* com formigas do gênero *Solenopsis* e a hipótese de recombinação entre as cepas encontradas.

Para alcançar os objetivos procurou-se:

- Caracterizar através da ferramenta molecular, as cepas de *Wolbachia* presentes em amostras de ninhos de populações nativas de *S. geminata*, *S. invicta*, *S. megergates* e *S. saevissima*, utilizando-se da metodologia denominada “*Multilocus Sequence Typing*” (MLST) e com os dados obtidos estabelecer as relações filogenéticas entre as diferentes cepas encontradas;
- Analisar a relação evolutiva entre as diferentes populações de *Wolbachia* e o inseto hospedeiro, para inferir com estes dados relações de transmissão vertical ou horizontal;
- Comparar os padrões das cepas e dos mitótipos encontrados nas espécies de formigas analisadas e relacionar os resultados em termos de coevolução;
- Comparar e relacionar o padrão das cepas encontradas com a distribuição geográfica das formigas analisadas e também das espécies, além de analisar a correlação entre as cepas e a localização geográfica do ninho;
- Analisar se os genes do MLST concatenados são eficientes na separação das cepas de *Wolbachia*, quando comparado com análise do gene *wsp*;
- Testar os genes do *multilocus* sequenciados em todas as amostras de ninhos de espécies de *Solenopsis* quanto à hipótese de recombinação entre eles;

- Comparar os dados do *multilocus* gerados com dados de outras amostragens realizadas no Brasil com a finalidade de testar se existem cepas compartilhadas entre os diferentes grupos e qual a relação filogenética entre estas cepas.

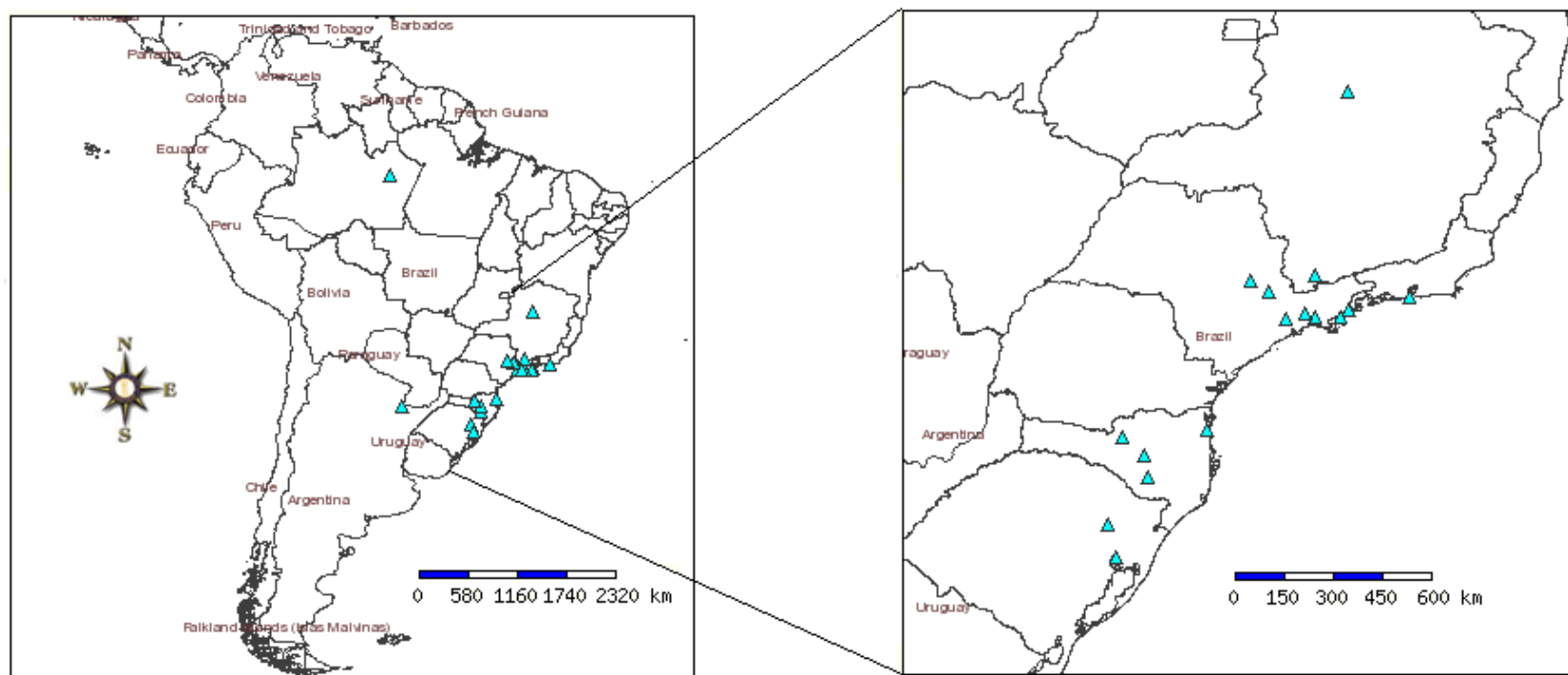
Materiais e Métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Análises de 114 amostras de ninhos de populações nativas de *Solenopsis* revelaram a presença de *Wolbachia* em 33 delas através do sequenciamento do gene *wsp* (MARTINS et al., 2012). Essas 33 amostras foram analisadas quanto à cepa da bactéria presente através da metodologia do MLST. É importante esclarecer que essas amostras não apresentaram múltiplas infecções através da análise do gene *wsp*, pois a premissa de infecção simples é necessária para a aplicação da metodologia do MLST segundo Baldo et al. (2006). Também foram utilizadas de cinco amostras de ninhos de *S. invicta* previamente analisados por Souza (2011), que também possuíam indicativo de infecção simples. A Figura 1 ilustra as localidades de coletas dos 38 ninhos e a Tabela 1 especifica cada uma das amostras com a respectiva espécie indicada, localidade e dados da coordenada geográfica.

A identificação morfológica das formigas foi baseada em Trager (1991) e Pitts (2002). Porém, a diferenciação visual de espécies de *Solenopsis* é dificultada devido a um número reduzido de caracteres diagnósticos (PITTS et al. 2005). Neste sentido, fazendo o uso do sequenciamento do DNA mitocondrial das amostras coletadas, especificamente de parte da COI (citocromo oxidase I), as espécies determinadas morfológicamente foram confirmadas comparando o fragmento da COI com fragmentos depositados no GenBank. As espécies foram validadas quando as sequências obtidas eram similares aquelas depositadas no banco gênico, ou seja, quando altos valores de *score* ou *E-values* iguais ou próximos a zero foram obtidos.

Figura 1 - Localização geográfica dos pontos de coleta das amostras de *Solenopsis* analisadas.



Fonte: speciesMapper (2014).

Tabela 1 - Código de coleta, espécie, localidade e coordenadas geográficas dos locais de coleta das amostras submetidas à metodologia do *multilocus*.

Código de Coleta	Espécies	Localidade	Coordenadas geográficas
E1805	<i>S. invicta</i>	Corrientes, Argentina	S27°18'39" W58°33'44"
E1714	<i>S. saevissima</i>	Buritizeiro, MG	S17°25'20" W44°56'54"
E1686	<i>S. invicta</i>	Picinguaba, SP	S23°19'02" W44°54'04"
E1821	<i>S. saevissima</i>	Manaus, AM	S03°06'25" W60°01'34"
E1801	<i>S. invicta</i>	Corrientes, Argentina	S27°18'39" W58°33'44"
E1802	<i>S. invicta</i>	Corrientes, Argentina	S27°18'39" W58°33'44"
E1803	<i>S. invicta</i>	Corrientes, Argentina	S27°18'39" W58°33'44"
E1807	<i>S. invicta</i>	Corrientes, Argentina	S27°18'39" W58°33'44"
E1808	<i>S. invicta</i>	Corrientes, Argentina	S27°18'39" W58°33'44"
E1810	<i>S. invicta</i>	Corrientes, Argentina	S27°18'39" W58°33'44"
E1782	<i>S. megergates</i>	São Francisco, SC	S26°33'53" W48°43'10"
E1784	<i>S. invicta</i>	Lages, SC	S27°48'57" W50°22'17"
E1789	<i>S. invicta</i>	Pinto Bandeira, RS	S29°07'21" W51°26'56"
E1792	<i>S. saevissima</i>	S. Cristovão do Sul, SC	S27°15'32" W50°26'50"
E1738	<i>S. saevissima</i>	Rio de Janeiro, RJ	S22°58'51" W43°16'75"
E1740	<i>S. saevissima</i>	Rio de Janeiro, RJ	S22°58'51" W43°16'75"
E1749	<i>S. invicta</i>	Ubatuba, SP	S23°30'21" W45°07'55"
E1643	<i>S. megergates</i>	Caçador, SC	S26°46'32" W51°00'56"
E1644	<i>S. megergates</i>	Caçador, SC	S26°46'32" W51°00'56"
E1742	<i>S. saevissima</i>	São Paulo, SP	S23°32'53" W46°38'11"
E1743	<i>S. saevissima</i>	Ubatuba, SP	S23°30'21" W45°07'55"
E1751	<i>S. saevissima</i>	Ubatuba, SP	S23°30'21" W45°07'55"
E1713	<i>S. saevissima</i>	Buritizeiro, MG	S17°25'20" W44°56'54"
E1746	<i>S. saevissima</i>	Ubatuba, SP	S23°30'21" W45°07'55"
E1753	<i>S. saevissima</i>	Ubatuba, SP	S23°30'21" W45°07'55"

E1645	<i>S. invicta</i>	Caçador, SC	S26°46'32" W51°00'56"
Sol128	<i>S. invicta</i>	Campinas, SP	S22°49'21" W47°03'42"
Sol 106	<i>S. invicta</i>	Rio Claro, SP	S22°23'50" W47°32'56"
Sol158	<i>S. invicta</i>	Salesópolis, SP	S23°32'00" W45°50'55"
Sol71	<i>S. invicta</i>	Rio Claro, SP	S22°23'49" W45°50'55"
E1725	<i>S. invicta</i>	Porto Alegre, RS	S29°59'14" W51°09'580"
E1726	<i>S. invicta</i>	Porto Alegre, RS	S29°59'14" W51°09'580"
E1727	<i>S. invicta</i>	Porto Alegre, RS	S29°59'14" W51°09'580"
Sol48	<i>S. invicta</i>	Mogi das Cruzes, SP	S23°25'19" W46°05'24"
E1818	<i>S. geminata</i>	Manaus, AM	S03°06'25" W60°01'34"
E1822	<i>S. geminata</i>	Manaus, AM	S03°06'25" W60°01'34"
E1739	<i>S. invicta</i>	Rio de Janeiro, RJ	S22°58'51" W43°16'75"
E1646	<i>S. invicta</i>	Caçador, SC	S26°46'32" W51°00'56"

4.1 Extração de DNA

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

4.2 Reação de polimerização em cadeia (PCR)

4.2.1 DNA mitocondrial

Os fragmentos de DNA mitocondrial utilizados nas análises foram aqueles de Martins (2010) e de Souza (2011).

Os fragmentos com aproximadamente 920 pb (cerca de 780 pb do gene citocromo oxidase I, 70 pb do RNA transportador de leucina e 60 pb do gene citocromo oxidase II) foram amplificados com o uso dos primers C1-J-2195 (COI-RLR) (5' – TTGATTTTTTGGTCATCCAGAAGT – 3') e DDS-COII-4 (5' – TAAGATGGTTAATGAAGAGTAG – 3') (AHRENS et al., 2005; ROSS; SHOEMAKER, 1997), e quando esta combinação falhou na amplificação do fragmento desejado, no lugar do primer DDS-COI-4 foi utilizado o primer JerryGarcia-CI (5' – GGGAATTAGAATTTTGAAGAG – 3') (SHOEMAKER et al., 2006), que produz um fragmento com cerca de 780 pb. A amplificação foi realizada com um volume final de reação de 25 µL contendo de 250-500ng de DNA genômico e 0.2-0.4 µM (5-10 pmol) de cada primer fazendo uso do kit Ready-to-go (Amersham Pharmacia Biotech). O termociclador foi programado de acordo com o proposto por Ross; Shoemaker (1997). A confirmação das amplificações foi visualizada em gel de agarose 1%.

4.2.2 Isolamento de genes da *Wolbachia*

4.2.2.1 Gene *wsp*

Para a identificação das amostras infectadas por *Wolbachia* e para a determinação inicial das cepas, foram utilizados dois pares de primers: o par de *primer* controle EF1 α -532F (5' – AGGCAAATGTCTTATTGAAG – 3') e EF1 α -610R (5' – GCGGGTGCGAAGGTAACAAC – 3') (SHOEMAKER et al., 2000) que amplifica um fragmento de 400 pb do gene nuclear EF1 α (fator de alongação). O segundo par amplifica um fragmento variável de um gene que codifica para uma proteína de superfície da bactéria, com aproximadamente 600 pb, nomeado *wsp81F* (5' – TGGTCCATTAAGTGATGAAGAAAC – 3') e *wsp691R* (5' – AAAAATTAAACGCTACTCCA – 3') (BRAIG et al., 1998; ZHOU et al., 1998).

As amplificações foram realizadas com um volume final de 25µl, 250-500ng de DNA genômico, 5-10 pmol de cada *primer*, utilizando-se o kit Ready-to-go (Amersham Pharmacia Biotech). O termociclador foi programado de acordo com Braig et al. (1998) e Zhou *et al.* (1998). A confirmação das amplificações foi visualizada em gel de agarose 2%.

4.2.2.2 Determinação das cepas pela técnica de MLST

Para a tipagem da linhagem das cepas de *Wolbachia* foi utilizado o protocolo padrão de Baldo et al., (2006), onde foram amplificados e sequenciados cinco genes que compõe o MLST (*coxA*, *gatB*, *hcpA*, *ftsZ* e *fbpA*).

A Tabela 2 relaciona a combinação dos *primers* utilizados e as temperaturas de anelamento para cada par. Para a reação de PCR foi utilizado o protocolo padrão sugerido pelo *Wolbachia* MLST Database (<http://pubmlst.org/wolbachia/>) (JOLLEY; MAIDEN, 2010) com pequenas alterações. Foi utilizado um volume final de reação de 25 µl, cerca de 1,5 µl de DNA genômico, buffer 1X, dNTPs 0,2 mM, 1,5 mM de MgCl₂, 2,5 µl de cada *primer* com diluição de 1 µM e 0,5U de *Taq* DNA polimersase (Invitrogen). O termociclador foi programado seguindo também o sugerido pelo *Wolbachia* MLST Database: 94°C por 2 minutos, 37 ciclos de 94°C por 30 segundos, temperatura de anelamento específica para cada combinação de *primers* por 45 segundos, 72°C por 1,5 minutos, um ciclo final de 72°C por 10 minutos. A confirmação das amplificações foi visualizada em gel de agarose 1%.

Tabela 2 - Genes estudados, sequências dos *primers* utilizados, tamanho do produto e temperatura de anelamento (BALDO et al., 2006).

Gene	Sequência dos <i>primers</i>	Tamanho do produto (pb)	Temperatura de anelamento
<i>gatB</i>	gatB_F1: GAK TTA AAY CGY GCA GGB GTT gatB_R1: TGG YAA YTC RGG YAA AGA TGA	471	54°C
<i>coxA</i>	coax_F1: TTG GRG CRA TYA ACT TTA TAG coxA_R1: CT AAA GAC TTT KAC RCC AGT	487	54°C
<i>hcpA</i>	hcpA_F1: GAA ATA RCA GTT GCT GCA AA hcpA_R1: GAA AGT YRA GCA AGY TCT G	515	54°C
<i>ftsZ</i>	ftsZ_F1: ATY ATG GAR CAT ATA AAR GAT AG ftsZ_R1: TCR AGY AAT GGA TTR GAT AT	524	54°C
<i>fbpA</i>	fbpA_F1: GCT GCT CCR CTT GGY WTG AT fbpA_R1: CCR CCA GAR AAA AYY ACT ATT C	509	59°C

Fonte: Modificado de Baldo et al. (2006).

Em alguns casos, foi necessário o uso de *primers* alternativos, que são indicados para indivíduos com infecções duplas (supergrupos A e B) por Baldo et al. (2006) e descritos no *Wolbachia* MLST Database; estas infecções duplas não foram identificadas no sequenciamento do gene *wsp*. A Tabela 3 ilustra as combinações de *primers* para esses casos e as temperaturas de anelamento para cada combinação.

Tabela 3 - Genes estudados, especificidade do *primer*, nome do *primer*, sequência e temperatura de anelamento.

Gene	Específico para o supergrupo	Nome do <i>primer</i>	Sequência do <i>primer</i> (5'-3')	Temperatura de anelamento
<i>gatB</i>	B	gatB_BspecF1 gatB_R1	TAAGAATCGCAAGAATTCAC TGG YAA YTC RGG YAA AGA TGA	62°C
	A	gatB_AspecF1 gatB_R1	TTAGAGCAAGATGCAGGRAAGAGCG TGG YAA YTC RGG YAA AGA TGA	64°C
<i>coxA</i>	B	coxA_BspecF1 coxA_R1	ATACCCACCTYTRTCGCAAA CT AAA GAC TTT KAC RCC AGT	54°C
	A	coxA_AspecF1 coxA_R1	ATACCCACCTTTATCACAGG CT AAA GAC TTT KAC RCC AGT	56°C
<i>hcpA</i>	B	hcpA_F1 hcpA_BspecR1	GAA ATA RCA GTT GCT GCA AA TTCTTTGTCGCTMACTTYAATCAKG	55°C
	A	hcpA_F1 hcpA_AspecR1	GAA ATA RCA GTT GCT GCA AA TTCTARYTCTTCAACCAATGC	55°C
<i>ftsZ</i>	B	ftsZ_BspecF1 ftsZ_BspecR1	AAAGATAGCCATATGCTCTTT CATTGCTTTACCCATCTCA	59°C
	A	ftsZ_AspecF1 ftsZ_AspecR1	AAAGATAGTCATATGCTTTTC CATCGCTTTGCCCATCTCG	59°C
<i>fbpA</i>	B	fbpA_BspecF1 fbpA_BspecR1	GTTAACCCTGATGCTTACGAT CCRCCAGARAAAAYYACTATTC	58°C
	A	fbpA_AspecF1 fbpA_R1	TTAACCCTGATGCTTATGAC CCR CCA GAR AAA AYY ACT ATT C	55°C

Fonte: Modificado de *Wolbachia* MLST Database (2013).

Nos casos onde as combinações de *primers* já existentes não produziram reações de PCR positivas foi utilizada a técnica de PCR aninhada (ou *nested* PCR), sendo o DNA molde a diluição do produto da primeira PCR na proporção de 1:9.

Nos casos onde as combinações de *primers* já existentes obtiveram como produto de sequenciamento fragmento com tamanho inferior ao necessário para a aplicação da metodologia do MLST, foram utilizadas sequências gentilmente cedidas pela Dr^a Laura Baldo da Universidade da Califórnia, Riverside (Califórnia, EUA) e outras recuperadas de bancos de dados para produção de nova combinação de *primers* com o uso de programas que auxiliam o desenho, como Gene Runner Version 3.05 (Hastings Software Inc.) e a ferramenta do NCBI denominada Primer-BLAST (YE et al., 2012).

Para purificação dos produtos amplificados foi utilizado o kit GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare), seguindo as recomendações do fabricante. O resultado da purificação foi quantificado no NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific), e posteriormente em gel de agarose 1% corado com GelRedTM (Uniscience).

4.3 Sequenciamento do DNA

As reações de sequenciamento foram feitas com química BigDye Terminator (Applied Biosystem Inc.). Ambas as cadeias de DNA de cada amostra foram sequenciadas separadamente, usando os respectivos *primers*. Para tal, para as amostras do *wsp* e COI foi utilizado um sequenciador automático ABI Prism 377 (Applied Biosystem Inc.), e para as amostras do MLST foi utilizado sequenciador automático modelo 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem Inc.). As reações de sequenciamento foram feitas a partir de protocolo padrão fornecido pelo fabricante e com um volume final de 10 uL. Os produtos de extensão de DNA foram purificados adicionando-se tampão de acetato de sódio/ EDTA e utilizou-se álcool para a precipitação do DNA.

4.4 Análises dos resultados

4.4.1 Identificação das cepas

As sequências obtidas dos cinco genes do MLST, foram inicialmente analisadas separadamente com o uso do programa BioEdit (HALL, 1999) e alinhadas por meio do aplicativo ClustalW (HIGGINS et al., 1992) e editadas manualmente.

A inferência das cepas da endobactéria foi feita comparando-se os dados obtidos com aqueles do *Wolbachia* MLST Database (<http://www.pubmlst.org/wolbachia/>). Segundo a convenção do MLST (MAIDEN et al., 1998; URWIN; MAIDEN, 2003), Baldo et al., (2006) e o *Wolbachia* MLST Database (2013), para cada um dos cinco genes, cada sequência distinta presente no gênero *Wolbachia*, é designada um único número de alelo.

Nos casos onde o alelo não estava registrado no banco de dados, foi realizado o depósito do novo alelo encontrado de acordo com as regras do *Wolbachia* MLST Database. A metodologia do MLST solicita que quando se encontra um novo alelo, este seja registrado no *Wolbachia* MLST Database (<http://pubmlst.org/wolbachia/>) (JOLLEY; MAIDEN, 2010). Segundo o *Wolbachia* MLST Database, para o registro de um novo alelo o pesquisador deve fornecer detalhes das sequências, como os eletroferogramas e os arquivos gerados pelo sequenciamento para a verificação pelo curador do banco de dados. Ou seja, existe um controle rígido, de maneira que estas sequencias e seus respectivos novos alelos sejam provenientes de dados confiáveis, dos quais os eletroferogramas não podem possuir picos

duvidosos ou sobrepostos, o que significa que a sequência precisa ser de excelente qualidade, sem indícios de múltipla infecção.

Para a tipagem das cepas por MLST, o número de diferenças de nucleotídeos entre alelos é ignorado e sequências são consideradas alelos diferentes mesmo se diferirem em um único local de nucleotídeo ou em muitos locais, e para cada alelo distinto é atribuído um valor arbitrário (*Wolbachia* MLST website, 2013). Cada cepa é, portanto, caracterizada por uma série de cinco números que correspondem aos alelos presentes nos cinco loci e para cada uma delas, a combinação específica dos cinco alelos define o seu perfil alélico (*Wolbachia* MLST website, 2013). Cada perfil alélico único é simplesmente identificado como um tipo de sequência (ST), também chamada de cepa, estirpe ou linhagem, seguido de um número onde idênticos perfis alélicos correspondem à mesma ST e esta pode ser compartilhada entre diferentes cepas (*Wolbachia* MLST website, 2013).

As STs ainda desconhecidas foram registradas de acordo com as regras do *Wolbachia* MLST Database.

4.4.2 Network e Diversidade Genética

O número e a frequência de haplótipos únicos da endobactéria, sua relação e outras informações referentes, por exemplo, a porcentagem de nucleotídeos, foram determinadas com os programas DnaSP4.90 (ROZAS et al., 2003) e Network4.5 (fluxus-engineering.com) utilizando o parâmetro Median Joining (BANDELT et al., 1999). O programa DnaSP4.90 (ROZAS et al., 2003) também foi utilizado para determinar a diversidade genética (P_i), número de sítios variáveis (VI), assim como a razão de substituições sinônimas e não sinônimas (K_a/K_s).

4.4.3 Análises de recombinação

Análises de recombinação utilizando os dados concatenados do MLST foram realizadas com o uso dos programas MaxChi (SMITH, 1992) e GENECONV (PADIDAM et al., 1999) presentes no pacote de programas RDP3 (MARTIN et al., 2010), fazendo uso do padrão *default*. Utilizando-se as orientações do tutorial do programa todos os eventos foram manualmente checados e apenas eventos de recombinação sustentados por pelo menos três métodos foram aceitos.

4.4.4 Análise de eBURST

O programa eBURST V3 (FEIL et al., 2004) foi utilizado na tentativa de identificar grupos que teriam genótipos relacionados, ou seja, que compartilhem alelos do MLST com outros membros, no caso, com todos os depósitos do *Wolbachia* MLST Database.

4.4.5 Análises Filogenéticas

Foram reconstruídas três filogenias para os dados concatenados do MLST (2079 pb) gerados no presente trabalho:

- a primeira delas com dados provenientes do *Wolbachia* MLST Database relativos a todos os Formicidae depositados até o momento da análise, a fim de analisar a relação evolutiva entre as diferentes populações de *Wolbachia* e o inseto hospedeiro, padrões de distribuição geográfica, padrões de transmissão, entre outros;

- uma segunda análise com os dados provenientes de STs de insetos depositadas no *Wolbachia* MLST Database relativas a amostragens do Brasil provenientes de três autores diferentes (*Diaphorina citri* de Guidolin (2012) e Guidolin; Cònsoli (2013); *Anastrepha fraterculus* de Prezotto (2012); de *Camponotus textor* de Ramalho, M. O. (não publicado)) e também aos diferentes supergrupos até então sequenciados com a metodologia do MLST, com a finalidade de testar se existem cepas compartilhadas entre os diferentes grupos, qual a relação filogenética entre estas cepas e padrões de distribuição e transmissão;

- uma terceira, para examinar a relação entre os haplótipos de COI dos hospedeiros com as cepas de *Wolbachia* e prováveis indicativos de coevolução, reconstruindo duas filogenias, sendo uma delas apenas com as STs provenientes do presente trabalho e a outra com os dados de COI referentes a cada cepa aqui definida (e um grupo externo proveniente do *Wolbachia* MLST Database que continha tanto a informação de COI quanto da cepa para enraizar as filogenias).

4.4.5.1 Dados concatenados do MLST X MLST de Formicidae do *Wolbachia* MLST Database

A reconstrução da primeira filogenia para os dados concatenados do MLST juntamente com outros dados provenientes do *Wolbachia* MLST Database de Formicidae (ilustrados na Tabela 4) foi realizada com quatro metodologias diferentes: máxima parcimônia

(MP), máxima verossimilhança (MV) (ambas com o com o programa PAUP, versão 4.0 (SWOFFORD, 2003)), inferência bayesiana (IB) com o programa MrBayes (HUELSENBECK et al., 2001) e com o programa Clonal Frame (DIDELOT; FALUSH, 2007).

Tabela 4 - Dados provenientes do *Wolbachia* MLST Database de todas as cepas de Formicidae utilizadas para a construção da filogenia.

ST	Espécie	Autor do depósito
19	<i>Technomyrmex albipes</i>	Jacob Russel
	<i>Leptomyrmex</i> sp.	Jacob Russel
	<i>Pheidole plagiara</i>	Jacob Russel
	<i>Pheidole sauberi</i>	Jacob Russel
	<i>Leptogenys</i> sp.	Jacob Russel
	<i>Pheidole planifrons</i>	Jacob Russel
29	<i>Solenopsis invicta</i>	Laura Baldo
33	<i>Camponotus pennsylvanicus</i>	Laura Baldo
43	<i>Formica oculta</i>	Jacob Russel
44	<i>Pseudomyrmex apache</i>	Jacob Russel
45	<i>Stenamma snellingi</i>	Jacob Russel
46	<i>Azteca</i> sp.	Jacob Russel
47	<i>Wasmannia</i> sp.	Jacob Russel
48	<i>Metapone madagascariensis</i>	Jacob Russel
49	<i>Myrmica incompleta</i>	Jacob Russel
50	<i>Polyergus breviceps</i>	Jacob Russel
51	<i>Polyrhachis vindex</i>	Jacob Russel
52	<i>Anoplolepis gracilipes</i>	Jacob Russel
	<i>Lophomyrmex</i> sp.	
53	<i>Notoncus</i> sp.	Jacob Russel
54	<i>Myrmecorhynchus</i> sp.	Jacob Russel
55	<i>Pheidole minutula</i>	Jacob Russel
56	<i>Pheidole sciophila</i>	Jacob Russel
57	<i>Camponotus leonardi</i>	Jacob Russel
58	<i>Pheidole vallicola</i>	Jacob Russel
60	<i>Pheidole gatesi</i>	Jacob Russel
61	<i>Pheidole</i> sp.	Jacob Russel
63	<i>Dorymyrmex elegans</i>	Jacob Russel
78	<i>Opisthophthalmus chaperi</i>	Laura Baldo
111	<i>Odontomachus clarus</i>	Jacob Russel
112	<i>Ochetellus glaber</i>	Jacob Russel
114	<i>Pheidole colorandensis</i>	Jacob Russel
115	<i>Pheidole micula</i>	Jacob Russel
116	<i>Pheidole vistana</i>	Jacob Russel
117	<i>Pheidole obtusospinosa</i>	Jacob Russel
118	<i>Pheidole</i> sp.	Jacob Russel
120	<i>Aenictus</i> sp.	Jacob Russel
121	<i>Crematogaster</i> sp.	Jacob Russel
122	<i>Solenopsis</i> sp.	Jacob Russel
123	<i>Monomorium chinense</i>	Jacob Russel

Opisthophthalmus chaperi (Escorpionidae) foi utilizado como outgroup nas análises.
Fonte: *Wolbachia* MLST database (2013).

A filogenia pelo método de máxima parcimônia foi realizada com o uso do programa PAUP, versão 4.0 (SWOFFORD, 2003) usando Busca Heurística como algoritmo de busca. Para gerar os índices de bootstrap foram utilizadas 1000 réplicas.

A reconstrução da filogenia a partir de máxima verossimilhança foi realizada com o programa PAUP, versão 4.0 (SWOFFORD, 2003). A escolha do modelo evolucionário que melhor explica os dados foi realizada com do programa MrModeltest (NYLANDER, 2004). Para esses dados foram utilizados os parâmetros indicados na escolha do modelo, que foram Base=(0.3129 0.1589 0.2256) Nst=6 Rmat=(4.2816 20.2978 0.4743 1.0163 28.0689) Rates=gamma Shape=0.5944 Pinvar=0.5478. A busca heurística foi realizada fazendo uso do programa PAUP, versão 4.0 (SWOFFORD, 2003) com 100 réplicas de bootstrap.

A reconstrução da filogenia a partir da inferência bayesiana foi realizada com o programa MrBayes (HUELSENBECK et al., 2001) e também com o programa Clonal Frame (DIDELOT; FALUSH, 2007). O programa MrModeltest (NYLANDER, 2004) foi utilizado para definição do modelo evolutivo utilizado na análise com o programa MrBayes (HUELSENBECK et al., 2001). O modelo escolhido via AIC (Akaike Information Criterion) foi o GTR+I+G. Após a escolha do modelo, o programa MrBayes (HUELSENBECK et al., 2001) foi utilizado com uma proporção de sítios invariáveis e os restantes retirados de uma distribuição gama, a cadeia de Markov foi rodada por 4.000.000 gerações e amostradas a cada 200 gerações (até que o desvio padrão das frequências divididas, *split frequencies*, ficassem iguais ou abaixo de 0,01). Para sumarização dos valores paramétricos e das árvores geradas foram descartadas 10% das árvores e os valores de probabilidade posterior foram calculados com o restante das árvores.

Com o uso do programa Clonal Frame (DIDELOT; FALUSH, 2007), que utiliza de abordagem bayesiana para realização de análises de dados do MLST, com o intuito de realizar diversas inferências relacionadas com bactérias, os dados concatenados do MLST juntamente com outros dados proveniente do *Wolbachia* MLST Database foram submetidos à análise filogenética. Foram executadas corridas com 50.000 cadeias de Markov, com uma amostragem a cada 100 gerações. A corrida com o melhor *log-likelihood* foi escolhida para computar a árvore consenso, que foi calculada utilizando-se do padrão default (50%). Além disso, com o programa calculou-se a relação r/m (a razão das probabilidades de que um determinado sítio é alterado através da recombinação e mutação).

4.4.5.2 Dados concatenados do MLST X STs de amostragens do Brasil e diferentes supergrupos

A segunda análise com os dados obtidos no presente trabalho e dados provenientes de STs relativas a amostragens do Brasil e também aos diferentes supergrupos até então sequenciados com a metodologia do MLST (ilustrados na Tabela 5), ambos provenientes de dados depositados no *Wolbachia* MLST Database, foi realizada a partir de inferência bayesiana com o programa MrBayes (HUELSENBECK et al., 2001), sendo que a definição do modelo evolutivo foi previamente realizada fazendo uso do programa MrModeltest (NYLANDER, 2004), sendo que o modelo escolhido via AIC (Akaike Information Criterion) foi o GTR+I+G. O programa MrBayes (HUELSENBECK et al., 2001) foi utilizado com uma proporção de sítios invariáveis e os restantes retirados de uma distribuição gama, a cadeia de Markov foi rodada por 7.000.000 gerações e amostradas a cada 200 gerações (até que o desvio padrão das frequências divididas, *split frequencies*, ficassem iguais ou abaixo de 0,01). Para sumarização dos valores paramétricos e das árvores geradas foram descartadas 25% das árvores e os valores de probabilidade posterior foram calculados com o restante das árvores.

Tabela 5 - Dados relativos a depósitos do *Wolbachia* MLST Database provenientes de amostragens no Brasil e de vários supergrupos que foram utilizados para a construção da filogenia.

ST	Organismo	Supergrupo	Autor do depósito
78	<i>Opisthophthalmus chaperi</i>	F	Laura Baldo
72	<i>Opisthophthalmus granifrons</i>	F	Laura Baldo
124	<i>Ocymyrmex picardi</i>	F	Jacob Russel
8	<i>Cimex lectularius</i>	F	Laura Baldo
35	<i>Brugia malayi</i>	D	Laura Baldo
21	<i>Gryllus firmus</i>	B	Laura Baldo
7	<i>Chelymormpha alternans</i>	B	Laura Baldo
9	<i>Culex</i> sp. <i>C. pipiens</i> <i>C. quinquefasciatus</i>	B	Laura Baldo Jewelna Osei-Poku
225	<i>Diaphorina citri</i> *	NE	Fernando Consoli
173	<i>Diaphorina citri</i> *	NE	Fernando Consoli
175	<i>Diaphorina citri</i> *	NE	Fernando Consoli
174	<i>Diaphorina citri</i> *	NE	Fernando Consoli
236	<i>Diaphorina citri</i> *	NE	Fernando Consoli
3	<i>Acreae ecendon</i>	B	Laura Baldo
56	<i>Pheidole sciophila</i>	B	Jacob Russel
33	<i>Camponotus pennsylvanicus</i>	A	Laura Baldo
34	<i>Drosophila bifasciata</i>	A	Laura Baldo
13	<i>Anastrepha fraterculus</i> <i>Drosophila recens</i> <i>Rhagoletis cerasi</i> <i>Leucophenga maculosa</i> <i>Suillia</i> sp. <i>Rhagoletis cingulata</i> <i>Anastrepha fraterculus</i>	A	Leandro Prezotto Laura Baldo Wolfgang Arthofer Julie Stahlhut Julie Stahlhut Hanner Schuler Claudia Conte
1	<i>Drosophila melanogaster</i> <i>Anastrepha fraterculus</i>	A	Laura Baldo Leandro Prezotto
29	<i>Solenopsis invicta</i>	A	Laura Baldo
329	<i>Anastrepha fraterculus</i> **	A	Leandro Prezotto
330	<i>Anastrepha fraterculus</i> **	A	Leandro Prezotto
331	<i>Anastrepha fraterculus</i> **	A	Leandro Prezotto
332	<i>Anastrepha fraterculus</i> **	A	Leandro Prezotto
333	<i>Anastrepha fraterculus</i> **	A	Leandro Prezotto
347	<i>Camponotus textor</i>	A	Manuela de Oliveira Ramalho

* informações sobre as espécies provenientes de Guidolin; Cònsoli (2013), ** informações sobre as espécies provenientes de Prezotto (2012). ne: supergrupo não especificado.

Fonte: *Wolbachia* MLST database (2013).

4.4.5.3 Árvores em espelho: haplótipos dos hospedeiros X variação das cepas de *Wolbachia*

Na terceira análise a relação entre os haplótipos de COI dos hospedeiros e da variação entre as ST das cepas de *Wolbachia* encontradas neste trabalho foram comparadas através da

reconstrução de árvores de MV para ambos os conjuntos de dados. Ou seja, os conjuntos de COI correspondente a indivíduos que tiveram determinadas as cepas de *Wolbachia*, e o conjunto de cepas de *Wolbachia* determinadas via *multilocus* (os cinco genes concatenados) encontradas nas populações de *Solenopsis* aqui analisadas. Como grupo externo para a análise foi utilizado o dado de uma amostra depositada no *Wolbachia* MLST Database que continha tanto os dados da ST quanto do mesmo fragmento do DNAm utilizado aqui, proveniente de uma amostra de Formicidae, *Ocymyrmex picardi*, com infecção de *Wolbachia* de cepa do supergrupo F (respectivamente, DQ353328 proveniente do GenBank e ST124 proveniente do *Wolbachia* MLST Database). Para a análise de MV, foi realizada a escolha do modelo evolutivo que melhor se enquadra aos dados através do programa MrModeltest (NYLANDER, 2004). Para os dados de COI foram utilizados os parâmetros indicados na escolha do modelo, que foram Base=(0.3044 0.1889 0.1222) Nst=2 TRatio=6.4215 Rates=gamma Shape=0.1693 Pinvar=0. Para os dados de MLST foram utilizados os parâmetros indicados na escolha do modelo, que foram Base=(0.3077 0.1610 0.2307) Nst=6 Rmat=(4.6845 23.7954 0.9767 1.6454 37.0458) Rates=gamma Shape=0.6830 Pinvar=0.5369. A busca heurística foi realizada fazendo uso do programa PAUP, versão 4.0 (SWOFFORD, 2003) com 100 réplicas de bootstrap. As árvores foram então espelhadas e os ramos relacionados conectados com traços, para melhor visualizar a relação de coevolução, ou então, se as árvores indicariam a existência de cofilogenias.

4.4.6 Análises de correlação

Análises de distância genética aos pares foram realizadas com os dados da COI do hospedeiro e dos dados concatenados dos cinco genes do endossimbionte sequenciados neste trabalho com o uso do software de estatística R (R CORE TEAM, 2013) (<http://www.R-project.org>) com o pacote APE (PARADIS et al., 2004), fazendo uso do método de distância k80 (KIMURA, 1980). Uma matriz de distância geográfica aos pares entre as amostras foi calculada com os dados obtidos pelo GPS transformados em UTM, e a distância calculada através de distância euclidiana, fazendo uso do software de estatística R (R CORE TEAM, 2013) com o pacote rgdal (BIVAND et al., 2013). Para testar a correlação entre as matrizes (Matriz de distância genética de COI X Matriz de distância genética de MLST e Matriz de distância genética de MLST X Matriz distância geográfica), o teste de Mantel foi realizado com o software de estatística R (R CORE TEAM, 2013) com o pacote vegan (OKSANEN et al., 2013).

4.4.7 Mapa de distribuição das cepas

Mapas geográficos foram reconstruídos com as coordenadas geográficas dos pontos de coleta, através do website speciesMapper (SPECIESMAPPER, 2014) e as cepas correspondentes em cada localidade foram indicadas nos mapas.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Amplificação dos genes do MLST, Sequenciamento e Identificação dos alelos e cepas

De um total de 119 amostras coletadas, 38 que apresentaram infecções simples numa primeira observação através da detecção de *Wolbachia* por meio de Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) e sequenciamento do gene *wsp* (MARTINS et al., 2012; SOUZA, 2011) foram submetidas a metodologia de MLST.

As amostras de amplificação negativa com os *primers* do MLST foram submetidas a PCR *nested*, ou aninhada, para garantir que a baixa densidade da bactéria não produzisse resultado falso negativo. Em alguns casos, mesmo após a PCR *nested* não houve amplificação e nestas amostras foram utilizadas novas combinações de *primers* apresentadas na Tabela 2. Em outros casos em que o sequenciamento apresentou mistura de DNA, também foram utilizadas as combinações de *primers* da Tabela 2, sugeridas no *Wolbachia* MLST website (2013) por Laura Baldo.

No caso das amostras E1713, E1726, E1739, E1746, E1753, E1789, as amplificações fazendo uso dos pares de *primers* *ftsZ_AspectF1/ftsZ_AspectR1* e *ftsZ_BspectF1/ftsZ_BspectR1* sugeridos no *Wolbachia* MLST website apresentaram alelos com o tamanho menor que aquele necessário para a metodologia do MLST, fato este confirmado após o sequenciamento das amostras. Neste caso, foi desenhado especificamente para o presente trabalho, um novo par de *primers* que amplifica uma região do gene *ftsZ* de cerca de 480 pb, denominados *ftsZnewF* 5'-CATATGCTTTTCATTACAGCAGGAATGGGC - 3', e *ftsZnewR* 5'-CGCAGCTTCCGACGCACTAA - 3' com temperatura de anelamento de 60°C. Com a nova combinação de *primers*, foi possível sequenciar com sucesso o fragmento do gene *ftsZ* das amostras citadas, com o tamanho adequado para a metodologia do *multilocus*.

Todas as amostras de *Solenopsis* spp. infectadas por *Wolbachia* foram sequenciadas com sucesso em pelo menos um dos genes que compõem o MLST. A Tabela 6 sumariza os resultados obtidos além de outros dados gerados em trabalhos anteriores (MARTINS, 2010; MARTINS et al., 2012) que foram utilizados para análises no presente trabalho (o gene *wsp* e o gene COI).

Tabela 6 - Definição das ST das amostras analisadas com os respectivos códigos de coleta dos ninhos, coordenadas geográficas, definição do *wsp* referente a cada amostra assim como a COI, ST e *id* e os alelos correspondentes.

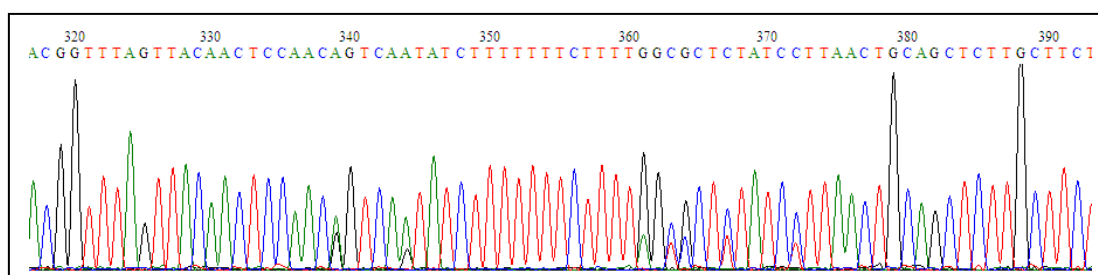
Código de coleta, espécie e localidade	Coordenadas Geográficas	<i>wsp</i>	HVR1	HVR2	HVR3	HVR4	ST	COI	<i>id</i>	<i>gatB</i>	<i>coxA</i>	<i>hcpA</i>	<i>ftsZ</i>	<i>fbpA</i>
E1805 inv Corrientes, Arg	S27°18'39" W58°33'44"	28	21	21	25	21	29	JN808817	515	19	20	22	17	20
E1714 sae Buritizeiro, MG	S17°25'20" W44°56'54"	28	21	21	25	21	314*	JN808797	516	75	184*	45	37	46
E1686 inv Picinguaba, SP	S23°19'02" W44°54'04"	59	21	40	42	39	315*	JN808784	517	196*	20	45	37	251*
E1821 sae Manaus, AM	S03°06'25" W60°01'34"	28	21	21	25	21	316*	JN808830	518	75	20	45	17	252*
E1801 inv Corrientes, Arg	S27°18'39" W58°33'44"	28	21	21	25	21	29	JN808817	519	19	20	22	17	20
E1802 inv Corrientes, Arg	S27°18'39" W58°33'44"	28	21	21	25	21	29	JN808817	520	19	20	22	17	20
E1803 inv Corrientes, Arg	S27°18'39" W58°33'44"	28	21	21	25	21	29	JN808817	521	19	20	22	17	20
E1807 inv Corrientes, Arg	S27°18'39" W58°33'44"	28	21	21	25	21	29	JN808817	522	19	20	22	17	20
E1808 inv Corrientes, Arg	S27°18'39" W58°33'44"	28	21	21	25	21	317*	JN808817	523	19	20	22	37	20
E1810 inv Corrientes, Arg	S27°18'39" W58°33'44"	28	21	21	25	21	29	JN808817	524	19	20	22	17	20
E1782 meg São Francisco, SC	S26°33'53" W48°43'10"	parc	42	43	198		315*	JN808826	525	196*	20	45	37	251*
E1784 inv Lages, SC	S27°48'57" W50°22'17"	505	42	43	198	269	318*	JN808819	526	19	20	55	37	46
E1789 inv Pinto Bandeira, RS	S29°07'21" W51°26'56"	parc	42	43	198		322*	JN808814	527	19	20	55	160*	46
E1792 sae S. Cristovão do Sul, SC	S27°15'32" W50°26'50"	parc	42	43	9		319*	JN808815	528	19	20	207*	43	253*
E1738 sae Rio de Janeiro, RJ	S22°58'51" W43°16'75"	28	21	21	25	21	29	JN808818	533	19	20	22	17	20
E1740 sae Rio de Janeiro, RJ	S22°58'51" W43°16'75"	28	21	21	25	21	29	JN808818	534	19	20	22	17	20
E1749 inv Ubatuba, SP	S23°30'21" W45°07'55"	505	42	43	198	269	318*	JN808783	537	19	20	55	37	46
E1643 meg Caçador, SC	S26°46'32" W51°00'56"	59	21	40	42	39	315*	JN808826	538	196*	20	45	37	251*
E1644 meg Caçador, SC	S26°46'32" W51°00'56"	59	21	40	42	39	315*	JN808826	539	196*	20	45	37	251*
E1742 sae São Paulo, SP	S23°32'53" W46°38'11"	50	42	43	9	269	320*	JN808781	540	19	20	207*	37	253*
E1743 sae Ubatuba, SP	S23°30'21" W45°07'55"	50	42	43	9	269	320*	JN808781	541	19	20	207*	37	253*
E1751 sae Ubatuba, SP	S23°30'21" W45°07'55"	parc	42	43	9		321*	JN808807	543	19	20	208*	43	253*
E1713 sae Buritizeiro, MG	S17°25'20" W44°56'54"	28	21	21	25	21	323*	JN808797	529	75	20	45	17	46
E1746 sae Ubatuba, SP	S23°30'21" W45°07'55"	28	21	21	25	21	29	JN808805	542	19	20	22	17	20
E1753 sae Ubatuba, SP	S23°30'21" W45°07'55"	28	21	21	25	21	29	JN808808	544	19	20	22	17	20
E1645_1 inv Caçador, SC	S26°46'32" W51°00'56"	59	21	40	42	39	324*	JN808837	535	196*	183*	45	17	251*
E1645_2 inv Caçador, SC	S26°46'32" W51°00'56"	59	21	40	42	39	325*	JN808837	536	196*	183*	45	17	254*
Sol128 inv	S22°49'21" W47°03'42"	parc	42	43	198		327*	KJ690243	546	19	20	210*	160*	46
Sol 106 inv	S22°23'50" W47°32'56"	parc	42	43	198		328*	KJ690242	547	3	20	210*	37	46
Sol158 inv	S23°32'00" W45°50'55"	parc	42	43	198		326*	KJ690244	548	3	20	210*	160*	46
Sol171 inv	S22°23'49" W45°50'55"	parc	42	43	198		326*	KJ690241	545	3	20	210*	160*	46
E1725 inv Porto Alegre, RS	S29°59'14" W51°09'580"	505	42	43	198	269	na	JN808802	530	19	20	55		46
E1726 inv Porto Alegre, RS	S29°59'14" W51°09'580"	505	42	43	198	269	na	JN808802	531	19	20	55		46
E1727 inv Porto Alegre, RS	S29°59'14" W51°09'580"	505	42	43	198	269	na	JN808803	532	19	20	55		46
Sol148 inv Mogi das Cruzes, SP	S23°25'19" W46°05'24"	parc	21	40			na	KJ690243	549	3		210*	37	
E1818 gem Manaus, AM	S03°06'25" W60°01'34"	28	21	21	25	21	na	JN808828	550				37	
E1822 gem Manaus, AM	S03°06'25" W60°01'34"	28	21	21	25	21	na	JN808832	551				37	

E1739 Rio de Janeiro, RJ	S22°58'51" W43°16'75"	parc	21	40	42		na	JN808826	552	19	20	45		251*
E1646_A inv Caçador, SC	S26°46'32" W51°00'56"	59	21	40	42	39	na	JN808838	553		20	45	37	251*
E1646_B inv Caçador, SC	S26°46'32" W51°00'56"	59	21	40	42	39	na	JN808838	554		20	45	37	254*

* indica alelos ou STs novos, encontrados pela primeira vez no presente trabalho. inv = *Solenopsis invicta*, sae = *S. saevissima*, meg = *S. megergates*, gem = *S. geminata*. na = não se aplica. parc = definição parcial do *wsp*. HVR = região hipervariável do gene *wsp*.

Das 38 populações analisadas, dez apresentaram evidências de múltipla infecção após a análise das sequências que compõem o MLST (amostras E1713, E1725, E1726, E1727, E645, E1646, E1739, E1746, E1789 e Sol48). Tais evidências se caracterizam por eletroferogramas com picos duplos para alguns nucleotídeos, com um exemplo ilustrado na Figura 2. Nos casos onde ocorreu a detecção de picos duplos no eletroferograma, este não foi evidente nos cinco genes que compõe o MLST. A Tabela 7 relaciona as amostras que apresentaram múltiplas infecções detectadas pelo MLST e quais foram os genes que apresentaram picos duplos. É importante ressaltar que o sequenciamento prévio do gene *wsp* não detectou essas múltiplas infecções, pois os picos do eletroferograma foram claramente únicos para este gene, sendo que estas foram apenas detectadas com o sequenciamento do *multilocus*, o que indica a ineficácia de separação fazendo uso de um único gene.

Figura 2 - Eletroferograma contendo um segmento de uma sequência com picos duplos, indicativo de múltipla infecção.



Amostra E1713 para o gene *ftsZ* onde foi utilizado o par de *primers* *ftsZ_F1* e *ftsZ_R1* de Baldo et al. (2006). Pode-se notar picos duvidosos e/ou duplos nas posições 339, 344, 361, 363, 364, 367 e 372.

Tabela 7 - Amostras com múltiplas infecções detectadas a partir do sequenciamento de um dos cinco genes do MLST através da presença de duplos picos no eletroferograma.

Código de coleta e espécie	Genes que apresentaram picos duplos no sequenciamento
E1713	<i>ftsZ</i>
E1725	<i>ftsZ</i>
E1726	<i>ftsZ</i>
E1727	<i>ftsZ</i>
E1645	<i>fbpA</i>
E1646	<i>gatB</i>
E1739	<i>ftsZ</i>
E1746	<i>ftsZ</i>
E1789	<i>ftsZ</i>
Sol48	<i>coxA</i> e <i>fbpA</i>

Vários genes das amostras com múltiplas infecções foram sequenciados com sucesso e tiveram seus alelos determinados, porém em alguns casos foi impossível separar a combinação correta dos genes que compõe o *multilocus* para cada amostra. Em uma única amostra foi possível detectar as duas cepas, pois um único alelo foi variável e a resolução da combinação dos cinco genes foi possível (amostra E1645, variação apenas no gene *fbpA*, com 60 nucleotídeos variáveis, ou 14%, correspondendo a ST324 e ST325). Para a amostra E1646 foi possível sequenciar apenas quatro dos cinco alelos do *multilocus*, com o *fbpA* com dois alelos diferentes separados com o uso dos *primers* alternativos da Tabela 3 e o *gatB* não foi determinado por conter mistura e esta não ser separada com sucesso com os *primers* alternativos. Salienta-se que no caso da amostra E1646, mesmo obtendo-se sucesso em sequenciar os genes do *gatB*, a combinação de alelos das cepas seria indeterminada, uma vez que haveria variação em mais de um alelo.

A amostra E1713, para a combinação de *primers* _AspecF1/*ftsZ*_AspecR1, além de ter apresentado tamanho menor do que o esperado para o fragmento para a metodologia do *multilocus* quando sequenciada, apresentou também evidência de múltipla infecção neste gene (a Figura 2 ilustra especificamente esta amostra). Apesar de ter sido possível sequenciar o fragmento com a nova combinação de *primers* para o fragmento do gene *ftsZ*, não foi possível sequenciar o outro provável alelo que existe nesta amostra. Possivelmente, esta dupla infecção teria uma das cepas em menor quantidade, o que dificultou o isolamento pela metodologia utilizada.

Para o gene *gatB*, foram encontrados quatro alelos diferentes nas amostras analisadas, sendo eles os alelos 19, 75, 196, 3. Os alelos 19, 75 e 196 segundo dados do *Wolbachia*

MLST Database foram descritos até o momento apenas em formigas e o alelo 3 em formigas e mosquito. Para o *coxA* foram detectados três alelos (20, 183 e 184) sendo que o alelo 20 foi, até o momento, encontrado em grande número em STs de formigas e em uma ST de aranha, e os alelos 183 e 184 foram detectados até o momento apenas em formigas. Para o *hcpA* seis alelos foram detectados (22, 45, 55, 207, 208 e 210) sendo que o alelo 22 foi encontrado em espécies de formigas e aranhas, os alelos 45, 55, 207, 208 e 210 apenas em formigas. Para o *ftsZ*, quatro alelos foram detectados no presente trabalho (17, 37, 160, 43) sendo o alelo 17 presente em formigas e cupim, e os alelos 37, 160 e 43 apenas em formigas segundo dados do *Wolbachia* MLST Database. Já para o *fbpA* seis alelos foram encontrados no presente trabalho (20, 46, 251, 252, 253 e 254) sendo o alelo 20 presente em formigas e cupim, os alelos 46, 251, 252, 253 e 254 apenas em formigas. A Tabela 6 ilustra os alelos e em quais amostras de ninhos foram encontrados. Esses dados demonstram a possibilidade de alelos específicos para formigas existirem, ou mesmo alelos relacionados com a ecologia dos hospedeiros, apesar do baixo número de amostragem também poder ser discutido. Ressalta-se que os resultados encontrados não compartilham sequer um alelo com os demais trabalhos de associação de *Wolbachia* e insetos hospedeiros coletados no Brasil (ou seja, de Guidolin; Cònsoli (2013) e Prezotto, (2012)). Além disso, o baixo número de alelos encontrados para alguns genes estudados impossibilita uma análise filogenética separada para cada alelo.

Dentre esses alelos, um total de 11 novos que compõem o MLST foram encontrados nas amostras de *Solenopsis* analisadas. Para o *gatB* foi encontrado um alelo inédito (o alelo 196), para o *coxA* dois alelos (183 e 184), para o *hcpA* três alelos (207, 208 e 210), para o *fbpA* quatro alelos (251, 252, 253 e 254), e para o *ftsZ* um alelo (160). A Tabela 6 ilustra esses alelos com um asterisco e em quais amostras foram encontrados. Esses novos alelos identificados são potencialmente específicos de formigas, podendo ser até mesmo específicos do gênero.

Nas populações E1818 e E1822 foi possível obter somente as sequências para o gene *ftsZ*, utilizando a combinação de *primers* padrão de Baldo et al. (2006), para os demais genes a amplificação foi sem sucesso, apresentando baixos níveis de amplificação ou nenhuma amplificação. Perfis incompletos também foram gerados para as amostras E1725, E1726, E1727, Sol48, E1739 e E1646, estes devido à presença de múltipla infecção.

As definições das “sequence type” ou sequências tipo (STs) através do *Wolbachia* MLST database foram realizadas em 30 amostras que tiveram todos os cinco genes do MLST das cepas de *Wolbachia* que as infectam sequenciados e os resultados estão indicados na Tabela 6. As caracterizações dos perfis alélicos revelaram a presença de 16 STs nas amostras

deste estudo, sendo que destas, 15 foram novas e devidamente registradas no *Wolbachia* MLST Database; a ST 29 já anteriormente registrada por Baldo et al. (2004) foi bastante frequente nas amostras aqui analisadas. As novas STs provenientes das amostras de *Solenopsis* analisadas foram designadas pelo *Wolbachia* MLST Database como ST314 a ST328, indicadas com asterisco na Tabela 6.

Quando não são obtidos todos os cinco alelos para a caracterização de uma determinada cepa, um perfil parcial pode ser submetido ao banco de dados (*Wolbachia* MLST Database) e assim obtêm-se do banco de dados um número de identificação (denominado “*id*”) e todos os dados de uma determinada amostra, mesmo que com o MLST incompleto, ficam registrados, e desta maneira, mesmo que sejam dados parciais ou perfis incompletos de STs, eles fornecem informação sobre a diversidade de alelos, permitindo assim o crescimento de informações do banco (BALDO et al., 2006). Portanto, todas as amostras, mesmo aquelas que não apresentaram um perfil completo do MLST, foram submetidas ao banco de dados e possuem seus números de identificação. Os números de “*id*” das amostras aqui estudadas são 515 a 554, ilustrados na Tabela 6.

5.2 Diversidade Genética

A Tabela 8 resume os resultados encontrados nas análises de divergência genética para os dados concatenados, para todos os genes separadamente e para o *wsp*. A divergência encontrada entre as 16 sequências de STs do presente trabalho foi de 176 sítios variáveis (VI) dentro dos 2079 nucleotídeos dos dados concatenados, totalizando uma variabilidade de 8,4%. O gene que possuiu maior variabilidade foi o *fbpA* (14,9%) seguido de *coxA* (11,7%), *hcpA* (6,5%), *gatB* (5,7%) e o *ftsZ* (3,4%) como o menos variável. Apesar do gene *coxA* nas amostras aqui sequenciadas ter apresentado apenas dois alelos (20 e 183), a variabilidade foi grande entre eles (47 nucleotídeos variaram entre os 402 que compõem a região do *multilocus* para este gene). Para o *wsp*, a proporção de sítios variáveis foi de 10%.

A média K_a/K_s por gene encontrada foi < 1 (nos dados concatenados o valor encontrado foi 0,0973), o que indica que a evolução das cepas é na sua maior parte por substituições sinônimas, o que caracteriza um cenário de forte seleção purificadora, em concordância com os requisitos gerais para os loci do MLST (BALDO et al., 2006).

Tabela 8 - Diversidade genética das cepas de *Wolbachia* nos cinco alelos estudados que compõe o MLST, nos dados concatenados e no *wsp*.

Locus	Pi _(s)	Pi _(a)	K _a /K _s	% VI
<i>gatB</i>	0,03891	0,00551	0,1416088	5,691
<i>coxA</i>	0,04285	0,00409	0,0954492	11,691
<i>hcpA</i>	0,06292	0,00268	0,0425937	6,531
<i>ftsZ</i>	0,05248	0,00459	0,0874618	3,448
<i>fbpA</i>	0,02822	0,00532	0,1885187	14,918
Concatenado	0,04522	0,00440	0,0973	8,466
<i>Wsp</i>	0,15584	0,08145	0,5226514	10,808

5.3 Análise de recombinação

A análise de recombinação dos dados concatenados indicou que eventos de recombinação podem ter ocorrido entre várias STs, dentre elas as ST325, ST324, ST314 e ST328. A Tabela 9 resume os resultados de recombinação e as probabilidades (*P*) que sustentam os resultados encontrados e a Figura 3 ilustra os eventos detectados, indicando apenas os sítios polimórficos.

Na ST325 o resultado indicou que o início do ponto de quebra (*beginning breakpoint*) ocorreu na posição 771 e o final do ponto de quebra (*ending breakpoint*) ocorreu na posição 1639, sendo o parente próximo (*major parent*) indicado como sendo a ST328 e o parente distante (*minor parent*) a ST316. Na ST324 os pontos foram 21 e 763 respectivamente, com o parente próximo sendo a ST323 e o parente distante a ST325. Na ST314 foram 1 e 944 os pontos de quebra e os parentes próximo e distante, as ST318 e 327 respectivamente. Na ST328 foram 1210 e 1979 os pontos de quebra e os parentes próximo e distante as ST321 e 317.

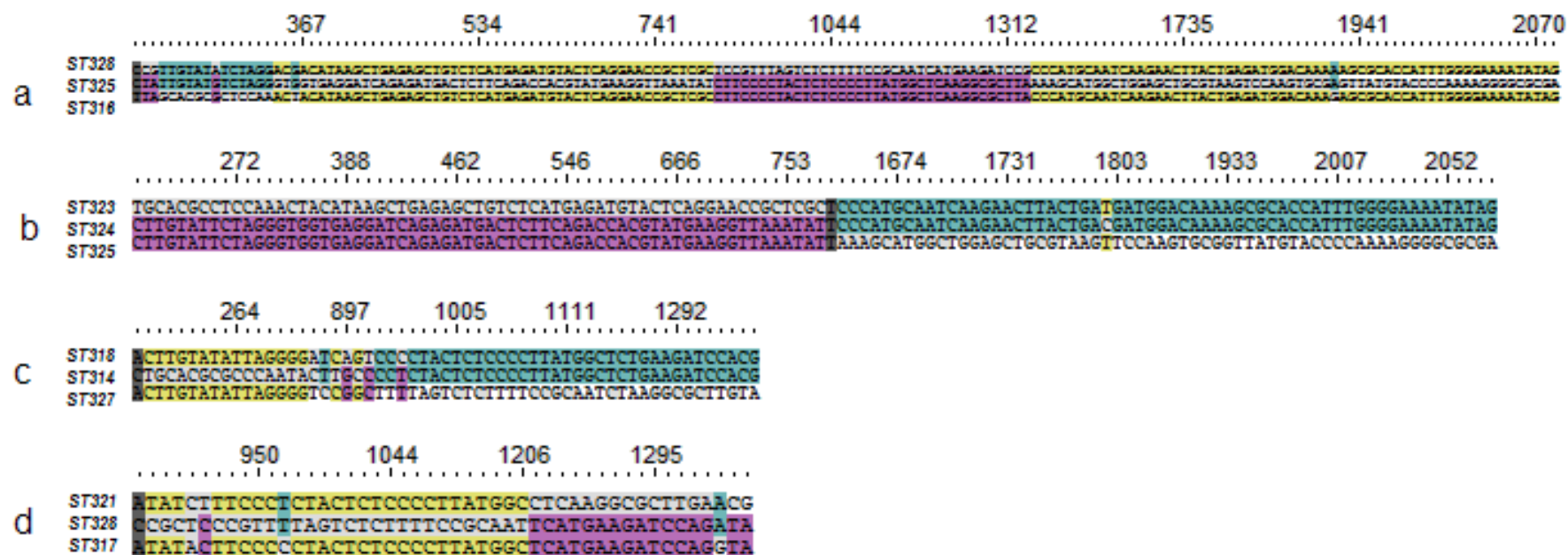
A recombinação foi testada apenas entre as sequências obtidas no presente estudo, e o resultado é um indicativo de que eventos de recombinação estão ocorrendo nas cepas encontradas em *Solenopsis*, porém, esses eventos parecem não ter relação com proximidade geográfica atual das amostras (nos casos da recombinação detectada na ST325, ST314 e 328, ver adiante mapa de distribuição das cepas), contudo pode-se admitir a falta de amostragens que poderiam demonstrar o contrário. Já o evento de recombinação indicado na ST324 pode ter relação quanto à localização geográfica, uma vez que as ST324 e ST325 foram detectadas ocorrendo em um mesmo ninho (E1645) e aqui estão indicadas como parentes distantes.

Tabela 9 - Resultados da análise de recombinação e valores de probabilidade (*P*).

Recombinant sequence	Valor de <i>P</i>	
	GENECONV	MaxChi
ST325 (MaP: ST328, MiP: ST316)	$1,171 \times 10^{-13}$	$5,266 \times 10^{-11}$
ST324 (MaP: ST323, MiP: ST325)	$3,799 \times 10^{-11}$	$1,426 \times 10^{-6}$
ST314 (MaP: ST318, MiP: ST327)	$1,349 \times 10^{-3}$	$9,194 \times 10^{-5}$
ST328 (MaP: ST321, MiP: ST317)	$3,296 \times 10^{-2}$	$2,547 \times 10^{-5}$

MaP: parente próximo (*major parent*), MiP: parente distante (*minor parent*).

Figura 3 - Eventos de recombinação detectados.



Apenas os sítios polimórficos estão representados para cada local. a. Recombinação entre ST325, ST328 (parente próximo) e ST316 (parente distante). b. Recombinação entre as ST324, ST323 (parente próximo) e ST325 (parente distante). c. Recombinação entre as ST314, ST318 (parente próximo) e ST327 (parente distante). d. Recombinação entre as ST328, ST321 (parente próximo) e ST317 (parente distante).

5.4 Análise de eBURST

Para avaliar a relação das cepas encontradas com aquelas depositadas no MLST database, foi realizada análise de eBURST, utilizando o aplicativo no próprio banco de dados. Até o momento da análise, o MLST database possuía 407 STs de diversos hospedeiros, que foram comparadas com os dados obtidos. Para a análise foi escolhido para definição de grupos que os perfis alélicos tivessem duas ou mais combinações de alelos com qualquer outro membro do grupo, ou seja, se as cepas compartilhavam pelo menos dois alelos elas ficariam agrupadas.

Os resultados da análise de eBURST indicaram a separação dos dados do MLST database (incluindo os dados aqui gerados) em 43 grupos. Porém, não foi possível reconstruir uma rede de relação entre as cepas encontradas com as demais depositadas no banco, pois não foi encontrada uma potencial cepa ancestral dentro dos grupos.

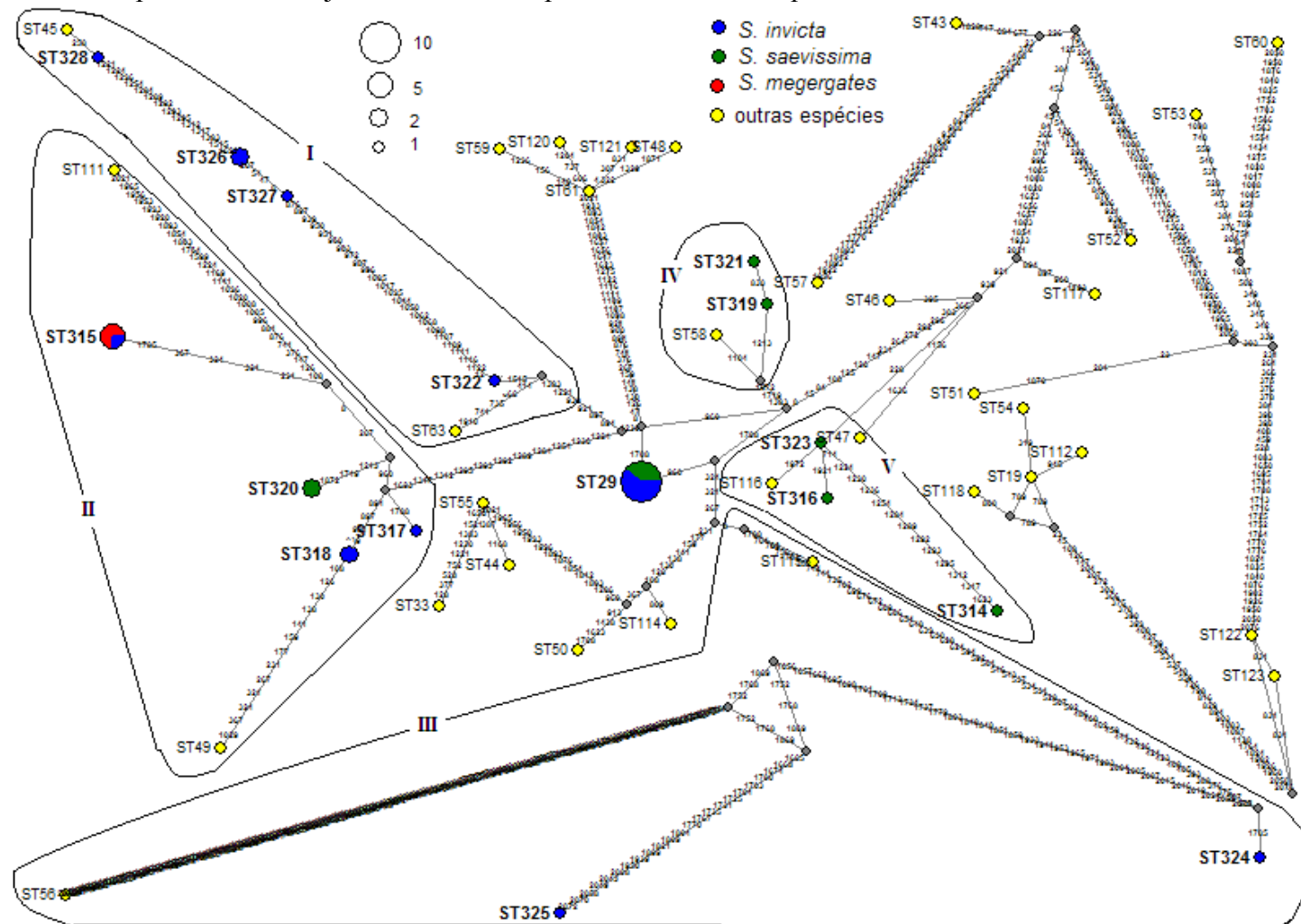
As cepas estudadas formaram dois agrupamentos na análise de eBURST, grupos de números 13 e 39. O primeiro que contém as ST314, ST316-ST323 e ST326-ST328 agrupado com a ST 29 (detectada no presente trabalho e também em formigas de outro estudo), 45, 46, 47, 49, 50, 58, 114, 115, 116, 117 e 347 (todas provenientes de formigas). O segundo grupo reuniu apenas as STs do presente trabalho, ST315, 324 e 325. Apesar dessas STs não compartilharem mais de dois alelos, pode-se perceber um indicativo de especialização em cepas de formigas, uma vez que estas se agruparam nesta análise. Não houve o compartilhamento de alelos entre as cepas encontradas e de trabalhos realizados em outras famílias de insetos em amostragens no Brasil, sendo o único compartilhamento encontrado com a ST347 proveniente de amostra do gênero *Camponotus*, evidenciando a possível especificidade em formigas, relacionada à história evolutiva, fisiologia ou na ecologia do hospedeiro.

5.5 Network

Como o eBURST não revelou uma cepa central para a construção de uma rede, foi elaborada a rede de cepas via network, mesmo reconhecendo a diferença entre separar as cepas de acordo com o número de mutações entre elas e a relação entre compartilhamento ou não de alelos como o eBURST considera, porém este tipo de análise pode ser mais apropriada que reconstrução de árvores devido aos genes que podem sofrer recombinação (PAGE; HOLMES, 1998).

A rede de cepas agrupou em cinco grupos principais, todos eles partindo de uma cepa “central”, a ST29 (Figura 4), que foi a mais frequente nas populações aqui analisadas (10 ocorrências em duas espécies de formigas, *S. invicta* e *S. saevissima*). Sua posição central e sua alta frequência podem ser indicativos de que seja uma cepa ancestral de formigas. Um dos ramos compreende as amostras das ST322, ST326, ST327, ST328 provenientes de *S. invicta* agrupadas com as ST45 (*Stenamma snellingi* dos EUA) e ST63 (*Dorymyrmex elegans*). Um segundo grupo, que tem como base a ST317 (*S. invicta*), seguido de um grupo composto da ST318 (*S. invicta*) e ST49 (*Myrmica incompleta* dos EUA), seguidos de um grupo com a ST320 (*S. saevissima*), ST315 (*S. megergates* e *S. invicta*) e ST111 (*Odontomachus clarus*). Um terceiro grupo com as ST325 (*S. invicta*) e ST324 (*S. invicta*) embasados pela ST115 (*Pheidole micula*). O quarto grupo que corresponde as ST58 (*Pheidole vallicola*), ST319 (*S. saevissima*), ST321 (*S. saevissima*). O quinto grupo com as ST316 (*S. saevissima*), ST314 (*S. saevissima*), ST323 (*S. saevissima*) agrupadas com a ST116 (*Pheidole vistana*). Os demais agrupamentos contem cepas de diversas espécies, de formigas provenientes de outras localidades, incluindo *Solenopsis* sp. proveniente da Tailândia (ST122) que se manteve afastada das demais. Salienta-se a tendência de agrupamentos distintos segundo origem das formigas do Novo e do Velho Mundo.

Figura 4 - Network das cepas encontradas juntamente com cepas de Formicidae depositadas no banco de dados.



As cepas referentes ao presente trabalho estão apresentadas em negrito. Cada um dos cinco grupos principais está indicado de I a V. Os números nas linhas que conectam cada cepa indicam os eventos de mutação entre elas. Os tamanhos dos círculos indicam as frequências em que foram detectadas as cepas no presente trabalho (legenda na figura).

5.6 Análises filogenéticas

A partir dos dados obtidos pelo sequenciamento do MLST, foram reconstruídas três filogenias, onde foram considerados os cinco genes, totalizando 2079 nucleotídeos, de todos os 16 perfis completos gerados.

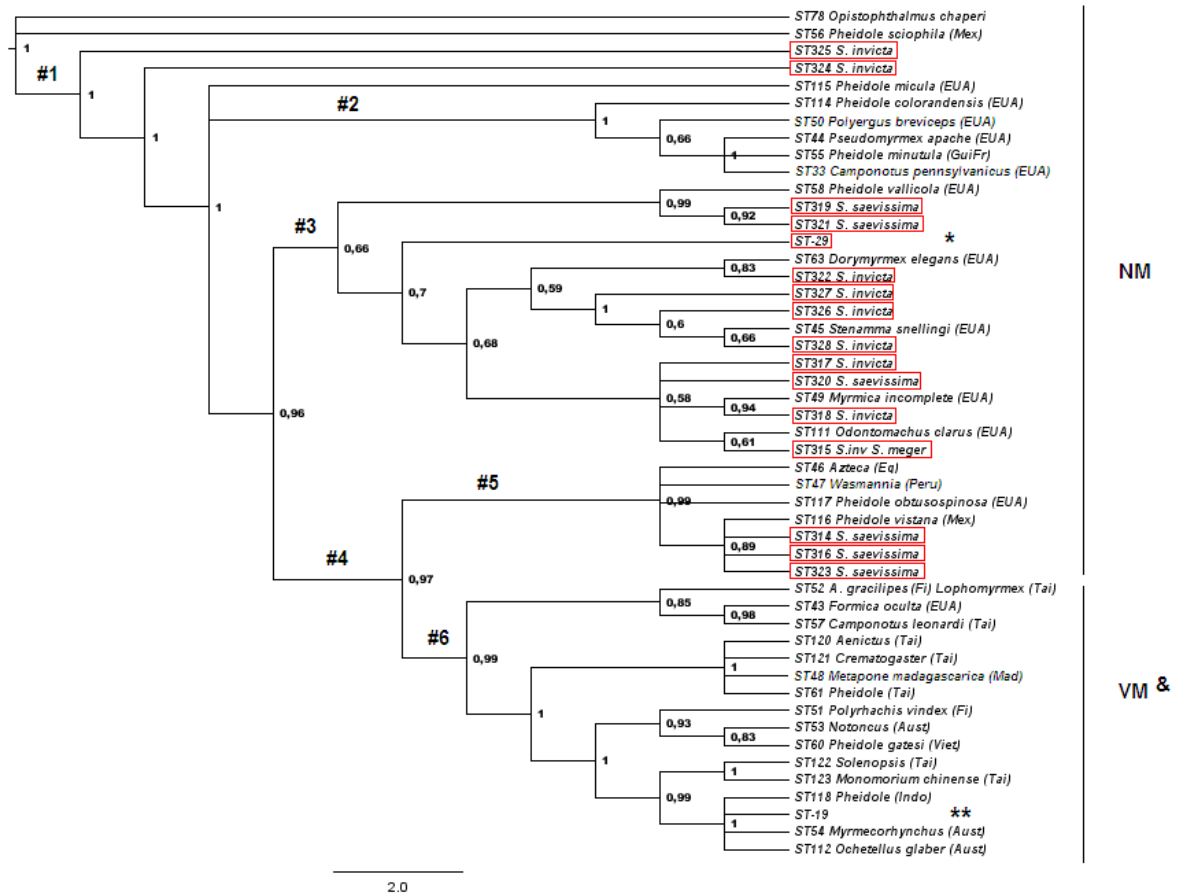
5.6.1 Dados concatenados do MLST de *Solenopsis* e de Formicidae do *Wolbachia* MLST Database

Na primeira análise filogenética, com dados de Formicidae provenientes do *Wolbachia* MLST Database juntamente com os dados encontrados no presente trabalho, foram utilizados três métodos de reconstrução (máxima parcimônia, máxima verossimilhança e inferência bayesiana), porém eles apresentaram topologias divergentes em vários pontos e serão consideradas para a discussão apenas aquelas obtidas pelo método de inferência bayesiana (Figura 5 MrBayes e Figura 6 Clonal Frame). As análises filogenéticas de MP e MV apresentaram muitas politomias, portanto não apresentaram boas resoluções para contemplar os objetivos do presente trabalho e estão ilustradas nos Apêndices 1 e 2.

As análises filogenéticas de inferência bayesiana realizadas com o MrBayes e Clonal Frame foram quase congruentes, indicando que o papel da recombinação detectada neste trabalho pode ser desprezado (GERTH et al., 2013). Além disso, o resultado da reconstrução de network (Figura 4) também separa os grupos de maneira similar aquela separação encontrada na Figura 5, dando suporte a proposta do papel negligenciável dos eventos de recombinação aqui detectados. Destaca-se que muitos nós basais da árvore reconstruída pelo Clonal Frame apresentam resoluções regulares (Figura 6), porém os nós derivados apresentaram boas resoluções e muitos deles congruentes com aqueles da Figura 4. Com o programa Clonal Frame foi possível estimar a razão das probabilidades de que um determinado sítio é alterado através da recombinação e mutação, ou seja, a probabilidade relativa de que um nucleotídeo seja alterado como um resultado de recombinação relativo à mutação pontual (denominado r/m), que foi de 2.65 (com 95% de região de credibilidade, com intervalo entre 1.65-3.84). Interpreta-se que a recombinação introduz 2.65 nucleotídeos por substituição a mais do que a mutação pontual durante a evolução da população (VOS; DIDELOT, 2009). Este valor é um pouco inferior que aquele padrão encontrado por Vos e Didelot (2009) para *Wolbachia*, que foi de 3.5.

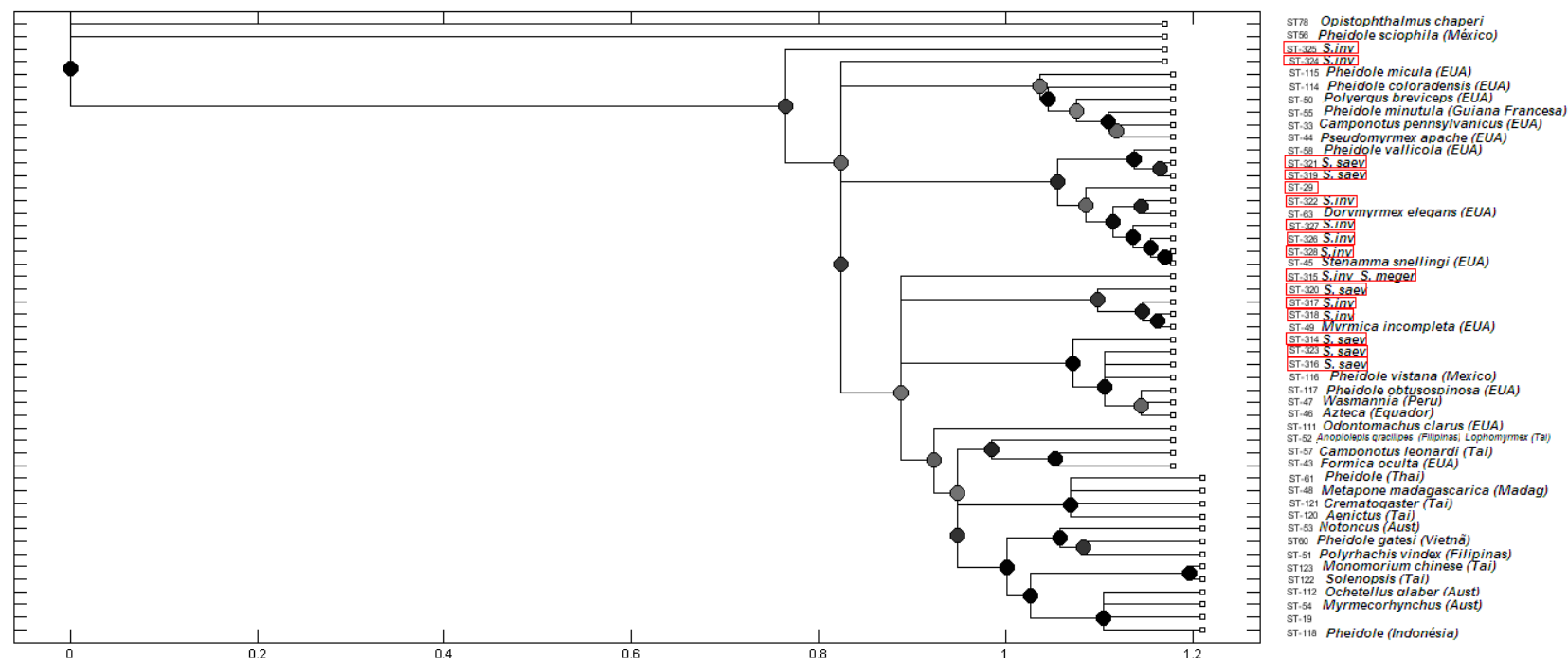
Além dos eventos de recombinação, a mutação pontual também tem um papel importante na origem e evolução das cepas de *Wolbachia* de *Solenopsis* do Brasil. Comparando-se algumas das STs encontradas salienta-se que nas ST319 e ST321 ocorreu uma mutação pontual no gene *hcpA* no nucleotídeo 62, nas ST326 e ST327 ocorreram mutações pontuais no gene *gatB* nos nucleotídeos 8, 47, 54 e 267, nas ST317 e ST320 ocorreram mutações pontuais nos genes *hcpA* (nucleotídeos 6, 189, 442) e *fbpA* (nucleotídeos 58, 69 e 222) e nas ST 317 e ST318 as mutações ocorreram nos genes *fbpA* (nucleotídeo 58) e *hcpA* (nucleotídeos 123, 126, 150 e 168).

Figura 5 - Relações filogenéticas encontradas a partir de inferência bayesiana com o programa MrBayes dos dados concatenados do *multilocus*.



Os terminais marcados em vermelho correspondem às STs detectadas no presente trabalho. NM = Novo Mundo, VM = Velho Mundo, & = exceto a ST43, * ST29 = *S. invicta* (Argentina e Brasil), *S. saevissima* (Brasil). ** ST19 = *Ephestia kuehniella* (localidade não especificada), *Technomyrmex albipes* (Filipinas), *Leptomyrmex* sp. (Austrália), *Ornipholidotos peucetia* (África do Sul), *Pheidole plagiara* (Tailândia), *Pheidole sauberi* (Tailândia), *Leptogenys* sp. (Tailândia), *Pheidole planifrons* (Tailândia), *Ceutorhynchus neglectus* (Canadá). #1-6 equivalem as divisões para a descrição da árvore. Os valores de probabilidade posterior estão indicados nos ramos.

Figura 6 - Relações filogenéticas encontradas a partir de inferência bayesiana com o programa Clonal Frame dos dados concatenados do *multilocus*.



Os círculos nos ramos indicam os valores de suporte, sendo o preto indicando maior confiança e o branco seria indicativo de menor confiança. ST29 = *S. invicta* e *S. saevissima*. ST19 = *Ephesia kuehniella*, *Technomyrmex albipes*, *Leptomyrmex* sp., *Ornipholidotos peucetia*, *Pheidole plagiara*, *Pheidole sauberi*, *Leptogenys* sp., *Pheidole planifrons*, *Ceutorhynchus neglectus*

A análise da filogenia estruturada na Figura 5 permite dividi-la em seis grupos (indicados na figura). O grupo #1 é constituído pelos ramos basais, onde se encontram duas amostras do presente trabalho, ST326 e ST324, ambas de *S. invicta*. O grupo #2, irmão dos grupos #3 e #4, possui apenas STs provenientes de outros trabalhos. O grupo #3 pode ser dividido em quatro grupos, sendo o primeiro deles o mais basal e composto pelas ST319 e ST321 de *S. saevissima* com a ST58 de *Pheidole vallicola* basal a eles; o segundo é composto pela ST29 que parece ter uma posição ancestral em relação às demais neste grupo #3; o terceiro composto por quatro STs geradas no presente trabalho provenientes de *S. invicta* (ST322, 327, 326, e 328) agrupadas com STs provenientes de duas espécies diferentes de origem Norte Americana (STs 45 e 63); o quarto composto por STs provenientes de amostras do presente trabalho das espécies *S. invicta*, *S. saevissima* e *S. megergates* novamente agrupadas com STs provenientes de espécies de origem Norte Americana. O grupo #5 é composto por STs com posição derivada de *S. saevissima*, com STs basais de espécies diferentes e de origens Peruana, Equatoriana e Norte Americana. O grupo #6 agrupou em sua maioria STs derivadas de formigas do Velho Mundo, com exceção de uma ST proveniente de amostragem Norte Americana. É importante ressaltar que a ST122, proveniente de *Solenopsis* sp. de amostragem Tailandesa agrupou-se com este ramo na análise filogenética.

O resultado encontrado nessa filogenia permite evidenciar a separação entre Novo e Velho Mundo (ilustrado na Figura 5), já descrita em outros trabalhos, com exceção da ST43 (*Formica oculta* de origem Norte Americana) que se agrupou com as STs do Velho Mundo.

A distribuição das cepas da Figura 5 indica a complexa história evolutiva dessas cepas em *Solenopsis*. Elas não se agruparam quanto à espécie de formiga, nem mesmo quanto à localização geográfica do ninho, além de estarem distribuídas de maneira bastante difusa na árvore filogenética, formando agrupamentos com as mais diversas espécies (por exemplo, grupos #3 e #5). Este padrão pode ser interpretado como um indicativo de transmissões horizontais de *Wolbachia* para espécies de formigas do gênero *Solenopsis*.

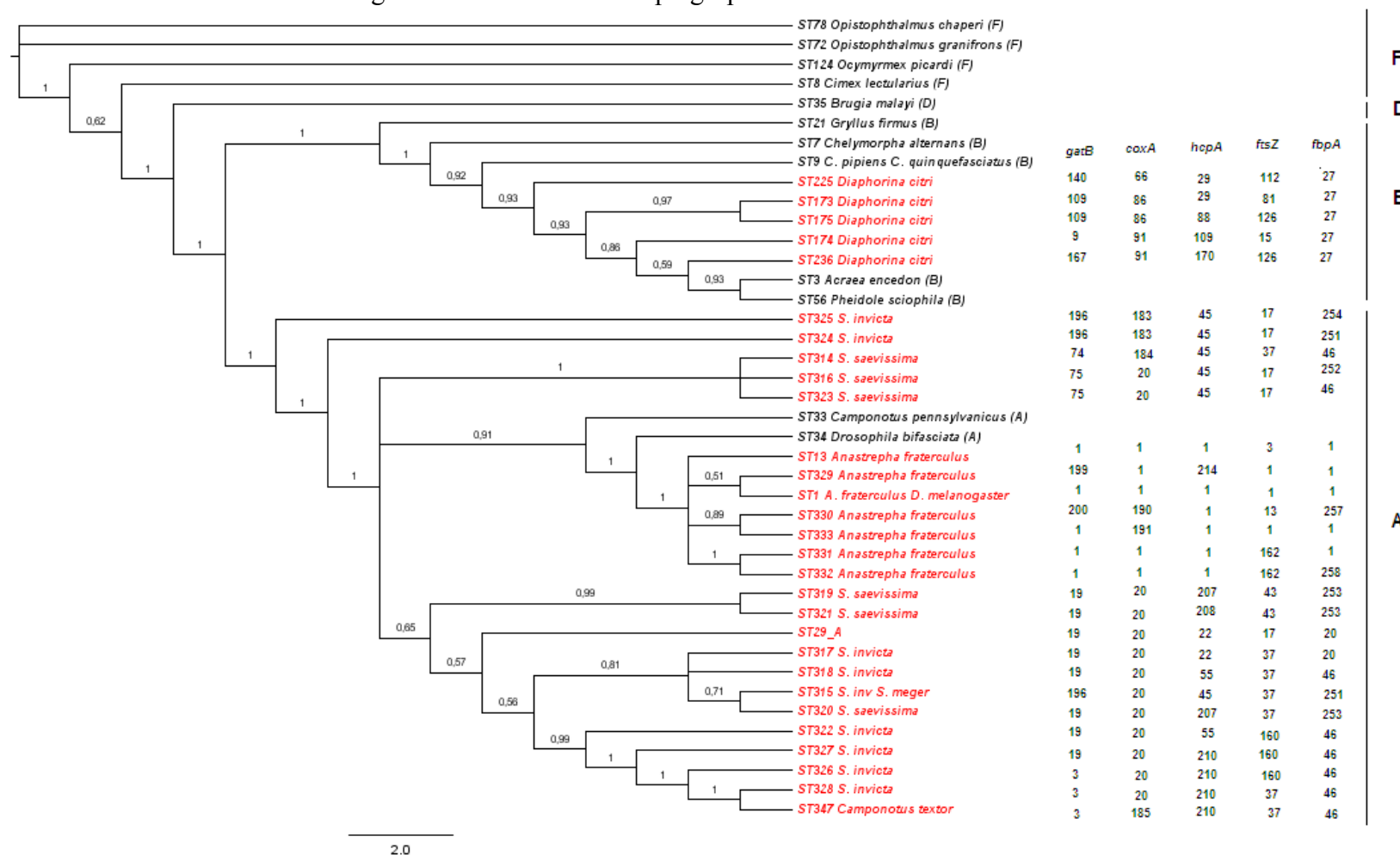
5.6.2 Dados concatenados do MLST de *Solenopsis*, STs de amostragens do Brasil e diferentes supergrupos

A segunda análise filogenética, foi realizada com os dados obtidos, em conjunto com dados provenientes de trabalhos com amostragens de outros insetos realizadas no Brasil e também com cepas dos vários supergrupos definidos pelo MLST e está ilustrada na Figura 7.

A análise filogenética revela a separação em supergrupos (F e D como basais e B e A como grupos irmãos e derivados). Evidencia-se que as amostras de cepas do presente trabalho agrupam-se no supergrupo A, diferente da definição de supergrupo anterior pelo *wsp* (em Martins et al., 2012) evidenciando a ineficácia do *wsp* para a definição de supergrupos.

A análise da Figura 7 revela a separação das amostragens realizadas no Brasil, com a formação de um agrupamento de *Diaphorina citri* (psílideo) (provenientes do trabalho de Guidolin (2012) e Guidolin; Cònsoli (2013)), um agrupamento de *Anastrepha fraterculus* (mosca-da-fruta) (provenientes do trabalho de Prezotto (2012)) e dois agrupamentos das amostras provenientes do presente trabalho. Essa separação é uma evidência do não compartilhamento de cepas dessas amostragens ou mesmo de alelos (ilustrados na tabela ao lado da Figura 7), provavelmente evidência de uma história evolutiva diferente dos 3 grupos de espécies e/ou pela diferença na ecologia e fisiologia de cada um desses grupos.

Figura 7 - Relações filogenéticas encontradas a partir de inferência bayesiana com o programa MrBayes dos dados concatenados do *multilocus* juntamente com dados de outras amostragens do Brasil e outros supergrupos de outras localidades.



As letras indicadas à direita indicam os supergrupos aos quais pertencem as amostras. A tabela a direita da árvore indica os alelos correspondentes a cada cepa. Em vermelho estão destacadas as amostras provenientes de coletas no Brasil. A probabilidade posterior está indicada nos ramos.

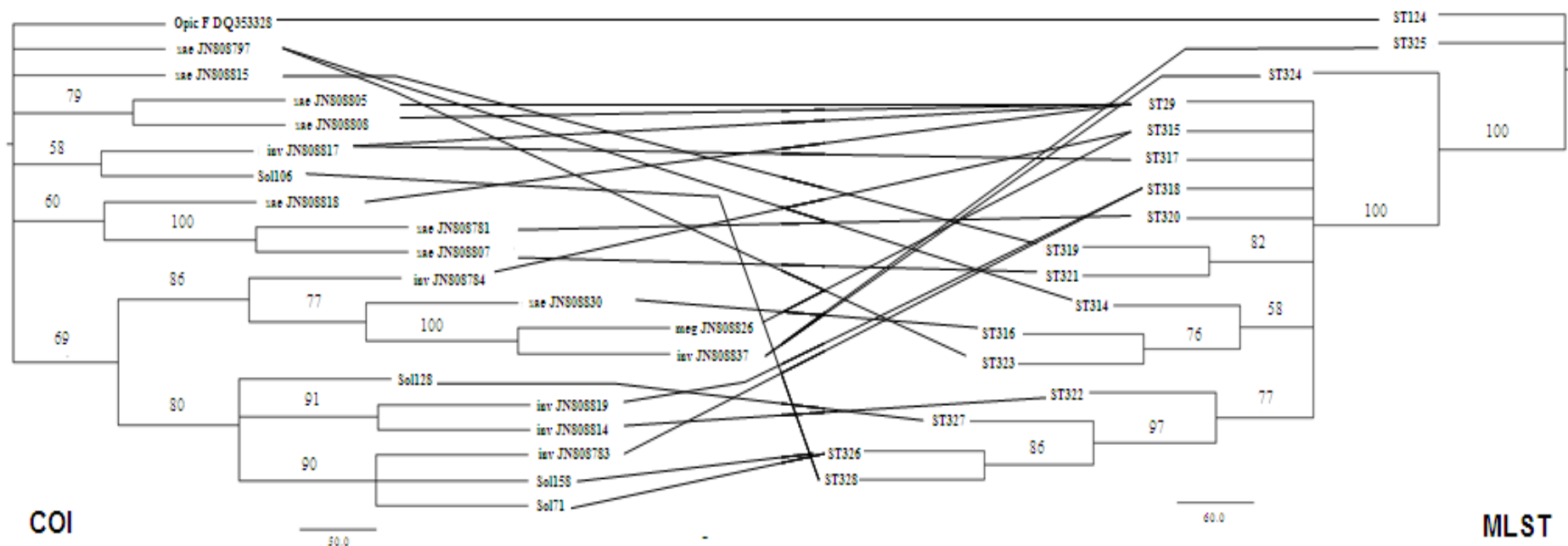
5.6.3 Árvores em espelho: haplótipos dos hospedeiros X variação das cepas de *Wolbachia* de *Solenopsis*

Com a finalidade de encontrar padrões de coevolução entre os mitótipos das espécies analisadas e as STs de *Wolbachia* foi realizada a terceira análise filogenética de MV dos dados de COI (totalizando 772 pb) das formigas e do MLST.

As árvores foram espelhadas para comparação visual das relações entre os mitótipos e as STs. A Figura 8 ilustra as árvores e traços ligam os respectivos mitótipos às STs correspondentes encontradas nas formigas que possuíam cada um dos mitótipos.

A Figura 8 indica que as análises filogenéticas não correspondem a cofilogenias, pois não são árvores espelhadas, porém pode-se notar que em certos ramos existe a tendência de algumas correspondências, podendo ser considerados eventos pontuais de coevolução. A ST29 foi encontrada em sete ninhos que possuíam a mesma COI (JN808817) (Tabela 6 e Figura 8). Além disso, a ST29 foi encontrada em ninhos com COI situadas como irmãs na filogenia. Ainda, a ST317, situada como irmã da ST29, também foi encontrada em ninho com COI idêntica aquela encontrada com infecção pela ST29 (COI JN808817). A ST316 foi encontrada associada a COI de grupos irmãos (JN808819 e JN808783). A ST326 foi associada a COI irmãs (Sol 158 e Sol71).

Figura 8 - Filogenias comparativas entre as STs e os mitótipos do presente trabalho.



Esquerda: Relações filogenéticas entre os mitótipos das formigas por análise de máxima verossimilhança. Direita: Relações filogenéticas entre as cepas (STs) encontradas no presente trabalho. Os traços ligando os terminais das duas árvores indicam todas as combinações entre os mitótipos e as STs. Os valores de bootstrap estão indicados acima dos ramos em ambas as filogenias. inv e Sol = *S. invicta*, sae = *S. saevissima*.

5.7 Análises de correlação

Com a finalidade de testar as evidências de coevolução, análises de correlação entre a distância genética entre COI e MLST foram realizadas além da correlação entre a distribuição geográfica e distância genética de MLST para testar a correlação geográfica.

Com o intuito de analisar a relação evolutiva existente entre a *Wolbachia* e o hospedeiro, no caso as formigas do gênero *Solenopsis*, as matrizes de distância genética aos pares de COI das amostras de formigas dos 31 ninhos que tiveram suas cepas de *Wolbachia* definidas pela metodologia do MLST foram comparadas entre si através do Teste de Mantel.

As matrizes para os valores de distância genética aos pares de COI, entre os pares de MLST e a matriz de distância euclidiana entre as distâncias geográficas em UTM estão respectivamente indicados nas Tabelas 10, 11 e 12.

Tabela 10 - Matriz de distância entre os pares de mitótipos das amostras do presente trabalho.

Código	E1805	E1714	E1686	E1821	E1801	E1802	E1803	E1807	E1808	E1810	E1782	E1784	E1789	E1792	E1738	E1740	E1749	E1643	E1644	E1742	E1743	E1751	E1713	E1746	E1753	E16451	E16452	So1128	So1106	So1158
E1714	0.02392																													
E1686	0.06842	0.06694																												
E1821	0.09314	0.09826	0.08718																											
E1801	0.00000	0.02392	0.06842	0.09314																										
E1802	0.00000	0.02392	0.06842	0.09314	0.00000																									
E1803	0.00000	0.02392	0.06842	0.09314	0.00000	0.00000																								
E1807	0.00000	0.02392	0.06842	0.09314	0.00000	0.00000	0.00000																							
E1808	0.00000	0.02392	0.06842	0.09314	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000																						
E1810	0.00000	0.02392	0.06842	0.09314	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000																					
E1782	0.11772	0.11783	0.10021	0.11299	0.11772	0.11772	0.11772	0.11772	0.11772	0.11772	0.11772	0.11772	0.11772	0.11772	0.11772	0.11772	0.11772	0.11772	0.11772	0.11772	0.11772	0.11772	0.11772	0.11772	0.11772	0.11772	0.11772	0.11772	0.11772	
E1784	0.05640	0.06545	0.06707	0.10818	0.05640	0.05640	0.05640	0.05640	0.05640	0.05640	0.13183																			
E1789	0.05488	0.06545	0.06552	0.10818	0.05488	0.05488	0.05488	0.05488	0.05488	0.05488	0.13008	0.00138																		
E1792	0.03711	0.03706	0.07642	0.10974	0.03711	0.03711	0.03711	0.03711	0.03711	0.03711	0.12134	0.07510	0.07351																	
E1738	0.02398	0.01537	0.07005	0.10136	0.02398	0.02398	0.02398	0.02398	0.02398	0.02398	0.11783	0.06559	0.06403	0.03126																
E1740	0.02398	0.01537	0.07005	0.10136	0.02398	0.02398	0.02398	0.02398	0.02398	0.02398	0.11783	0.06559	0.06403	0.03126	0.00000															
E1749	0.05793	0.06236	0.06849	0.10818	0.05793	0.05793	0.05793	0.05793	0.05793	0.05793	0.12808	0.02830	0.02684	0.07351	0.06094	0.06094														
E1643	0.11772	0.11783	0.10021	0.11299	0.11772	0.11772	0.11772	0.11772	0.11772	0.11772	0.00000	0.13183	0.13008	0.12134	0.11783	0.11783	0.12808													
E1644	0.11772	0.11783	0.10021	0.11299	0.11772	0.11772	0.11772	0.11772	0.11772	0.11772	0.00000	0.13183	0.13008	0.12134	0.11783	0.11783	0.12808	0.00000												
E1742	0.02830	0.02248	0.07154	0.10127	0.02830	0.02755	0.02830	0.02830	0.02830	0.02830	0.11603	0.07020	0.06863	0.03563	0.01255	0.01255	0.06552	0.11603	0.11603											
E1743	0.02830	0.02248	0.07154	0.10127	0.02830	0.02830	0.02830	0.02830	0.02830	0.02830	0.11603	0.07020	0.06863	0.03563	0.01255	0.01255	0.06552	0.11603	0.11603	0.00000										
E1751	0.02975	0.02392	0.06998	0.10291	0.02975	0.02830	0.02975	0.02975	0.02975	0.02975	0.11435	0.06863	0.06707	0.03711	0.01396	0.01396	0.06707	0.11435	0.11435	0.00276	0.00276									
E1713	0.02392	0.00000	0.06694	0.09826	0.02392	0.02392	0.02392	0.02392	0.02392	0.02392	0.11783	0.06545	0.06545	0.03706	0.01537	0.01537	0.06236	0.11783	0.11783	0.02248	0.02248	0.02392								
E1746	0.01396	0.02395	0.06694	0.09483	0.01396	0.01396	0.01396	0.01396	0.01396	0.01396	0.11110	0.06094	0.05941	0.03567	0.02112	0.02112	0.05634	0.11110	0.11110	0.02543	0.02543	0.02688	0.02395							
E1753	0.01396	0.02395	0.06694	0.09483	0.01396	0.01396	0.01396	0.01396	0.01396	0.01396	0.11110	0.06094	0.05941	0.03864	0.02112	0.02112	0.05634	0.11110	0.11110	0.02543	0.02543	0.02688	0.02395	0.00276						
E16451	0.12099	0.11456	0.10341	0.11479	0.12099	0.12099	0.12099	0.12099	0.12099	0.12099	0.00833	0.13343	0.13343	0.12122	0.11772	0.11772	0.12795	0.00833	0.00833	0.11593	0.11593	0.11761	0.11456	0.11435	0.11435					
E16452	0.12099	0.11456	0.10341	0.11479	0.12099	0.12099	0.12099	0.12099	0.12099	0.12099	0.00833	0.13343	0.13343	0.12122	0.11772	0.11772	0.12795	0.00833	0.00833	0.11593	0.11593	0.11761	0.11456	0.11435	0.11435	0.00000				
So1128	0.06256	0.07326	0.07020	0.11153	0.06256	0.06256	0.06256	0.06256	0.06256	0.12662	0.02837	0.02691	0.07828	0.06871	0.06871	0.03415	0.12662	0.12662	0.07651	0.07651	0.07810	0.07326	0.06403	0.06403	0.12649	0.12649				
So1106	0.00833	0.02684	0.06849	0.09646	0.00833	0.00833	0.00833	0.00833	0.00833	0.00833	0.11952	0.05941	0.05787	0.03716	0.02401	0.02401	0.06094	0.11952	0.11952	0.02833	0.02833	0.02979	0.02684	0.01398	0.01398	0.12281	0.12281	0.06559		
So1158	0.05793	0.06236	0.07005	0.10485	0.05793	0.05793	0.05793	0.05793	0.05793	0.05793	0.12808	0.03122	0.02975	0.07351	0.06094	0.06094	0.00276	0.12808	0.12808	0.06552	0.06552	0.06707	0.06236	0.05634	0.05634	0.12795	0.12795	0.03711	0.06094	
So171	0.05793	0.06236	0.06849	0.10818	0.05793	0.05793	0.05793	0.05793	0.05793	0.05793	0.12808	0.02830	0.02684	0.07351	0.06094	0.06094	0.00000	0.12808	0.12808	0.06552	0.06552	0.06707	0.06236	0.05634	0.05634	0.12795	0.12795	0.03415	0.06094	0.00276

O modelo K80 (KIMURA, 1980) foi utilizado para o cálculo das distâncias aos pares.

Tabela 11 - Matriz de distância entre os pares de STs das amostras do presente trabalho.

Código	ST	29	314	315	316	29	29	29	29	317	29	315	318	322	319	29	29	318	315	315	320	320	321	323	29	29	324	325	327	328	326	
E1714	314	0.01509																														
E1686	315	0.01067	0.00921																													
E1821	316	0.00920	0.00677	0.01509																												
E1801	29	0.00000	0.01509	0.01067	0.00920																											
E1802	29	0.00000	0.01509	0.01067	0.00920	0.00000																										
E1803	29	0.00000	0.01509	0.01067	0.00920	0.00000	0.00000																									
E1807	29	0.00000	0.01509	0.01067	0.00920	0.00000	0.00000	0.00000																								
E1808	317	0.00579	0.00920	0.00482	0.01509	0.00579	0.00579	0.00579	0.00579																							
E1810	29	0.00000	0.01509	0.01067	0.00920	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00579																						
E1782	315	0.01067	0.00921	0.00000	0.01509	0.01067	0.01067	0.01067	0.01067	0.01067	0.00482	0.01067																				
E1784	318	0.00823	0.01067	0.00628	0.01656	0.00823	0.00823	0.00823	0.00823	0.00240	0.00823	0.00628	0.00628																			
E1789	322	0.00434	0.01756	0.01313	0.01263	0.00434	0.00434	0.00434	0.00434	0.00921	0.00434	0.01313	0.00677	0.00579																		
E1792	319	0.00337	0.01558	0.01116	0.00969	0.00337	0.00337	0.00337	0.00337	0.00920	0.00337	0.01116	0.01067	0.00579	0.00000	0.01067	0.00823	0.00434	0.00337	0.00000												
E1738	29	0.00000	0.01509	0.01067	0.00920	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00579	0.00000	0.01067	0.00823	0.00434	0.00337	0.00000	0.00823	0.00628	0.00000	0.00677	0.01067	0.00823	0.00823									
E1740	29	0.00000	0.01509	0.01067	0.00920	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00579	0.00000	0.01067	0.00823	0.00434	0.00337	0.00000	0.00823	0.00628	0.00000	0.00677	0.01067	0.00823	0.00823	0.00628	0.00628							
E1749	318	0.00823	0.01067	0.00628	0.01656	0.00823	0.00823	0.00823	0.00823	0.00240	0.00823	0.00628	0.00628	0.00000	0.00677	0.01067	0.00823	0.00628	0.00000	0.00677	0.01067	0.00823	0.00823	0.00628	0.00628	0.00628						
E1643	315	0.01067	0.00921	0.00000	0.01509	0.01067	0.01067	0.01067	0.01067	0.00482	0.01067	0.00000	0.00628	0.01313	0.01116	0.01067	0.01067	0.00628	0.00000													
E1644	315	0.01067	0.00921	0.00000	0.01509	0.01067	0.01067	0.01067	0.01067	0.00482	0.01067	0.00000	0.00628	0.01313	0.01116	0.01067	0.01067	0.00628	0.00000	0.00000												
E1742	320	0.00871	0.00920	0.00483	0.01509	0.00871	0.00871	0.00871	0.00871	0.00289	0.00871	0.00483	0.00434	0.01116	0.00628	0.00871	0.00871	0.00434	0.00483	0.00483	0.00000											
E1743	320	0.00871	0.00920	0.00483	0.01509	0.00871	0.00871	0.00871	0.00871	0.00289	0.00871	0.00483	0.00434	0.01116	0.00628	0.00871	0.00871	0.00434	0.00483	0.00483	0.00000											
E1751	321	0.00386	0.01608	0.01165	0.01018	0.00386	0.00386	0.00386	0.00386	0.00969	0.00386	0.01165	0.01116	0.00628	0.00048	0.00386	0.00386	0.01116	0.01165	0.01165	0.00677	0.00677										
E1713	323	0.00871	0.00628	0.01460	0.00048	0.00871	0.00871	0.00871	0.00871	0.01459	0.00871	0.01460	0.01607	0.01213	0.00920	0.00871	0.00871	0.01607	0.01460	0.01460	0.01460	0.00969										
E1746	29	0.00000	0.01509	0.01067	0.00920	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00579	0.00000	0.01067	0.00823	0.00434	0.00337	0.00000	0.00000	0.00823	0.01067	0.01067	0.00871	0.00871	0.00386	0.00871								
E1753	29	0.00000	0.01509	0.01067	0.00920	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00579	0.00000	0.01067	0.00823	0.00434	0.00337	0.00000	0.00000	0.00823	0.01067	0.01067	0.00871	0.00871	0.00386	0.00871	0.00000							
E16451	324	0.02758	0.03826	0.02858	0.03214	0.02758	0.02758	0.02758	0.02758	0.03365	0.02758	0.02858	0.03517	0.03111	0.02809	0.02758	0.02758	0.03517	0.02858	0.02858	0.03366	0.03366	0.02860	0.03163	0.02758	0.02758						
E16452	325	0.05754	0.06877	0.05966	0.06234	0.05754	0.05754	0.05754	0.05754	0.06392	0.05754	0.05966	0.06551	0.06124	0.05809	0.05754	0.05754	0.06551	0.05966	0.05966	0.06394	0.06394	0.05863	0.06181	0.05754	0.05754	0.02957					
Sol128	327	0.01461	0.02657	0.02207	0.02155	0.01461	0.01461	0.01461	0.01461	0.01957	0.01461	0.02207	0.01908	0.01216	0.01462	0.01461	0.01461	0.01908	0.02207	0.02207	0.02208	0.02008	0.02008	0.01511	0.02105	0.01461	0.01461	0.04036	0.07102			
Sol106	328	0.02055	0.02057	0.01512	0.02657	0.02055	0.02055	0.02055	0.02055	0.01461	0.02055	0.01512	0.01412	0.02107	0.02156	0.02055	0.02055	0.01412	0.01512	0.01512	0.01511	0.01511	0.02206	0.02607	0.02055	0.02055	0.04450	0.07539	0.00872			
Sol158	326	0.01659	0.02760	0.02208	0.02257	0.01659	0.01659	0.01659	0.01659	0.02156	0.01659	0.02208	0.02107	0.01412	0.01659	0.01659	0.01659	0.02107	0.02208	0.02208	0.02207	0.02207	0.02207	0.01709	0.02206	0.01659	0.01659	0.04037	0.07104	0.00192	0.00677	
Sol71	326	0.01659	0.02760	0.02208	0.02257	0.01659	0.01659	0.01659	0.01659	0.02156	0.01659	0.02208	0.02107	0.01412	0.01659	0.01659	0.01659	0.02107	0.02208	0.02208	0.02207	0.02207	0.02207	0.01709	0.02206	0.01659	0.01659	0.04037	0.07104	0.00192	0.00677	0.00000

O modelo K80 (KIMURA, 1980) foi utilizado para o cálculo das distâncias aos pares.

Tabela 12 - Matriz de distância geográfica em UTM das amostras do presente trabalho.

Código	E1805	E1714	E1686	E1821	E1801	E1802	E1803	E1807	E1808	E1810	E1782	E1784	E1789	E1792	E1738	E1740	E1749	E1643	E1644	E1742	E1743	E1751	E1713	E1746	E1753	E16451	E16452	Soil28	Soil06	Soil58	
E1714	1,11E+12																														
E1686	4,73E+11	6,52E+11																													
E1821	2,72E+12	1,62E+12	2,26E+12																												
E1801	0	1,11E+12	4,73E+11	2,72E+12																											
E1802	0	1,11E+12	4,73E+11	2,72E+12	0																										
E1803	0	1,11E+12	4,73E+11	2,72E+12	0	0																									
E1807	0	1,11E+12	4,73E+11	2,72E+12	0	0	0																								
E1808	0	1,11E+12	4,73E+11	2,72E+12	0	0	0	0																							
E1810	0	1,11E+12	4,73E+11	2,72E+12	0	0	0	0	0																						
E1782	3,90E+11	1,04E+12	4,22E+11	2,60E+12	3,90E+11	3,90E+11	3,90E+11	3,90E+11	3,90E+11	3,90E+11																					
E1784	2,23E+11	1,15E+12	5,01E+11	2,75E+12	2,23E+11	2,23E+11	2,23E+11	2,23E+11	2,23E+11	2,23E+11	2,14E+11																				
E1789	2,29E+1	1,30E+12	6,45E+11	2,90E+12	2,29E+11	2,29E+11	2,29E+11	2,29E+11	2,29E+11	2,29E+11	3,91E+11	1,79E+11																			
E1792	2,09E+1	1,09E+12	4,39E+11	2,69E+12	2,09E+11	2,09E+11	2,09E+11	2,09E+11	2,09E+11	2,09E+11	1,88E+11	6,21E+10	2,29E+11																		
E1738	5,82E+1	6,39E+11	1,69E+11	2,20E+12	5,82E+11	5,82E+11	5,82E+11	5,82E+11	5,82E+11	5,82E+11	4,01E+11	5,46E+11	7,14E+11	4,88E+11																	
E1740	5,82E+1	6,39E+11	1,69E+11	2,20E+12	5,82E+11	5,82E+11	5,82E+11	5,82E+11	5,82E+11	5,82E+11	4,01E+11	5,46E+11	7,14E+11	4,88E+11	0																
E1749	4,45E+1	6,74E+11	3,15E+10	2,28E+12	4,45E+11	4,45E+11	4,45E+11	4,45E+11	4,45E+11	4,45E+11	4,17E+11	4,83E+11	6,23E+11	4,21E+11	1,97E+11	1,97E+11															
E1643	1,64E+11	1,04E+12	3,83E+11	2,64E+12	1,64E+11	1,64E+11	1,64E+11	1,64E+11	1,64E+11	1,64E+11	2,30E+11	1,32E+11	2,63E+11	7,77E+10	4,55E+11	4,55E+11	3,62E+11														
E1644	1,64E+11	1,04E+12	3,83E+11	2,64E+12	1,64E+11	1,64E+11	1,64E+11	1,64E+11	1,64E+11	1,64E+11	2,30E+11	1,32E+11	2,63E+11	7,77E+10	4,55E+11	4,55E+11	3,62E+11	0													
E1742	4,17E+11	7,01E+11	1,79E+11	2,32E+12	4,17E+11	4,17E+11	4,17E+11	4,17E+11	4,17E+11	4,17E+11	5,17E+11	5,24E+11	6,29E+11	4,66E+11	3,48E+11	3,48E+11	1,54E+11	3,93E+11	3,93E+11												
E1743	4,45E+11	6,74E+11	3,15E+10	2,28E+12	4,45E+11	4,45E+11	4,45E+11	4,45E+11	4,45E+11	4,45E+11	4,17E+11	4,83E+11	6,23E+11	4,21E+11	1,97E+11	1,97E+11	0	3,62E+11	3,62E+11	1,54E+11											
E1751	4,45E+11	6,74E+11	3,15E+10	2,28E+12	4,45E+11	4,45E+11	4,45E+11	4,45E+11	4,45E+11	4,45E+11	4,17E+11	4,83E+11	6,23E+11	4,21E+11	1,97E+11	1,97E+11	0	3,62E+11	3,62E+11	1,54E+11	0										
E1713	1,11E+12	2,87E+08	6,52E+11	1,62E+12	1,11E+12	1,11E+12	1,11E+12	1,11E+12	1,11E+12	1,11E+12	1,04E+12	1,15E+12	1,30E+12	1,09E+12	6,39E+11	6,39E+11	6,74E+11	1,04E+12	1,04E+12	7,00E+11	6,74E+11	6,74E+11									
E1746	4,45E+11	6,74E+11	3,15E+10	2,28E+12	4,45E+11	4,45E+11	4,45E+11	4,45E+11	4,45E+11	4,45E+11	4,17E+11	4,83E+11	6,23E+11	4,21E+11	1,97E+11	1,97E+11	0	3,62E+11	3,62E+11	1,54E+11	0	0		6,74E+11							
E1753	4,45E+11	6,74E+11	3,15E+10	2,28E+12	4,45E+11	4,45E+11	4,45E+11	4,45E+11	4,45E+11	4,45E+11	4,17E+11	4,83E+11	6,23E+11	4,21E+11	1,97E+11	1,97E+11	0	3,62E+11	3,62E+11	1,54E+11	0	0		6,74E+11	0						
E16451	1,64E+11	1,04E+12	3,83E+11	2,64E+12	1,64E+11	1,64E+11	1,64E+11	1,64E+11	1,64E+11	1,64E+11	2,30E+11	1,32E+11	2,63E+11	7,77E+10	4,55E+11	4,55E+11	3,62E+11	0	0	3,93E+11	3,62E+11	3,62E+11	1,04E+12	3,62E+11	3,62E+11						
E16452	1,64E+11	1,04E+12	3,83E+11	2,64E+12	1,64E+11	1,64E+11	1,64E+11	1,64E+11	1,64E+11	1,64E+11	2,30E+11	1,32E+11	2,63E+11	7,77E+10	4,55E+11	4,55E+11	3,62E+11	0	0	3,93E+11	3,62E+11	3,62E+11	1,04E+12	3,62E+11	3,62E+11	0					
Soil28	4,97E+11	6,30E+11	2,05E+11	2,24E+12	4,97E+11	4,97E+11	4,97E+11	4,97E+11	4,97E+11	4,97E+11	5,86E+11	6,05E+11	7,11E+11	5,46E+11	3,64E+11	3,64E+11	1,89E+11	4,74E+11	4,74E+11	8,21E+10	1,89E+11	1,89E+11	6,30E+11	1,89E+11	1,89E+11	4,74E+11	4,74E+11				
Soil06	5,53E+11	6,14E+11	2,90E+11	2,22E+12	5,53E+11	5,53E+11	5,53E+11	5,53E+11	5,53E+11	5,53E+11	6,73E+11	6,80E+11	7,74E+11	6,23E+11	4,43E+11	4,43E+11	2,77E+11	5,49E+11	5,49E+11	1,58E+11	2,77E+11	2,77E+11	6,14E+11	2,77E+11	2,77E+11	5,49E+11	5,49E+11	8,81E+10			
Soil58	4,24E+11	6,83E+11	9,97E+10	2,30E+12	4,24E+11	4,24E+11	4,24E+11	4,24E+11	4,24E+11	4,24E+11	4,61E+11	4,97E+11	6,20E+11	4,36E+11	2,69E+11	2,69E+11	7,32E+10	3,69E+11	3,69E+11	8,04E+10	7,32E+10	7,32E+10	6,83E+11	7,32E+10	7,32E+10	3,69E+11	3,69E+11	1,27E+11	2,15E+11		
Soil71	5,53E+11	6,14E+11	2,90E+11	2,22E+12	5,53E+11	5,53E+11	5,53E+11	5,53E+11	5,53E+11	5,53E+11	6,73E+11	6,80E+11	7,74E+11	6,23E+11	4,43E+11	4,43E+11	2,77E+11	5,49E+11	5,49E+11	1,58E+11	2,77E+11	2,77E+11	6,14E+11	2,77E+11	2,77E+11	5,49E+11	5,49E+11	8,81E+10	4,54E+07	2,15E+11	

As distâncias aos pares foram calculadas através de distância euclidiana.

O Teste de Mantel foi realizado entre as matrizes de distância genética aos pares de COI e o MLST da *Wolbachia* relacionada, indicando correlação significativa ($r^2=0,4476$, $p=0,00005$), o que sugere que cepas relacionadas existem em hospedeiros relacionados, um indicativo de coevolução entre a *Wolbachia* e formigas do gênero *Solenopsis*, sustentando as evidências reveladas na Figura 8 (salienta-se que não são cofilogenias, porém possuem evidências de coevolução). Para confirmação desta correlação, uma segunda análise foi realizada, porém retirando as repetições observadas em alguns ninhos que apresentaram STs similares e as mesmas sequencias de COI, o que poderia revelar uma falsa correlação. Nesta segunda análise o valor encontrado foi $r^2= 0,5171$, $p<0,001$, que portanto, se manteve próximo ao encontrado quando analisados os dados de todos os ninhos, confirmando o indicativo de correlação entre a ST e a COI.

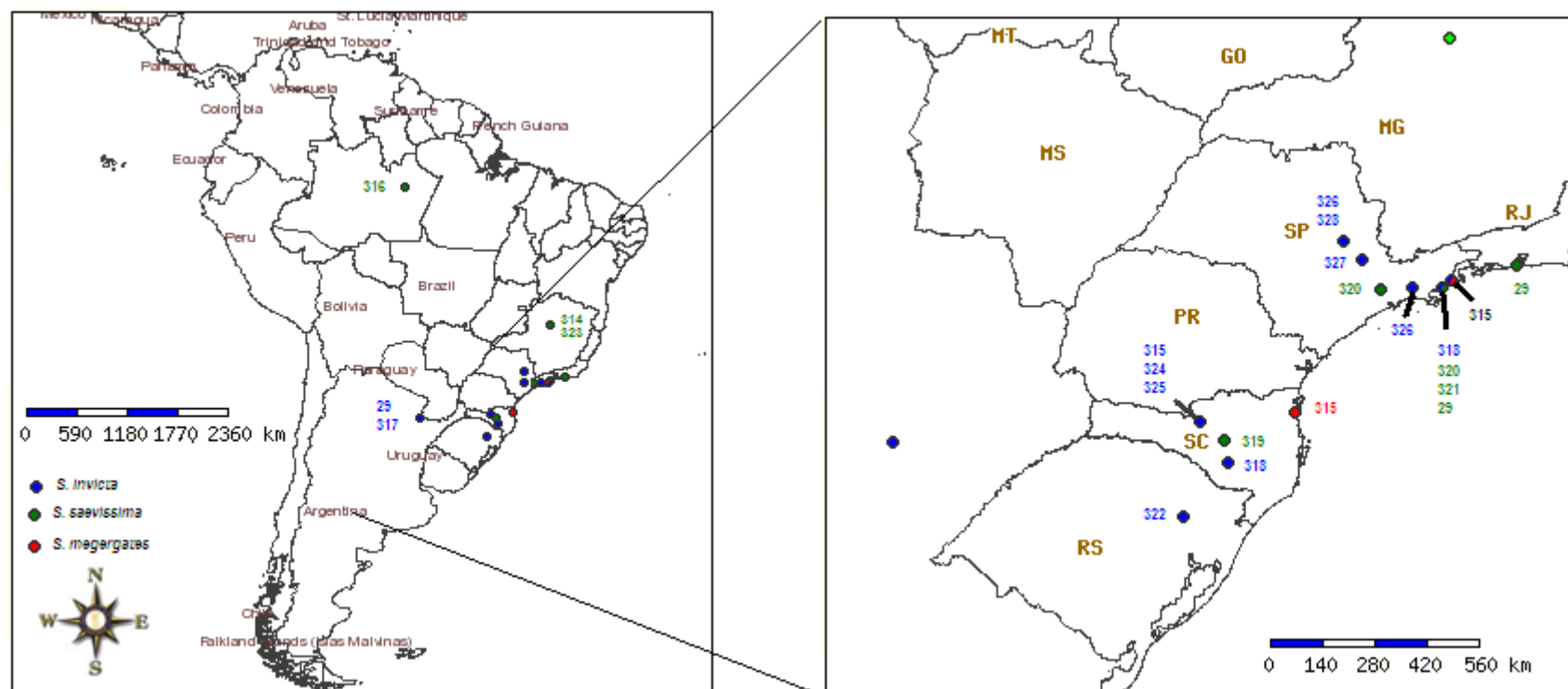
Já o Teste de Mantel realizado entre as matrizes de distância genética aos pares de MLST e a de distância euclidiana em UTM do hospedeiro não indicou correlação significativa ($r^2=0,02175$, $p=0,27281$), indicativo de que não existe correlação entre a distância geográfica do hospedeiro e a cepa de *Wolbachia* relacionada, um indício de que as cepas não estão adaptadas a um condição ambiental específica.

Portanto, há correlação entre a cepa e a COI do hospedeiro, porém não há correlação entre a cepa e a localização geográfica do hospedeiro.

5.8 Mapa de distribuição das cepas

A Figura 9 ilustra a relação da ST com a localização geográfica do ninho e também a espécie relacionada. O mapa corrobora o valor encontrado no Teste de Mantel e também nas análises filogenéticas (Figuras 5, 6 e 7), concordando que não existe relação entre a cepa e sua localização geográfica.

Figura 9 - Mapa ilustrativo da localização geográfica de cada cepa e a espécie associada.



Fonte: speciesMapper (2014).

5.9 MLST X *wsp*

A identificação das cepas de *Wolbachia* realizadas com o gene *wsp*, em Martins et al., (2012), não corrobora aquela encontrada para os genes que compõem o MLST. A Tabela 6 ilustra estes dados, onde a diversidade de *wsp* encontrados nas amostras foi muito menor que a encontrada com a metodologia do MLST, sendo quatro alelos do *wsp* (considerando-se as três primeiras HVR – Regiões Hipervariáveis - que compõem o *wsp*) contra 16 do MLST. Este resultado evidencia a ineficácia do *wsp* na definição das cepas de *Wolbachia* associadas ao hospedeiro.

Discussão

6 DISCUSSÃO

Apesar da baixa capacidade de se realizar experimentos manipulativos de *Wolbachia*, pode-se compreender muito sobre a interação com formigas através de estudos de distribuição e evolução desses simbiossiontes, uma vez que a *Wolbachia* não é encontrada em todas as espécies e a sua prevalência pode variar através dos taxa (RUSSEL, 2012). O presente trabalho contribui de maneira singular no que se refere aos conhecimentos nessa linha de pesquisa, relatando os processos evolutivos e a interação de *Wolbachia* e *Solenopsis* sugerindo que além de várias respostas, tem-se novas perguntas para explorar futuramente, como também enfatizado por Moran et al. (2008).

Martins et al. (2012) detectaram infecção simples pela *Wolbachia* e apenas quatro cepas com a utilização do gene *wsp* sendo várias delas alocadas no supergrupo B nas mesmas amostras agora analisadas. O presente trabalho identificou múltiplas infecções em algumas amostras, definiu a existência de 16 cepas, sendo 15 inéditas, além de 11 novos alelos, e alocou todas as cepas no supergrupo A, salientando a ineficácia do *wsp* tanto para identificar a diversidade das cepas quanto para definição de supergrupos.

A baixa capacidade do gene *wsp* em separar as cepas de *Wolbachia* foi expressiva. Para as amostras onde foi detectado o haplótipo (ou perfil) 28 do *wsp* foram detectados seis STs diferentes e para as amostras com o haplótipo 59 do *wsp*, três STs (Tabela 6) corroborando que cepas diferentes podem possuir uma mesma definição para o gene *wsp*, porém apresentarem uma combinação diferente de alelos para o MLST. Portanto, não se deve excluir a possibilidade de existir dentro de um mesmo hospedeiro, cepas de *Wolbachia* que possuam em seus genomas o mesmo gene *wsp*, porém com uma combinação diferente para os alelos que compõem o *multilocus*, fato que ressalta a importância do uso de abordagens multigênicas, para estudos evolutivos e de diversidade de *Wolbachia*. Além disso, estes resultados evidenciam que os diferentes genes da *Wolbachia* (*wsp* x *multilocus*) passaram por diferentes trajetórias evolutivas (ZHANG, K. J. et al., 2013).

Baldo et al. (2006) também detectaram situações divergentes entre MLST e *wsp*, com casos onde cepas que possuem MLST relacionados apresentavam *wsp* muito divergentes e também cepas que possuíam *wsp* similares e que diferiram substancialmente na definição do MLST, sustentando a conclusão que o *wsp* sozinho não é indicado para prever a diversidade de cepas ou divergência. Ainda, a ineficiência do gene *wsp* para abordagens evolutivas está relacionada com a frequente recombinação que pode ocorrer nesse gene (BALDO et al., 2005;

WERREN; BARTOS, 2001) que pode levar a troca de material genético entre cepas e confundir tanto a definição quanto a história evolutiva, se a análise for realizada apenas com esse gene.

Algumas amostras analisadas foram determinadas como multi-infectadas pela detecção de múltiplos picos no eletroferograma, impossibilitando a definição das cepas presentes pela metodologia do *multilocus* (amostras E1713, E1725, E1726, E1727, Sol48, E1739 e E1646) e em uma amostra pela detecção de duas cepas próximas em um mesmo ninho (E1645, com as ST324 e ST325 e indicativo de recombinação entre as cepas). Casos de múltiplas infecções já foram detectados em outros trabalhos com formigas como em *Formica exsecta* (REUTER; KELLER, 2003), em *Acromyrmex* (VAN BORM et al., 2003), em *Solenopsis invicta* (AHRENS e SHOEMAKER, 2005; MARTINS et al., 2012; SOUZA et al., 2009), em *Solenopsis daquerrei* (DEDEINE et al., 2005), no grupo de espécies *Formica rufa* (VILJAKAINEN et al., 2008), sendo portanto, relativamente frequentes. Para explicar tal resultado, pode-se levantar algumas hipóteses: i. a *Wolbachia* detectada seria oriunda de um endoparasita ou parasitóide da formiga (ZHANG K. J. et al., 2013), ii. a *Wolbachia* detectada seria proveniente de uma recente alimentação do animal que ainda estava sendo digerida ou estocada (ENIGL et al., 2005; WU; HOY, 2012), iii. infecção “natural” por mais de uma cepa, ou seja, advinda de uma transmissão horizontal antiga, já estabelecida na população. iv. transferência horizontal de fragmentos do genoma da *Wolbachia* para o genoma do hospedeiro (AIKAWA et al., 2009; DOUDOUMIS et al., 2012; FEN et al., 2006; HOTOPP et al., 2007; IOANNIDIS et al., 2013; KLASSON et al., 2009; KONDO et al., 2002; NIKOH et al., 2008; NIKOH; NAKABACHI, 2009), resultando em uma detecção de fragmentos que de fato estão no genoma do hospedeiro.

A primeira hipótese é plausível, uma vez que formigas do gênero *Solenopsis* são frequentemente parasitadas por forídeos (PATROCK et al., 2009), porém estudos que façam uma relação da *Wolbachia* presente em ambos nunca foram realizados no Brasil. Deve-se considerar que o método de forrageamento das colônias de *Solenopsis* das espécies analisadas e também de estrutura dos ninhos podem facilitar a oportunidade de ataque por parasitóides.

A segunda hipótese também deve ser considerada, uma vez que formigas do gênero *Solenopsis* são generalistas (TSCHINKEL, 2006) e a metodologia utilizada não considera a provável contaminação pelo alimento em estoque ou sendo digerido pela formiga. Segundo Enigl et al. (2005) manter um predador em inanição antes de aplicar a metodologia de extração de DNA é crucial para determinar a presença de *Wolbachia* e em casos onde a presa é reconhecida como infectada deve-se considerar o tempo necessário de inanição que previna

que a *Wolbachia* detectada seja proveniente do intestino do predador. Por exemplo, para evitar falsos positivos em amostras de aranhas da espécie *H. graminicola*, Yun et al. (2011) mantiveram os animais em inanição por três meses antes de realizar os experimentos. É importante ressaltar, que nenhum trabalho que relaciona a presença de *Wolbachia* em formigas fez uso de metodologias que evitassem estas contaminações, ou seja, os trabalhos não especificam se as amostras foram coletadas e mantidas em inanição ou mesmo se foram utilizadas metodologias que evitassem contaminações pelo alimento em estoque ou sendo digerido.

Segundo Zhang K. J. et al. (2013) para evitar tais detecções errôneas, podem-se utilizar as pernas, asas ou outras partes do hospedeiro que não contenham o parasita, ou a própria cria do hospedeiro.

As duas primeiras hipóteses poderiam ser testadas ou terem mais suporte se amostragens maiores tivessem sido realizadas, não apenas em outras famílias de insetos como também em amostragens no Brasil, que poderiam identificar prováveis cepas presentes em parasitóides. Outra forma seria analisar as potenciais presas das espécies de formigas aqui analisadas, através da homologia entre essas cepas ou até mesmo o compartilhamento de alelos entre elas, e também pela detecção de eventos de recombinação entre as cepas.

A terceira hipótese é também plausível, pois interações de hospedeiro com parasitóides são sugeridas como sendo uma rota importante de transferência horizontal (COOK; BUTCHER, 1999; HEATH et al., 1999; HUIGENS et al., 2004; NODA et al., 2001; SCHILTHUIZEN; STOUTHAMER, 1997; VAN MEER et al., 1999; VAVRE et al., 1999; WERREN et al., 1995). Além disso, as amostras multi-infectadas possuem alelos que não se apresentam múltiplos no hospedeiro (Tabela 6), ou seja, não foram todos os alelos que apresentaram picos duplos indicativos de múltipla infecção. Da mesma forma, os alelos detectados nas amostras multi-infectadas também foram encontrados nas outras amostras, sugerindo que existe o compartilhamento de alelos entre as cepas dessas múltiplas infecções, podendo ser um indicativo de serem cepas advindas de um parasitóide, pois segundo Vavre et al. (1999) se a transferência horizontal ocorreu, as cepas presentes nas duas espécies devem ser muito similares. Além disso, segundo Moran et al. (2008) a transferência horizontal entre hospedeiros pode produzir coinfeções e oportunidades para recombinação, como detectado em *Solenopsis* no presente trabalho e transferência de genes, também encontradas possíveis evidências no presente trabalho, discutidos adiante. Vale ressaltar que a metodologia utilizada não permite validar a existência de mais de uma cepa em um único indivíduo, pois o método de extração utilizado (*pool*) interfere nesta confirmação.

A quarta hipótese envolve a possível transferência de fragmentos do genoma da *Wolbachia* para o hospedeiro, fato já extensivamente descrito em diversas publicações (AIKAWA et al., 2009; DOUDOUMIS et al., 2012; FEN et al., 2006; HOTOPP et al., 2007; IOANNIDIS et al., 2013; KLASSON et al., 2009; KONDO et al., 2002; NIKOH et al., 2008; NIKOH; NAKABACHI, 2009). O cenário provável seria que o resultado de evidência de múltiplas infecções estaria na verdade representando a transferência de fragmentos do genoma da bactéria para o do hospedeiro e a causa da mistura nos vários genes seria a detecção desses fragmentos que foram transferidos para o genoma do hospedeiro durante a história evolutiva entre ambos e o que se detectou agora seriam os fragmentos já alterados pelo longo processo evolutivo que teriam passado durante essa associação com o genoma do hospedeiro. O resultado da amostra E1645, onde foi possível sequenciar as duas cepas que ocorrem no ninho, ST324 e ST325, pode ser uma reflexão desta transferência, e na verdade se teria apenas detectado os fragmentos do gene *fbpA* (foi o único que variou entre essas STs) que ocorrem no genoma da bactéria e no genoma do hospedeiro.

Recentemente, Doudoumis et al. (2012) detectaram em uma espécie de moscas tsé-tsé dois fragmentos com tamanhos diferentes para cada um de dois genes específicos da *Wolbachia*, o *16S rRNA* e o *fbpA*. Após sequenciamento de ambos os fragmentos de cada gene, para o *16S rRNA* com um deles com o tamanho esperado para o fragmento, com 438 pb e o outro com cerca de 300 pb e para o *fbpA* com o específico com 509 pb e o outro, inespecífico, com 453 pb, os autores confirmaram que eles tinham se originado de *Wolbachia*, porém com o menor fragmento do *16S rRNA*, possuindo uma deleção de 142 pb e o menor fragmento do *fbpA* com duas deleções, de 47 pb e 9 pb. Ainda, detectaram os menores fragmentos em outras amostras analisadas, incluindo aquelas tratadas com tetraciclina para eliminação da infecção por *Wolbachia*. Diante desses resultados, atribuíram a presença dos fragmentos menores como uma transferência de um segmento do gene *16S rRNA* e *fbpA* do citoplasma da *Wolbachia* para o genoma da mosca tsé-tsé, com a deleção sendo um indicativo do gene ter se modificado para um pseudogene.

Procurando por novos suportes para a quarta hipótese, retornou-se para os géis das reações de amplificação dos genes que indicaram mistura e que não foram sequenciados com sucesso. Coincidentemente, foram encontradas bandas com tamanhos diferentes, como visto em Doudoumis et al. (2012), porém, aquela com o tamanho esperado e a segunda com um tamanho maior e com baixo rendimento (ilustração no Apêndice 3). Várias tentativas foram feitas para sequenciar os dois fragmentos, porém todas sem sucesso. Como não era objetivo central do trabalho e também pelo fato de não ter os ninhos que foram analisados mantidos

em laboratório para aplicar a metodologia que se utiliza da eliminação da *Wolbachia* e procura do fragmento no genoma no hospedeiro livre de infecção ou técnicas de hibridização *in situ* nos cromossomos do hospedeiro, não se prosseguiu com as tentativas de sequenciar tais fragmentos.

Explorar as prováveis transferências laterais de genes (TLG) da *Wolbachia* para o genoma do hospedeiro, denominada de *nuwts*, pode trazer novas perspectivas para o conhecimento da genômica e evolução dos genomas dos hospedeiros eucariotos, uma vez que já foram detectados genes funcionais no hospedeiro que foram advindos da TLG (KLASSON et al., 2009; NIKOH; NAKABACHI, 2009).

Nenhuma das quatro hipóteses deve ser excluída sem expandir a experimentação, pois em trabalhos futuros com hospedeiros generalistas podem ser utilizados tratamentos para eliminar a possibilidade de falsa amplificação de presas. A presença de parasitoides também deve ser considerada, pois ambos podem levar a conclusões errôneas de associação de *Wolbachia* com hospedeiros, além de detecções de múltiplas infecções que na verdade não são provenientes de células do hospedeiro estudado. Da mesma maneira, devem-se evitar metodologias de extração que possam interferir na definição de ocorrências de múltipla infecção em um único indivíduo. Acrescenta-se que como nenhum desses métodos de eliminação de contaminação por oviposição de parasitoides e pelo alimento sendo digerido foi realizado, também não se pode excluir a possibilidade de que várias das cepas detectadas, mesmo nas infecções simples, serem oriundas dessas contaminações. Além disso, durante a aplicação da metodologia do *multilocus* em pesquisas posteriores, atenção deve ser dada em casos onde bandas extras ocorram em reações de amplificação e se possível considerar o teste para detecção de transferência de genes entre os genomas da *Wolbachia* e o hospedeiro.

Destaca-se que resolver múltiplas infecções em um único indivíduo é uma tarefa quase impossível, uma vez que quando se detecta mais de um alelo de um determinado gene dentro de um mesmo hospedeiro, a definição da cepa torna-se muito complicada, a menos que se tenha acesso a uma cultura separada de cada cepa presente. Este foi o caso de Raychoudhury et al. (2008) que teve acesso a culturas celulares fornecidas por um grupo que isolou cepas presentes em *Nasonia*.

A confirmação da tendência de cepas de *Wolbachia* de formigas se agruparem entre aquelas de formigas do Novo Mundo e não do Novo Mundo (Figuras 4 e 5) corrobora padrões anteriormente encontrados, como em Tsutsui et al. (2003), que baseados no gene *wsp* encontraram cepas de *Wolbachia* muito próximas que infectavam formigas do Novo Mundo. Russel et al. (2009) também corroboram esta tendência, e expõem que enquanto outras

espécies infectadas por *Wolbachia* tiveram uma distribuição cosmopolita das cepas, aquelas encontradas em formigas estão confinadas em agrupamentos do Novo Mundo, Velho Mundo e regiões da Oceania, com aquelas do Novo Mundo apresentando maior associação que as outras regiões, o que sugere uma alta especificidade entre a *Wolbachia* de formigas do Novo Mundo.

Além da especificidade em uma escala geográfica maior, os dados indicam uma provável especificidade de *Wolbachia* presente em formigas do gênero *Solenopsis* ou em cepas presentes em formigas da região Sul-americana, uma vez que não existe o compartilhamento de cepas que ocorrem em *Wolbachia* infectando formigas de outras regiões geográficas, porém existe o compartilhamento com aquelas encontradas na América do Sul (ST29). Já o compartilhamento de alelos existe entre formigas coletadas em outras localidades com aquelas coletadas no Brasil (análise de eBURST), e entre *Solenopsis* e *Camponotus* de amostragem brasileira (Figura 7), que deve ser considerado um indicativo de uma relação genética, porém, relativamente distante ou que pode indicar uma separação antiga, pois não existe o compartilhamento de STs. Com o aumento de amostragens ao redor do mundo, especialmente no Brasil, será possível confirmar se tais tendências são mantidas como os trabalhos em andamento por Ramalho, M. O. em *Camponotus* e por Silva, L. M. R. em *Wasmannia*.

A comparação dos dados com os demais trabalhos realizados em insetos com amostragem no Brasil também corroboram a especificidade das cepas observadas em *Solenopsis* (Figura 7), uma vez que das cepas encontradas em *Diaphorina citri* por Guidolin (2011) e Guidolin; Cònsoli (2013) e *Anastrepha fraterculus* por Prezotto (2012) não existe o compartilhamento de STs e nem mesmo alelos com as cepas detectadas em *Solenopsis*. Pode-se esperar que esta ausência de relação estivesse relacionada com a história evolutiva das cepas equivalente a mais um exemplo de associação a hospedeiros específicos, assim como a relação ecológica do hospedeiro e também fisiológica. Porém, não se exclui o fato de que foram considerados apenas três trabalhos e que eles podem ser uma subestimativa, portanto ser considerada uma subamostragem e limitando a visão com um cenário pouco explorado.

A ecologia dos três hospedeiros pode ser uma das causas da ausência de relação entre as cepas, uma vez que os três grupos não compartilham com frequência os mesmos habitats nem mesmo as mesmas fontes de alimento. O compartilhamento das mesmas fontes de alimento já foi demonstrado como uma das causas de transmissão horizontal em outros artrópodes (KITAYAPONG et al., 2003; SINTUPACHEE et al., 2006) e recentemente, Stahlhut et al. (2012) sugeriram que em dípteras associados com cogumelos a transmissão

horizontal da *Wolbachia* pode ser influenciada pela ecologia do hospedeiro, levando portanto, a associação de cepas da bactéria à guildas específicas de insetos.

A especificidade pode estar relacionada com a fisiologia do hospedeiro, infectando, portanto, hospedeiros relacionados (RUSSEL et al.; 2009). Acrescenta-se que outros experimentos revelaram que a *Wolbachia* transferida entre espécies distantes tem dificuldades em se manter nesses novos hospedeiros (MCMENIMAN et al., 2008; POINSOT; MERCOT, 2001; RIEGLER et al., 2004; RIGAUD et al., 2001; VAN MEER; STOUTHAMER, 1999). Este fato pode ter relação com a fisiologia do hospedeiro, sugerindo uma adaptação ao ambiente intracelular do hospedeiro.

Frost et al. (2010) analisaram amostras de espécies de formigas cultivadoras de fungos, com algumas delas provenientes do Brasil, porém as sequências obtidas não foram depositadas no *Wolbachia* MLST Database, provavelmente por não apresentarem o tamanho necessário de cada um dos fragmentos que compõem o *multilocus*, que é uma das premissas para se obter uma identificação e depósito no banco de dados de *Wolbachia*. Como um dos objetivos era comparar as sequências de cepas de *Wolbachia* presentes em formigas *Solenopsis* fazendo uso da metodologia do *multilocus*, optou-se por não se comparar os resultados aqui encontrados com os de Frost et al. (2010).

A falta de correlação geográfica do hospedeiro e o tipo de cepa encontrada (Teste de Mantel) é um indicativo de que cepas relacionadas não são encontradas em localizações geográficas relacionadas. Ausências de correlação deste tipo já foram encontradas em outros grupos de insetos, como em aranhas *Hylyphantes graminicola* (YUN et al., 2011), em aranhas do gênero *Agelenopsis* e da espécie *A. aperta* (BALDO et al., 2008) e também em formigas da Tailândia (RUSSEL et al., 2009). A mobilidade aumentada do hospedeiro através do transporte humano, que estaria levando junto com as novas colônias de formigas, cepas relacionadas com determinadas colônias de determinadas localizações geográficas, “misturando” as cepas em localizações geográficas não originais pode ser a causa da ausência de correlação entre a *Wolbachia* e a localização geográfica das populações analisadas. Suportando essa hipótese, existem dados que sugerem que as populações de *Solenopsis* estariam sendo movidas pela atividade humana no Brasil em uma frequência muito maior do que anteriormente sugestionada (MARTINS et al., 2014).

Apesar da ausência de correlação geográfica, em ninhos de ocorrência simpátrica foi verificada uma tendência das cepas semelhantes ou de cepas relativamente próximas ocorrerem (Tabela 6). A maioria dos ninhos de Corrientes (Argentina) possui a ocorrência da mesma cepa (ST29), ocorrendo apenas um ninho com uma cepa diferente (ST317), com a

variação apenas no gene *ftsZ* se comparada com a ST29 e uma distância genética entre estas cepas de 0,00579. O mesmo fato ocorreu com amostras do Rio de Janeiro, RJ que também compartilham as cepas (ST29). Da mesma maneira, as amostras de Buritizeiro, MG possuem cepas próximas, as ST323 e ST314, com variação nos genes *coxA* e *ftsZ* e distância genética de 0,00628. Estes dados suportam a hipótese de movimentação de propágulos dos ninhos e, consequentemente das cepas pela atividade humana, pois existem ninhos próximos que possuem cepas relacionadas, sendo um indicativo de que as cepas próximas ocorreriam em localizações geográficas aproximadas. Além disso, a ocorrência de cepas relacionadas ocorrendo em ninhos adjacentes (que também possuem as mesmas COI) constitui uma evidência de transferência vertical das cepas, uma vez que cepas relacionadas estão ocorrendo em COI relacionadas.

Se o deslocamento de propágulos de ninhos ou mesmo de rainhas entre diferentes regiões do país for real, interferências no processo de reprodução podem ser ocasionadas por essas movimentações. Segundo Werren (1997) a incompatibilidade citoplasmática bidirecional ocorre quando uma fêmea e um macho possuem cepas diferentes de *Wolbachia*, que são incompatíveis, levando a ausência de progênie desse cruzamento. Se uma barreira reprodutiva ocorre entre populações, processos de especiação podem entrar em ação, com a participação da *Wolbachia* como o mais provável simbiote promovendo a especiação (BORDENSTEIN, 2003). Portanto, a ocorrência de cepas diferentes nessas novas introduções acarretaria em um cenário de populações alopátricas que quando se tornariam simpátricas (pela incompatibilidade promovida por apresentarem cepas diferentes) teriam a troca gênica diminuída ou impedida, impossibilitando a produção de progênie, causando isolamento reprodutivo e estabelecendo um cenário ideal para eventos de especiação acontecerem. Segundo Telschow et al. (2005) incompatibilidade citoplasmática causada pela *Wolbachia* deveria ser adicionada a lista de mecanismos que podem favorecer a especiação por reforço, devido ao rápido isolamento pré-copulatório que pode ser selecionado pela ocorrência da IC.

Porém, como colocado por Bordenstein (2003), para se ter mais avanços na compreensão e importância da *Wolbachia* induzir especiação é necessário ampliar o número de taxa estudados. Além disso, é necessário testar se a incompatibilidade existe entre populações de *Solenopsis* que possuem cepas de *Wolbachia* diferentes, pois segundo Bordenstein (2003), dados referentes a este tipo de incompatibilidade (*Wolbachia* que sejam reciprocamente incompatíveis) ainda são limitados.

A cepa ST29 se destacou na análise de network (Figura 4). Ficou disposta numa posição central, com os ramos das demais cepas dispersas a partir dela ou a ela relacionados

de alguma maneira. As análises filogenéticas também indicam um posicionamento ancestral da cepa ST29 em relação a algumas cepas definidas no presente trabalho (Figuras 5, 6, 7 e 8). Pode-se sugerir, em um cenário onde a transmissão seria na sua maior parte vertical, que a ST29 seria uma das cepas ancestrais daquelas que ocorrem em formigas da América do Sul, especialmente em *Solenopsis*. A ST29 ou alguma cepa ancestral a ela teria sido adquirida por linhagens ancestrais do gênero *Solenopsis* e o que se encontra na atualidade seria um conjunto de cepas derivadas da ancestral e outras teriam se mantido muito próximas a elas. Pode-se acrescentar que a adaptação da bactéria ao hospedeiro *Solenopsis* ajudaria na manutenção desta cepa, uma vez que a virulência da cepa pode estar relacionada com sua adaptação a fisiologia do hospedeiro, pois segundo Russel et al. (2009) *Wolbachia* parece ser pré-adaptada a infectar hospedeiros artrópodes relacionados pois estes compartilham fisiologias similares.

Considerando que a cepa ST29 está relacionada com diversos haplótipos de COI (Figura 8), isto seria um indicativo de que a infecção é antiga e já fixada nas populações analisadas, diferindo do que foi observado por Zhang Y. K. et al. (2013), onde duas cepas relacionadas com um mesmo haplótipo de COI do hospedeiro seria um indicativo de ser uma infecção recente e em processo de propagação. Sustentando esta hipótese, enfatiza-se que a maioria das espécies de *Solenopsis* são nativas da região Neotropical, com a América do Sul possuindo uma alta diversidade de espécies (PITTS et al., 2005), e a porção sul da América do Sul a provável região de origem do gênero e coincidentemente uma região onde os ninhos analisados possuíram na sua maior parte, infecção pela cepa ST29. Portanto, se a origem do gênero é apontada para esta região, a origem das cepas de *Wolbachia* presentes em *Solenopsis* parecem também possuir alguma relação com esta região, podendo ter divergido em conjunto com a divergência do gênero.

Entretanto, ressalta-se que padrões bastante distintos para as cepas de *Wolbachia* foram encontrados nas amostras de espécies de *Solenopsis*, o qual não é monofilético em todas as filogenias reconstruídas (Figuras 5, 7 e 8). Este padrão de distribuição polifilético seria um indicativo de diversas origens devido à história evolutiva da espécie de formiga (como proposto a partir da ST29), ou então um histórico relacionado com transmissão horizontal.

Portanto, apesar da ocorrência de correlação entre MLST e COI, sendo um indicativo de coevolução, porém não cofilogenias, parece que a história é mais complexa do que isso, provavelmente com transmissões tanto horizontais quanto verticais.

Algumas cepas são compartilhadas por diferentes espécies (Tabela 6, Figuras 5, 7 e 8), ou seja, a ST29 ocorrendo em *S. invicta* e *S. saevissima*, a ST315 ocorrendo em *S. invicta* e *S.*

meergates ou cepas próximas podendo esses resultados consistir em evidências de que antes da diferenciação das espécies de *Solenopsis*, a espécie ancestral portava uma cepa ancestral que foi transmitida durante a diversificação, mas também não se exclui a possibilidade de que as cepas seriam introduzidas em ocasiões separadas via transmissão horizontal. A transmissão horizontal provavelmente está envolvida tanto com a alimentação das espécies quanto com a relação com parasitóides, porém necessita-se ampliar os trabalhos com o gênero para se confirmar estas hipóteses, ampliando os estudos para os parasitóides e as fontes de alimento das espécies. Além disso, ninhos de localização geográfica próxima compartilhando as mesmas cepas (Tabela 6 e Figura 9) podem ser interpretados como indicativo de transmissão vertical, além do Teste de Mantel e algumas concordâncias pontuais nas árvores em espelho (Figura 8) indicarem a existência de correlação entre COI e MLST, um indicativo de coevolução entre o hospedeiro e a *Wolbachia*.

Assume-se que o modo de transmissão vertical seria o mais frequente, uma vez que a *Wolbachia* é transmitida para a prole através do citoplasma do ovo (WERREN, 1997) e também pelo fato de hospedeiros relacionados possuírem cepas relacionadas (BALDO et al., 2008; JIGGINS et al., 2002; KYEI-POKU et al., 2005; SCHILTHUIZEN; STOUTHAMER, 1997; VAN MEER et al., 1999). Porém, evidências obtidas através do gene *wsp* e padrões do DNA mitocondrial indicam que em *S. invicta* a história evolutiva da *Wolbachia* parece ser mais complexa, envolvendo múltiplas invasões ou eventos de transmissão horizontal (AHRENS; SHOEMAKER, 2005). Apesar de padrões encontrados com o gene *wsp* não serem confiáveis devido aos eventos de recombinação e a ineficácia do gene para se estudar a história evolutiva de *Wolbachia*, os resultados do presente trabalho com o *multilocus* corroboram a primeira evidência de Ahrens e Shoemaker (2005) obtida através do gene *wsp*, porém evidenciando o papel de ambas, transmissão vertical e horizontal na história evolutiva de *Wolbachia* em formigas do gênero *Solenopsis*. Além disso, este histórico de história evolutiva complexa, tanto com transmissões verticais quanto horizontais, foi sugerido recentemente em outras espécies, com o uso da metodologia do *multilocus*, como, por exemplo, em Baldo et al. (2008), Frost et al. (2010), Raychoudhury et al. (2009), Watanabe et al. (2012) e Zhang Y. K. et al. (2013) evidenciando a complexidade da relação *Wolbachia* x hospedeiro e a necessidade de outros estudos e aprofundamentos que levem à uma compreensão desta complicada relação.

Ressalta-se que apesar da indicação da recombinação estar ocorrendo (Tabela 9 e Figura 3) e em uma taxa um pouco maior que a mutação pontual ($r/m = 2.65$), algumas situações de mutações pontuais chamam atenção. Nas ST319 e ST321 ocorreu uma mutação

pontual no gene *hcpA* no nucleotídeo 62 e salienta-se que apesar das populações estarem geograficamente distantes (Santa Catarina e São Paulo respectivamente, Figura 9) essas STs infectam ninhos de uma mesma espécie (*S. saevissima*). Já as ST326 e ST327 possuem mutações pontuais no gene *gatB* nos nucleotídeos 8, 47, 54, 267, porém ocorrem em ninhos de localização geográfica próxima (ambas no estado de São Paulo). As ST317 e ST320 possuem mutações pontuais nos genes *hcpA* (nucleotídeos 6, 189, 442) e *fbpA* (nucleotídeos 58, 69 e 222) porém essas cepas foram encontradas em ninhos de espécies diferentes, respectivamente *S. invicta* e *S. saevissima*, com aqueles de *S. saevissima* com localização geográfica próxima. Nas ST 317 e ST318 as mutações ocorreram nos genes *fbpA* (nucleotídeo 58) e *hcpA* (nucleotídeos 123, 126, 150 e 168), com ocorrência numa mesma espécie (*S. invicta*) com localização geográfica relativamente distante. Portanto, destaca-se que assim como a recombinação, a mutação pontual também tem um papel importante na história evolutiva da *Wolbachia* em *Solenopsis*. Salunke et al. (2012) encontrou, em borboletas da Índia, mutações pontuais ocorrendo em hospedeiros relacionados mas também em hospedeiros de diferentes famílias e localidades e concluiu que a mutação pontual é um fator crucial, em conjunto com a recombinação, para a origem de novas STs de *Wolbachia*.

Em algumas amostras não se obteve sucesso na amplificação e por consequência sequenciar os genes que compõem o MLST (amostras E1818, E1822 e E1713), apesar de serem amostras previamente identificadas como infectadas por *Wolbachia* em Martins et al. (2012). A hipótese de um baixo rendimento pela eliminação natural da *Wolbachia* no hospedeiro por alta temperatura (REY et al., 2013; WENSELEERS et al., 2002) deve ser considerada, uma vez que altas temperaturas são experimentalmente utilizadas como um meio de eliminação de infecção por *Wolbachia* (JIA et al., 2009; PINTUREAU et al. 1999; TIMMERMANS; ELLERS, 2009; VAN OPIJNEN; BREEUWER, 1999).

Esta hipótese pode explicar os resultados das amostras E1818 e E1822, pois ambas são provenientes de coletas na cidade de Manaus (AM), onde a temperatura média anual é alta, podendo eliminar ou mesmo manter a infecção baixa o suficiente, dificultando sua detecção. Em *Wasmannia auropunctata*, Rey et al. (2013) encontraram evidências da perda natural de *Wolbachia* por calor em populações clonais que ocorrem em habitats com interferência humana e/ou seleção relaxada durante o processo de invasão. Da mesma maneira, Wenseleers et al. (2002) sugerem que a *Wolbachia* estaria sendo eliminada em operárias de *Formica truncorum* devido situações ambientais estressantes, como a alta temperatura. Portanto, existem evidências que sustentam que a *Wolbachia* pode estar sendo eliminada em algumas espécies de formigas, e a temperatura deve ser um provável determinante para esta perda.

Casos de baixa infecção já foram anteriormente registrados e analisados em piolhos (FLOATE et al., 2006; KYEI-POKU et al., 2005), em besouros (ARTHOFER et al., 2009a), em mocos-da-fruta (ARTHOFER et al., 2009b), porém, Shoemaker et al. (2003) não detectaram diferenças nos níveis de infecção entre rainhas e operárias em *Solenopsis invicta*, ou seja, sem evidências aparentes de perda de infecção. Os trabalhos que fizeram análises de detecção de níveis de infecção utilizaram-se da metodologia do *wsp*, e protocolos aplicáveis a baixas infecções com o uso do MLST ainda não foram estabelecidos (ARTHOFER et al., 2009a).

A metodologia do MLST demonstrou ser eficiente em análise de diversidade da *Wolbachia*, porém um novo nível de compreensão é necessário e deverá fazer parte de análises futuras que envolvem os simbioss, como por exemplo, explorar a transferência de segmentos do genoma da *Wolbachia* ao genoma do hospedeiro (DOUDOUNIS et al., 2012; HOTOPP et al., 2007; DUPLOUY et al., 2013; IOANNIDIS et al., 2013; KLASSON et al., 2009; KONDO et al., 2002; KUMAR et al., 2012; LE et al., 2012; McNULTY et al., 2010; McNULTY et al., 2012; McNULTY et al., 2013; NIKOH et al., 2008; WOOLFIT et al., 2009). Terá auxílio também de técnicas que permitem análise de genomas completos (GERTH et al., 2013; RICHARDSON et al., 2012; ELLEGAARD et al., 2013) extrapolando assim o conhecimento para um nível ainda mais intrincado e que oferecem possibilidades de estudos em larga escala. Portanto, espera-se um avanço na compreensão da complexa relação entre bactérias simbioss e seus hospedeiros, uma vez que equipamentos e técnicas modernos podem ter sua aplicação nos estudos da *Wolbachia*, permitindo uma melhor compreensão dos processos pelos quais a *Wolbachia* está sujeita e como ela pode interferir na vida dos insetos.

Considerações Finais

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta pesquisa acrescenta novas informações sobre a diversidade de *Wolbachia* em formigas do gênero *Solenopsis* e também para a ampliação das cepas registradas no banco de dados específico, o *Wolbachia* MLST database.

Os resultados encontrados ressaltam a complexa relação existente entre a *Wolbachia* e seus hospedeiros já amplamente registrados na literatura, e se destacam:

- i. O registro de 15 cepas anteriormente desconhecidas;
- ii. O registro de 11 novos alelos;
- iii. A relação filogenética entre as cepas encontradas apresenta um padrão polifilético, indicativo da complexidade da história evolutiva dessas cepas nas espécies analisadas;
- iv. Os padrões de transmissão de *Wolbachia* nas espécies de *Solenopsis* analisadas parecem ser tanto verticais quanto horizontais;
- v. Coevolução entre *Wolbachia* e hospedeiro devem estar acontecendo, porém não em padrão de cofilogenias;
- vi. Não há correlação geográfica entre as distribuições das cepas analisadas;
- vii. A diversidade de cepas detectadas com a metodologia do *multilocus* é maior que aquela encontrada anteriormente com o gene *wsp*;
- viii. Eventos de recombinação ocorreram entre as cepas analisadas, porém a mutação pontual também contribui para a diversificação das cepas;
- ix. Não existem cepas compartilhadas entre as formigas estudadas e aquelas de outros hospedeiros já analisados no Brasil.

Destaca-se a tendência de cepas de *Wolbachia* de formigas se agruparem entre aquelas de formigas do Novo Mundo e não Novo Mundo e discute-se a influência do papel do transporte de colônias de formigas na atual distribuição de cepas e a sua provável influência em processos de especiação e diversificação das espécies de formigas analisadas no Brasil.

Apesar do avanço diante do conhecimento sobre a presença de *Wolbachia* em *Solenopsis*, os resultados indicam que várias questões devem ser exploradas para se progredir na compreensão da história evolutiva da *Wolbachia* em Formicidae. Novas perguntas podem ser elaboradas para exploração futura, sendo esta a parte mais fascinante da ciência para um estudioso de seus mistérios. Têm-se, com a finalização desta tese, várias respostas, porém muitas novas perguntas para explorar e uma linha de pesquisa para se trabalhar por toda a

vida acadêmica. Pode-se esperar que novas metodologias, como análises de genomas completos tragam, num futuro próximo, novas perspectivas e novos conhecimentos acerca da complexa relação entre a *Wolbachia* e seus hospedeiros Formicidae.

Referências

REFERÊNCIAS

- AESCHILIMANN, J. P. Simultaneous occurrence of thelytoky and bisexuality in Hymenopteran species, and its implications for the biological control of pests. **Entomophaga**, v. 35, n. 1, p. 3–5. 1990.
- AHRENS, M. E.; ROSS, K. G.; SHOEMAKER, D. D. Phylogeographic structure of the fire ant *Solenopsis invicta* in its native south American range: roles of the natural barriers and habitat connectivity. **Evolution**, v. 59, n. 8, p. 1733–1743. 2005.
- AHRENS, M. E.; SHOEMAKER, D. Evolutionary history of *Wolbachia* infections in the fire ant *Solenopsis invicta*. **BMC Evolutionary Biology**, v. 5, p. 35. 2005.
- AIKAWA, T.; ANBUTSU, H.; NIKOH, N.; KIKUCHI, T.; SHIBATA, F.; FUKATSU, T. Longicorn beetle that vectors pinewood nematode carries many *Wolbachia* genes on an autosome. **Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Science**, v. 276, n. 1674, p. 3791–3798. 2009.
- ARTHOFER, W.; MARKUS, R.; DIMITRIOS, A.; CHRISTIAN, S. Evidence for low-titre infections in insect symbiosis: *Wolbachia* in the bark beetle *Pityogenes chalcographus* (Coleoptera, Scolytinae). **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 8, p. 1923–1933. 2009a.
- ARTHOFER, W.; RIEGLER, M.; SCHNEIDER, D.; KRAMMER, M.; MILLER, W. J.; STAUFFER, C. Hidden *Wolbachia* diversity in field populations of the European cherry fruit fly, *Rhagoletis cerasi* (Diptera, Tephritidae). **Molecular Ecology**, v. 18, n. 18, p. 3816–3830. 2009b.
- ATYAME, C. M.; PASTEUR, N.; DUMAS, E.; TORTOSA, P.; TANTELY, M. L.; POCQUET, N.; LICCIARDI, S.; BHEECARRY, A.; ZUMBO, B.; WEILL, M.; DURON, O. Cytoplasmic incompatibility as a means of controlling *Culex pipiens quinquefasciatus* mosquito in the islands of the South-Western Indian Ocean. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 12, p. 2011.
- AUGUSTINOS, A. A.; SANTOS-GARCIA D.; DIONYSSOPOULOU, E.; MOREIRA, M.; PAPAPANAGIOTOU, A.; SCARVELAKIS M.; DOUDOUMIS, V.; RAMOS, S.; AGUIAR, A. F.; BORGES, P. A. V.; KHADEM, M.; LATORRE, A.; TSIAMIS, G.; BOURTZIS, K. Detection and Characterization of *Wolbachia* Infections in Natural Populations of Aphids: Is the Hidden Diversity Fully Unraveled? **PLoS Genetics**, v. 6, n. 12, p. 1–11. 2011.
- BALDO, L.; AYOUB, N A.; HAYASHI, C. Y.; RUSSELL, J. A.; STAHLHUT, J. K.; WERREN, J. H. 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. **Molecular Ecology**, v. 17, p. 557–569. 2008.
- BALDO, L.; BORDENSTEIN, S.; WERNEGREEN, J. J.; WERREN, J. H. Widespread recombination throughout *Wolbachia* genomes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, n. 2, p. 437–449. 2006.

BALDO, L.; LO, N.; WERREN, J. H. Mosaic nature of the *Wolbachia* Surface Protein. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 15, p. 5406-5418. 2005.

BALDO, L.; WERRREN, J. H. Revisiting *Wolbachia* Supergroup Typing based on *wsp*: spurious lineages and discordance with MLST. **Current Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 81–87. 2007.

BANDELT, H-J.; FOSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n. 1, p. 37-48. 1999.

BANDI, C.; ANDERSON, T.; GENCHI, C. BLAXTER, M. Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. **Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Science**, v. 265, n. 1413, p. 2407-2413. 1998.

BEARD, C. B.; O'NEILL, S. L.; TESH, R. B.; RICHARDS, F. F.; AKSOY, S. Modification of Arthropod vector competence via symbiotic bacteria. **Parasitology Today**, v. 9, n. 5, p. 179–183. 1993.

BIAN, G.; XU, Y.; LU, P.; XIE, Y.; XI, Z. The Endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 4, p. 1-10. 2010.

BIVAND, R.; KEITT, T.; ROWLINGSON, B. **rgdal: Bindings for the Geospatial Data Abstraction Library**. R package version 0.8-11. <http://CRAN.R-project.org/package=rgdal>. 2013.

BORDENSTEIN, S. R. Symbiosis and the origin of species. In: BOURTZIZ, K.; MILLER, T. A. (Ed.). **Insects Symbiosis**. EUA: CRC Press. 2003.

BORDENSTEIN, S. R.; WERREN, J. H. Bidirectional incompatibility among divergent *Wolbachia* and incompatibility level differences among closely related *Wolbachia* in *Nasonia*. **Heredity**, v. 99, n. 3, p. 278–287. 2007.

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

BRAIG, H. R.; ZHOU, W.; DOBSON, S.; O'NEILL, S. L. Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia*. **The Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 9, p. 2373-2378. 1998.

BROWNLIE, J. C.; CASS, B. N.; RIEGLER, M.; WITSENBURG, J. J.; ITURBE-ORMAETXE, I.; MCGRAW, E. A.; O'NEILL, S. L. Evidence for metabolic provisioning by a common invertebrate endosymbiont, *Wolbachia pipientis*, during periods of nutritional stress. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 4, p.1-6. 2009.

BUCHNER, P. **Endosymbiosis of animals with plant microorganisms**. Nova York: Interscience Publishers. 1965.

CASIRAGHI, M.; BORDENSTEIN, S. R.; BALDO, L.; LO, N.; BENINATI, T.; WERNEGREN, J. J.; WERREN, J. H.; BANDI, C. Phylogeny of *Wolbachia pipientis* based on *gltA*, *groEL* and *ftsZ* gene sequences: clustering of arthropod and nematode symbionts in

the F supergroup, and evidence for further diversity in the *Wolbachia* tree. **Microbiology**, v. 151, p. 4015–4022. 2005.

CHAPUISAT, M.; KELLER, L. Testing kin selection with sex allocation data in eusocial Hymenoptera. **Heredity**, v. 82, n. 5, p. 473–478. 1999.

CHEN, X. A.; LI, S.; AKSOY, S. Concordant evolution of a symbiont with its host insect species: molecular phylogeny of genus *Glossina* and its bacteriome-associated endosymbiont, *Wigglesworthia glossinidia*. **Journal of Molecular Evolution**, v. 48, n. 1, p. 49–58. 1999.

COOK, J. M.; BUTCHER, R. D. J. The transmission and effects of *Wolbachia* bacteria in parasitoids. **Researches on Population Ecology**, v. 41, n. 1, p. 15–28. 1999.

CZARNETZKI, A. B.; TEBBE, C. C. Detection and phylogenetic analysis of *Wolbachia* in Collembola. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 35–44. 2004.

DEDEINE, F.; AHRENS, M.; CALCATERRA, L.; SHOEMAKER, D. D. Social parasitism in fire ants (*Solenopsis* spp.): a potential mechanism for interspecies transfer of *Wolbachia*. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 5, p. 1543–1548. 2005.

DIDELOT, X.; FALUSH, D. Inference of bacterial microevolution using multilocus sequence data. **Genetics**, v. 175, n. 3, p. 1251–1266. 2007.

DOBSON, S. L.; FOX, C. W.; JIGGINS, F. M. The effect of *Wolbachia* induced cytoplasmic incompatibility on host population size in natural and manipulated systems. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Science**, v. 269, n. 1490, p. 437–445. 2002.

DOUDOUMIS, V.; TSAMIS, G.; WAMWIRI, F.; BRELSFOARD, C.; ALAM, U.; AKSOY, E.; DALAPERAS, S.; ABD-ALLA, A.; OUMA, J.; TAKAC, P.; AKSOY, S.; BOURTZIS, K. Detection and characterization of *Wolbachia* infections in laboratory and natural populations of different species of tsetse flies (genus *Glossina*). **BMC Microbiology**, v. 12, p. 1–13. 2012.

DUPLOUY, A.; ITURBE-ORMAETXE, I.; BEATSON, S. A.; SZUBERT, J. M.; BROWNLIE, J. C.; McMENIMAN, C. J.; MCGRAW, E. A.; HURST, G. D.; CHARLAT, S.; O'NEILL, S. L.; WOOLFIT, M. Draft genome sequence of the male-killing *Wolbachia* strain *wBol1* reveals recent horizontal gene transfers from diverse sources. **BMC Genomics**, v. 14, n. 20, p. 1–13. 2013.

ELLEGAARD, K. M.; KLASSON, L.; NÄSLUND, K.; BOURTZIS, K.; ANDERSSON, S. G. E. Comparative genomics of *Wolbachia* and the bacterial species concept. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 4, p. 1–18. 2013.

ENIGL, M.; ZCHORI-FEIN, E.; SCHAUSBERGER, P. Negative evidence of *Wolbachia* in the predaceous mite *Phytoseiulus persimilis*. **Experimental & Applied Acarology**, v. 36, n. 4, p. 249–262. 2005.

FEIL, E. J.; LI, B. C.; AANENSEN, D. M.; HANAGE, W. P.; SPRATT, B. G. eBURST: Inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from Multilocus Sequence Typing data. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 5, p. 1518–1530. 2004.

FEIL, E. J.; SPRATT, B. G. Recombination and the population structures of bacterial pathogens. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, p. 561-590. 2001.

FELDHAAR, H. Bacterial symbionts as mediators of ecologically important traits of insect hosts. **Ecological Entomology**, v. 36, n. 5, p. 533-543. 2011.

FENN, K.; CONLON, C.; JONES, M.; QUAIL, M. A.; HOLROYD, N. E.; PARKHILL, J.; BLAXTER, M. Phylogenetic Relationships of the *Wolbachia* of Nematodes and Arthropods. **PLoS Pathogens**, v. 2, n. 10. 2006.

FLOATE, K. D.; KYEI-POKU, G. K.; COGHLIN, P. C. Overview and relevance of *Wolbachia* bacteria in biocontrol research. **Biocontrol Science and Technology**, v. 16, n. 8, p. 767-788. 2006.

FRENTIU, F. D.; ROBINSON, J.; YOUNG, P. R.; MCGRAW, E. A.; O'NEILL, S. L. *Wolbachia*-mediated resistance to dengue virus infection and death at the cellular level. **PLoS Pathogens**, v. 5 n. 10, p. 1-10. 2010.

FROST, C. L., FERNÁNDEZ-MARÍN, H., SMITH, J. E.; HUGHES, W. O. H. Multiple gains and losses of *Wolbachia* symbionts across a tribe of fungus-growing ants. **Molecular Ecology**, v. 19, n. 18, p. 4077-4085. 2010.

GERTH, M.; RÖTHE, J.; BLEIDORN, C. Tracing horizontal *Wolbachia* movements among bees (Anthophila): a combined approach using MLST data and host phylogeny. **Molecular Ecology**, v. 24, p. 6149-6162, 2013.

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

GORHAM, C. H.; FANG, Q. Q.; DURDEN, L. A. *Wolbachia* endosymbionts in fleas (Siphonaptera). **Journal of Parasitology**, v. 89, n.2, p. 283-289. 2003.

GUIDOLIN, A. S. **Diversidade genética de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Psyllidae) e caracterização molecular das linhagens de *Wolbachia* associadas.** 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências, Entomologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, São Paulo, Piracicaba. 2011.

GUIDOLIN, A. S.; CÔNSOLI, F. L. Molecular characterization of *Wolbachia* strains associated with the invasive asian citrus psyllid *Diaphorina citri* in Brazil. **Microbial Ecology**, v. 65, p. 475-486. 2013.

HAEGEMAN, A.; VANHOLME, B.; JACOB, J.; VANDEKERCKHOVE, T. T. M.; CLAEYS, M.; BORGONIE, G.; GHEYSEN, G. An endosymbiotic bacterium in a plant-parasitic nematode: Member of a new *Wolbachia* supergroup. **International Journal of Parasitology**, v. 39, n. 9, p. 1045-1054. 2009.

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

HEATH, B. D.; BUTCHER, R. D.; WHITFIELD, W. G.; HUBBARD, S. F. Horizontal transfer of *Wolbachia* between phylogenetically distant insect species by a naturally occurring mechanism. **Current Biology**, v. 9, n. 6, p. 313-316. 1999.

HEDGES, L. M.; BROWNLIE, J. C.; O'NEILL, S. L.; JOHNSON, K. N. *Wolbachia* and virus protection in insects. **Science**, v. 322, n. 5902, p. 702. 2008.

HENSCHAW, M. T.; KUNZMANN, N.; VANDERWOUDE, C.; SENETRA, M.; CROZIER, R. H. Population genetics and history of the introduced fire ant, *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae) in Australia. **Austral Journal of Entomology**, v. 44, n. 1, p. 37-44. 2005.

HERTIG, M.; WOLBACH, S. B. Studies on rickettsia-like microorganisms in insects. **The Journal of Medical Research**, v. 44, n. 3, p. 329-374. 1924.

HIGGINS, D. G.; BLEASBY, A. J.; FUCHS, R. Clustal V: Improved software for multiple sequence alignment. **Computer Applications in the Biosciences**, v. 8, n. 2, p. 189-191. 1992.

HILGENBOECKER, K.; HAMMERSTEIN, P.; SCHALATTMANN, P.; TELSCHOW, A.; WERREN, J. H. How many species are infected with *Wolbachia*? A statistical analyses of current data. **FEMS Microbiology Letters**, v. 281, n. 2, p. 215-220. 2008.

HOTOPP, J. C. D.; CLARK, M. E.; OLIVEIRA, D. C.; FOSTER, J. M.; FISCHER, P.; TORRES M. C. M.; GIEBEL, J. D.; KUMAR, N.; ISHMAEL, N.; WANG, S.; INGRAM, J.; NENE, R. V.; SHEPARD, J.; TOMKINS, J.; RICHARDS, S.; SPIRO, D. J.; GHEDIN, E.; SLATKO, B. E.; TETTELIN, H.; WERREN, J. H. Widespread lateral gene transfer from intracellular bacteria to multicellular eukaryotes. **Science**, v. 317, n. 5845, p. 1753-1756. 2007.

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. **Bioinformatics**, v. 17, p. 754-755. 2001.

HUIGENS, M. E.; DE ALMEIDA, R. P.; BOONS, P. A.; LUCK, R. F.; STOUTHAMER, R. Natural interspecific and intraspecific horizontal transfer of parthenogenesis-inducing *Wolbachia* in Trichogramma wasps. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Science**, v. 271, n. 1538, p. 509-515. 2004.

IOANNIDIS, P.; JOHNSTON, K. L.; RILEY, D. R.; KUMAR, N.; WHITE, J. R.; OLARTE, K. T.; OTT, S.; TALLON, L. J.; FOSTER, J. M.; TAYLOR, M. J.; HOTOPP, J. C. D. Extensively duplicated and transcriptionally active recent lateral gene transfer from a bacterial *Wolbachia* endosymbiont to its host filarial nematode *Brugia malayi*. **BMC Genomics**, v. 14, n. 639, p. 1-17. 2013.

ISHIKAWA, H. Insect Symbionts: an introduction. In: BOURTZIZ, K.; MILLER, T. A. (Ed.) **Insects Symbiosis**. EUA: CRC Press. 2003.

JEYAPRAKASH, A.; HOY, M. A. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: wsp sequences found in 76% of sixty-tree arthropods. **Insect Molecular Biology**, v. 9, n. 4, p. 393-405. 2000.

- JIA, F.X.; YANG, M. S.; YANG, W. J.; WANG, J. J. Influence of continuous high temperature conditions on *Wolbachia* infection frequency and the fitness of *Liposcelis tricolor* (Psocoptera: Liposcelidae). **Environmental Entomology**, v. 38, n. 5, p. 1365–1372. 2009.
- JIGGINS, F. M. The rate of recombination in *Wolbachia* bacteria. **Molecular Biology and Evolution**, v. 19, n. 9, p. 1640–1643. 2002.
- JIGGINS, F. M.; VON DER SCHULENBURG, J. H.; HURST, G. D.; MAJERUS, M. E. Recombination confounds interpretations of *Wolbachia* evolution. **Proceedings of the Royal Society of London B Biological Sciences**, v. 268, n. 1474, p. 1423–1427. 2001.
- JOLLEY, K. A.; CHAN, M.; MAIDEN, M. C. J. mlstdbNet – distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases. **BMC Bioinformatics**, v. 5, n. 86, p. 1-8. 2004.
- JOLLEY, K. A.; MAIDEN, M. C. J. BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. **BMC Bioinformatics**, v. 11, n. 595, p. 1-11. 2010.
- KELLER, L.; LIAUTARD, C.; REUTER, M.; BROWN, W. D.; SUNDSTRÖM, L.; CHAPUISAT, M. Sex ratio and *Wolbachia* infection in the *Formica exsecta*. **Heredity**, v. 87, n. 2, p. 227-233. 2001.
- KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, n. 2, p. 111-120. 1980.
- KITTAYAPONG, P.; JAMNONGLUK, W.; THIPAKSORN, A.; MILNE, J. R.; SINDHUSAKE, C. *Wolbachia* infection complexity among insects in the tropical rice-field community. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 4, p. 1049-60. 2003.
- KLASSON, L.; KAMBRIS, Z.; COOK, P. E.; WALKER, T.; SINKINS, S. P. Horizontal gene transfer between *Wolbachia* and the mosquito *Aedes aegypti*. **BMC Genomics**, v. 10, n. 33, p. 1-9. 2009.
- KONDO, N.; NIKOH, N.; IJICHI, N.; SHIMADA, M.; FUKATSU, T. Genome fragment of *Wolbachia* endosymbiont transferred to X chromosome of host insect. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 99, n. 22, p. 14280-14285. 2002.
- KUMAR, N.; CREASY, T.; SUN, Y.; FLOWERS, M.; TALLON, L. J.; HOTOPP, J. C. D. Efficient subtraction of insect rRNA prior to transcriptome analysis of *Wolbachia-Drosophila* lateral gene transfer. **BMC Research Notes**, v. 14, n. 5, p. 230. 2012.
- KYEI-POKU, G. K.; COLWELL, D. D.; COGHLIN, P.; BENKEL, B.; FLOATE, K. D. On the ubiquity and phylogeny of *Wolbachia* in lice. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 1, p. 285–294. 2005.
- LE, P. T.; RAMULU, H. G.; GUIJARRO, L.; PAGANINI, J.; GOURET, P.; CHABROL, O.; RAOULT, D.; PONTAROTTI, P. An automated approach for the identification of

horizontal gene transfers from complete genomes reveals the rhizome of Rickettsiales. **BMC Evolutionary Biology**, v. 12, n. 12, p. 243. 2012.

MAIDEN, M. C. J.; BYGRAVES, J. A.; FEIL, E.; MORELLI, G.; RUSSELL, J. E.; URWIN, R.; ZHANG, Q.; ZHOU, J.; ZURTH, K.; CAUGANT, D. A.; FEATHERS, I. M.; ACHTMAN, M.; SPRATT, B. G. *Multilocus* sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 95, n. 6, p. 3140–3145. 1998.

MALLOCH, G.; FENTON, B. Super-infections of *Wolbachia* in byturid beetles and evidence for genetic transfer between A and B super-groups of *Wolbachia*. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 2, p. 627–637. 2005.

MARTIN, D. P.; LEMEY, P.; LOTT, M.; MOULTON, V.; POSADA, D.; LEFEUVRE, P. RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. **Bioinformatics**, v. 26, n. 19, p. 2462–2463. 2010.

MARTÍNEZ, H.; TOLEDO, J.; LIEDO, P.; MATEOS, M. Survey of Heritable Endosymbionts in Southern Mexico Populations of the Fruit Fly Species *Anastrepha striata* and *A. ludens*. **Current Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 711-718. 2012.

MARTINS, C. **Análises moleculares das formigas lava-pés (*Solenopsis* spp.) (Hymenoptera: Formicinae) e da presença da endobactéria *Wolbachia***. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Biologia Celular e Molecular) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, UNESP, Campus Rio Claro, 2010.

MARTINS, C.; SOUZA, R. F.; BUENO, O. C. Molecular characterization of fire ants, *Solenopsis* spp., from Brazil based on analysis of mtDNA gene cytochrome oxidase I. **Journal of Insect Science**, v. 14, n. 50. 2014.

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

MCMENIMAN, C. J.; LANE, A. M.; FONG, A. W. C.; VORONIN, D. A.; ITURBE-ORMAETXE, I.; YAMADA, R.; MCGRAW, E. A.; O'NEILL, S. L. Host adaptation of a *Wolbachia* strain after long-term serial passage in mosquito cell lines. **Applied Environmental Microbiology**, v. 74 n. 22, p. 6963-6969. 2008.

McNULTY, S. N.; ABUBUCKER, S.; SIMON, G. M.; MITREVA, M.; McNULTY, N. P.; FISCHER, K.; CURTIS, K. C.; BRATTIG, N. W.; WEIL, G. J.; FISCHER, P. U. Transcriptomic and proteomic analyses of a *Wolbachia*-free filarial parasite provide evidence of trans-kingdom horizontal gene transfer. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. 1-12. 2012.

McNULTY, S. N.; FISCHER, K.; CURTIS, K. C.; WEIL, G. J.; BRATTIG, N. W.; FISCHER, P. U. Localization of *Wolbachia*-like gene transcripts and peptides in adult *Onchocerca flexuosa* worms indicates tissue specific expression. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 2, p. 1-13. 2013.

- McNULTY, S. N.; FOSTER, J. M.; MITREVA, M.; HOTOPP, J. C. D.; MARTIN, J.; FISCHER, K.; WU, B.; DAVIS, P. J.; KUMAR, S.; BRATTIG, N. W.; SLATKO, B. E.; WEIL, G. J.; FISCHER, P. U. Endosymbiont DNA in endobacteria-free filarial nematodes indicates ancient horizontal genetic transfer. **PLoS One**, v. 5, n. 6, p. 1-9. 2010.
- MORAN, N. A.; McCUTCHEON, J. P.; NAKABACHI, A. Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. **Annual Review of Genetics**, v. 42, p. 165-190. 2008.
- MOREIRA, L. A.; ITURBE-ORMAEXTE, I.; JEFFERY, J. A.; LU, G. J.; PYKE, A. T.; HEDGES, L. M.; ROCHA, B. C.; HALL-MENDELIN, S.; DAY, A.; RIEGLER, M.; HUGO, L. E.; JOHNSON, K. N.; KAY, B. H.; McGRAW, E. A.; van den HURK, A. F.; RYAN, P. A.; O'NEILL, S. L. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with Dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. **Cell**, v. 139, n. 7, p. 1268–1278. 2009.
- NEGRI, I.; FRANCHINI, A.; GONELLA, E.; DAFFONCHIO, D.; MAZZOGLIO, P. J.; MANDRIOLI, M.; ALMA, A. Unravelling the *Wolbachia* evolutionary role: the reprogramming of the host genomic imprinting. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Science**, v. 276, n. 1666, p. 2485-2491. 2009.
- NIKOH, N.; NAKABACHI, A. Aphids acquired symbiotic genes via lateral gene transfer. **BMC Biology**, v. 7, n. 12, p. 1-13. 2009.
- NIKOH, N.; TANAKA, K.; SHIBATA, F.; KONDO, N.; HIZUME, M.; SHIMADA, M.; FUKATSU, T. *Wolbachia* genome integrated in an insect chromosome: evolution and fate of laterally transferred endosymbiont genes. **Genome Research**, v. 18, n. 2, p. 272-280. 2008.
- NODA, H.; MIYOSHI, T.; ZHANG, Q.; WATANABE, K.; DENG, K.; HOSHIZAKI, S. *Wolbachia* infection shared among planthoppers (Homoptera: Delphacidae) and their endoparasite (Strepsiptera: Elenchidae): a probable case of interspecies transmission. **Molecular Ecology**, v. 10, n. 8, p. 2101–2106. 2001.
- NYLANDER, J. A. **A. MrModeltest v2**. Programa distribuído pelo autor. Evolutionary Biology Centre, Upssala University. 2004.
- OKSANEN, J.; BLANCHET, F. G.; KINDT, R.; LEGENDRE, P.; MINCHIN, P. R.; O'HARA, R. B.; SIMPSON, G. L.; SOLYMOS, P.; STEVENS, M. H. H.; Wagner, H. **vegan: Community Ecology Package**. R package version 2.0-9. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>. 2013.
- OSEI-POKU, J.; HAN, C.; MBOGO, C. M.; JIGGINS, F. M. Identification of *Wolbachia* strains in mosquito disease vectors. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. 1-7. 2012.
- PACHECO, J. A.; MACKAY, W. P. **The systematics and biology of the New World thief ants of the genus *Solenopsis* (Hymenoptera: Formicidae)**. Lewinston, Nova York, EUA: The Edwin Mellen Press. 2013.
- PADIDAM, M.; SAWYER, S.; FAUQUET, C. M. Possible emergence of new Gemini viruses by frequent recombination. **Virology**, v. 265, n. 2, p. 218 –225. 1999.

PAGE, R. D. M.; HOLMES, E. C. **Molecular Evolution: a phylogenetic approach**, Blackwell Publishing. 1998.

PARADIS, E.; CLAUDE, J.; STRIMMER, K. APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. **Bioinformatics**, v. 20, n. 2, p. 289-290. 2004.

PARASKEVOPOULOS, C.; BORDENSTEIN, S. R.; WERNEGREN, J. J.; WERREN, J. H.; BOURTZIS, K. Toward a *Wolbachia* Multilocus Sequence Typing System: discrimination of *Wolbachia* strains present in *Drosophila* species. **Current Microbiology**, v. 53, n. 5, p. 388-395. 2006.

PATROCK, R. J. W.; PORTER, S. D.; GILBERT, L. E.; FOLGARAIT, P. J. Distributional patterns of *Pseudacteon* associated with the *Solenopsis saevissima* complex in South America. **Journal of Insect Science**, v. 9, n. 60, p. 1-17. 2009.

PERROT-MINNOT, M. J.; WERREN J. H. *Wolbachia* infection and incompatibility dynamics in experimental selection lines. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 12, n. 2, p. 272–282. 1999.

PINTUREAU, B.; CHAPELLE, L.; DELOBEL, B. Effects of repeated thermic and antibiotic treatments on a *Trichogramma* (Hym., Trichogrammatidae) symbiont. **Journal of Applied Entomology**, v. 123, n. 8, p. 473-483. 1999.

PITTS, J. P. **A cladistic analysis of the *Solenopsis saevissima* species-group (Hymenoptera: Formicidae)**. 2002. Tese, PhD thesis (Doutorado em Filosofia) - , University of Georgia, EUA. 2002.

PITTS, J. P.; McHUGH, J. V.; ROSS, K. G. Cladistic analysis of the fire ants of the *Solenopsis saevissima* species-group (Hymenoptera: Formicidae). **Zoologica Scripta**, v. 34, n. 5, p. 493-505. 2005.

POINSOT, D.; MERCOT, H. *Wolbachia* injection from usual to naive host in *Drosophila simulans* Diptera: Drosophilidae. **European Journal of Entomology**, v. 98, n. 1, p. 25-30. 2001.

PREZOTTO, L. F. **Tipificação de linhagens de *Wolbachia* do complexo *Anastrepha fraterculus* (Díptera: Tephritidae) da região neotropical por análise de locos múltiplos**. 2012. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Evolutiva) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

R Core Team. R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>. 2013.

RAYCHOUDHURY, R.; BALDO, L.; OLIVEIRA, D. C. S. G.; WERREN, J. H. Modes of acquisition of *Wolbachia*: horizontal transfer, hybrid introgression, and codivergence in the *Nasonia species* complex. **Evolution**, v. 63, n. 1, p. 165-183. 2009.

REUTER, M.; KELLER, L. High Levels of multiple *Wolbachia* infection and recombination in the ant *Formica exsecta*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 20, n. 5, p. 748–753. 2003.

- REUTER, M.; PEDERSEN, J. S.; KELLER, L. Loss of *Wolbachia* infection during colonisation in the invasive Argentine ant *Linepithema humile*. **Heredity**, v. 94, n. 3, p. 364–369. 2005.
- REY, O.; ESTOUP, A.; FACON, B.; LOISEAU, A.; AEBI, A.; DURON, O.; VAVRE, F.; FAUCAUD, J. Distribution of endosymbiotic reproductive manipulators reflects invasion process and not reproductive system polymorphism in the little fire ant *Wasmannia auropunctata*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. 1-11. 2013.
- RICHARDSON, M. F.; WEINERT, L. A.; WELCH, J. J.; LINHEIRO, R. S.; MAGWIRE, M. M.; JIGGINS, F. M.; BERGMAN, C. M. Population genomics of the *Wolbachia* endosymbiont in *Drosophila melanogaster*. **PLoS Genetics**, v. 8, n. 12, p. 1-16. 2012.
- RIEGLER, M.; CHARLAT, S.; STAUFFER, C.; MERÇOT, H. *Wolbachia* Transfer from *Rhagoletis cerasi* to *Drosophila simulans*: investigating the outcomes of host-symbiont coevolution. **Applied Environmental Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 273-279. 2004.
- RIGAUD, T.; PENNINGS, P. S.; JUCHAULT, P. *Wolbachia* bacteria effects after experimental interspecific transfers in terrestrial isopods. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 77, n. 4, p. 251-257. 2001.
- ROS, V. I. D.; FLEMING, V. M.; FEIL, E. J.; BREEUWER, J. A. J. How diverse is the genus *Wolbachia*? Multiple-gene sequencing reveals a putatively new *Wolbachia* supergroup recovered from spider mites (Acari: Tetranychidae). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 4, p. 1036-1043. 2009.
- ROSS, K. G. e SHOEMAKER, D. D. Nuclear and mitochondrial genetic structure in two social forms of the fire ant *Solenopsis invicta*: insights into transitions to an alternate social organization. **Heredity**, v. 78, p. 590-602. 1997.
- ROWLEY, S. M.; RAVEN, R. J.; MCGRAW, E. A. *Wolbachia pipientis* in Australian spiders. **Current Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 208-214. 2004.
- ROZAS, J.; SÁNCHEZ-DELBARRIO, J. C.; MESSEGUER, X.; ROZAS, R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics**, v. 19, n. 18, p. 2496-97. 2003.
- RUSSEL, J. A. The ants (Hymenoptera: Formicidae) are unique and enigmatic hosts of prevalent *Wolbachia* (Alphaproteobacteria) symbionts. **Myrmecological News**, v. 16, p. 7-23. 2012.
- RUSSELL, J. A.; GOLDMAN-HUERTAS, B.; MOREAU, C. S.; BALDO, L.; STAHLHUT, J. K.; WERREN, J. H.; PIERCE, N. E. Specialization and geographic isolation among *Wolbachia* symbionts from ants and lycaenid butterflies. **Evolution**, v. 63, n. 3, p. 624–640. 2009.
- SALUNKE, B. K.; SALUNKHE, R. C.; DHOTRE, D. P.; WALUJKAR, S. A.; KHANDAGALE, A. B.; CHAUDHARI, R.; CHANDODE, R. K.; GHATE, H. V.; PATOLE, M. S.; WERREN, J. H.; SHOUCHE, Y. S. Determination of *Wolbachia* diversity in

butterflies from Western ghats, India, by a multigene approach. **Applied Environmental Microbiology**, v. 78, n. 12, p. 4458-67. 2012.

SARIDAKI, A.; BOURTZIS, K. *Wolbachia*: more than just a bug in insects genitals. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 67-72. 2010.

SCHILTHUIZEN, M.; STOUTHAMER, R. Horizontal transmission of parthenogenesis-inducing microbes in *Trichogramma* wasps. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 264, n. 1380, p. 361-366. 1997.

SHOEMAKER, D. D.; AHRENS, M. E.; ROSS, K. G. Molecular phylogeny of the fire ants of the *Solenopsis saevissima* species-group based on mtDNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 38, n. 1, p. 200-215. 2006.

SHOEMAKER, D. D.; AHRENS, M.; SHEILL, L.; MESCHER, M.; KELLER, L.; ROSS, K. G. Distribution and prevalence of *Wolbachia* infections in native populations of the fire ant *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). **Population Ecology**, v. 32, n. 6, p. 1329-1336. 2003a.

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

SHOEMAKER, D. D.; ROSS, K. G.; KELLER, L.; VARGO, E. L.; WERREN, J. H. *Wolbachia* infections in native and introduced populations of the fire ants (*Solenopsis* spp.). **Insect Molecular Biology**, v. 9, n. 6, p. 661-673. 2000.

SINTUPACHEE, S.; MILNE, J. R.; POONCHAISRI, S.; BAIMAI, V.; KITTAYAPONG, P. Closely related *Wolbachia* strains within the pumpkin arthropod community and the potential for horizontal transmission via the plant. **Microbial Ecology**, v. 51, n. 3, p. 294-301. 2006.

SMITH, J. M. Analyzing the mosaic structure of genes. **Journal of Molecular Evolution**, v. 34, n. 2, p. 126-129. 1992.

SMITH, M. A.; BERTRAND, C.; CROSBY, K.; EVELEIGH, E. S.; FERNANDEZ-TRIANA, J.; FISHER, B. L.; GIBBS, J.; HAJIBABAEI, M.; HALLWACHS, W.; HIND, K.; HRCEK, J.; HUANG, D. W.; JANDA, M.; JANZEN, D. H.; LI, Y.; MILLER, S. E.; PACKER, L.; QUICKE, D.; RATNASINGHAM, S.; RODRIGUEZ, J.; ROUGERIE, R.; SHAW, M. R.; SHEFFIELD, C.; STAHLHUT, J. K.; STEINKE, D.; WHITFIELD, J.; WOOD, M.; ZHOU, X. *Wolbachia* and DNA Barcoding Insects: Patterns, Potential, and Problems. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. 1-12. 2012.

SOUZA, R. F. **Caracterização de populações genéticas de *Solenopsis invicta* através de marcadores moleculares microssatélites: correlação de similaridade entre populações hospedeiras e endossimbiose**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Biologia Celular e Molecular) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, UNESP, Campus Rio Claro, 2011.

SOUZA, R. F. de; RAMALHO, J. D. S.; MORINI, M. S. C.; WOLFF, J. L. C.; ARAÚJO, R. C.; MASCARA, D. Identification and characterization of *Wolbachia* in *Solenopsis saevissima*

fire ant (Hymenoptera: Formicidae) in southeastern Brazil. **Current Microbiology**, v. 58, n. 3, p. 189-194. 2009.

Species Mapper. Disponível em: <<http://splink.cria.org.br/mapper?criaLANG=en>>. Acessado em 20 de janeiro de 2014.

STAHLHUT, J. K., DESJARDINS, C. A., CLARK, M. E., BALDO, L., RUSSELL, J. A., WERREN, J. H. and JAENIKE, J. The mushroom habitat as an ecological arena for global exchange of *Wolbachia*. **Molecular Ecology**, v. 19, p. 1940–1952. 2010.

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

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

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

TEIXEIRA, L.; FERREIRA, A.; ASHBURNER, M. The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. **PLoS Biology**, v. 6, n. 12, p. 2753-2763. 2008.

TELSCHOW, A.; HAMMERSTEIN, P.; WERREN, J. H. The effect of *Wolbachia* versus genetic incompatibilities on reinforcement and speciation. **Evolution**, v. 59, n. 8, p. 1607–1619. 2005.

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

TIMMERMANS, M.; ELLERS, J. *Wolbachia* endosymbiont is essential for egg hatching in a parthenogenetic arthropod. **Evolutionary Ecology**, v. 23, n. 6, p. 931–942. 2009.

TRAGER, J. C. A revision of the fire ants, *Solenopsis geminata* group (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae). **Journal of the New York Entomological Society**, v. 99, n. 2, p. 141-198. 1991.

TSAGKARAKOU, A.; MOUTON, L.; KRISTOFFERSEN, J.B.; DOKIANAKIS, E.; GRISPOU, M.; BOURTZIS, K. Population genetic structure and secondary endosymbionts of *Q Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) from Greece. **Bulletin of Entomological Research**, v. 102, n. 3, p. 353-365. 2012.

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

TSUTSUI, N. D.; KAUPPINEN, S. N.; OYAFUSO, A. F.; GROSBERG, R. K. The distribution and evolutionary history of *Wolbachia* infection in native and introduced populations of the invasive argentine ant (*Linepithema humile*). **Molecular Ecology**, v. 12, n. 11, p. 3057–3068. 2003.

URWIN, R.; MAIDEN, M. C. J. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. **TRENDS in Microbiology**, v.11, n. 10, p. 479-487. 2003.

VAN BORM, S.; WENSELEERS, T.; BILLEN, J.; BOOMSMA, J. J. Cloning and sequencing of *wsp* encoding gene fragments reveals a diversity of co-infecting *Wolbachia* strains in *Acromyrmex leafcutter* ants. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 26, n. 1, p. 102-109. 2003.

VAN MEER, M. M.; STOUTHAMER, R. Cross-order transfer of *Wolbachia* from *Muscidifurax uniraptor* (Hymenoptera: Pteromalidae) to *Drosophila simulans* (Diptera: Drosophilidae). **Heredity (Edinb)**, v. 82, n. 2, p. 163-169. 1999.

VAN MEER, M. M.; WITTEVELDT, J.; STOUTHAMER, R. Phylogeny of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* based on the *wsp* gene. **Insect Molecular Biology**, v. 8, n. 3, p. 399-408. 1999.

VAN OPIJNEN, T.; BREEUWER, J. A. High temperatures eliminate *Wolbachia*, a cytoplasmic incompatibility inducing endosymbiont, from the two-spotted spider mite. **Experimental and Applied Acarology**, v. 23, n. 11, p. 871-81. 1999.

VANDEKERCKHOVE, T. T.; WATTEYNE, S.; WILLEMS, A.; SWINGS, J. G.; MERTENS J.; GILLIS, M. Phylogenetic analysis of the 16S rDNA of the cytoplasmic bacterium *Wolbachia* from the novel host *Folsomia candida* (Hexapoda, Collembola) and its implications for wolbachial taxonomy. **FEMS Microbiology Letters**, v. 180, n. 2, p. 279-286. 1999.

VAVRE, F.; FLEURY, F.; LEPETIT, D.; FOUILLET, P.; BOULETREAU, M. Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host–parasitoid associations. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n. 12, p. 1711–1723. 1999.

VILJAKAINEN, L.; REUTER, M.; PAMILO, P. *Wolbachia* transmission dynamics in *Formica* wood ants. **BMC Evolutionary Biology**, v. 8, n. 55, p. 1-8. 2008.

VOS, M.; DIDELOT, X. A comparison of homologous recombination rates in bacteria and archaea. **International Society for Microbial Ecology**, v. 3, n. 2, p. 199-208. 2009.

WATANABE, M.; TAGAMI, Y.; MIURA, K.; KAGEYAMA, D.; STOUTHAMER, R. Distribution patterns of *Wolbachia* endosymbionts in the closely related flower bugs of the genus *Orius*: implications for coevolution and horizontal transfer. **Microbial Ecology**, v. 64, n. 2, p. 537-545. 2012.

WENSELEERS, T.; ITO, F.; VAN BORM, S.; HUYBRECHTS, R.; VOLCKAERT, F. BOLLEN, J. Widespread occurrence of the microorganism *Wolbachia* in ants. **Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Science**, v. 265, n. 1404, p. 1447-52. 1998.

WENSELEERS, T.; SUNDSTRÖM, L.; BILLEN, J. Deleterious *Wolbachia* in the ant *Formica truncorum*. **Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Science**, v. 269, n. 1491, p. 623-629. 2002.

WERREN, J. H. Biology of *Wolbachia*. **Annual Review of Entomology**, v. 42, p. 587-609. 1997.

WERREN, J. H.; BARTOS, J. D. Recombination in *Wolbachia*. **Current Biology**, v. 11, n. 6, p. 431-435. 2001.

WERREN, J. H.; ZHANG, W.; GUO, L. R. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 261, n. 1360, p. 55– 71. 1995.

WHITAKER, R. J. Allopatric origins of microbial species. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Science**, v. 361, n. 1475, p. 1975–1984. 2006.

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

Wolbachia MLST database. Disponível em: <[http:// pubmlst.org/wolbachia/](http://pubmlst.org/wolbachia/)>
Acessado em: Janeiro de 2013.

WOOLFIT, M.; ITURBE-ORMAETXE, I.; MCGRAW, E. A.; O'NEILL, S. L. An ancient horizontal gene transfer between mosquito and the endosymbiotic bacterium *Wolbachia pipientis*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 26, n. 2, p. 367-374. 2009.

WU, K.; HOY, M. A. Extended starvation reduced and eliminated *Wolbachia*, but not *Cardinium*, from *Metaseiulus occidentalis* females (Acari: Phytoseiidae): a need to reassess *Wolbachia*'s status in this predatory mite? **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 109, n. 1, p. 20-26. 2012.

YEN, J.; COULOURIS, G.; ZARETSKAYA, I.; CUTCUTACHE, I.; ROZEN, S.; MADDEN, T. L. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Informatics**, v. 13, n. 134. 2012.

YIJUAN, X.; YOUNGYUE, L.; LING, Z.; GUANGWEN, L. Foraging behavior and recruitment of red imported fire ant *Solenopsis invicta* Buren in typical habitats of South China. **Acta Ecologica Sinica**, v. 27, n. 3, p. 855-860. 2007.

YUN, Y.; LEI, C.; PENG, Y.; LIU, F.; CHEN, J.; CHEN, L. *Wolbachia* Strains Typing in Different Geographic Population Spider, *Hylyphantes graminicola* (Linyphiidae). **Current Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 139–145. 2011.

ZABALOU, S.; APOSTOLAKI, A.; LIVADARAS, I.; FRANZ, G.; ROBINSON, A. S.; SAVAKIS, C.; BOURTZIS, K. Incompatible insect technique: incompatible males from a *Ceratitis capitata* genetic sexing strain. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 132, n. 3, p. 232–240. 2009.

ZABALOU, S.; RIEGLER, M.; THEODORAKOPOULOU, M.; STAUFFER, C.; SAVAKIS, C.; BOURTZIS, K. *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility as a means for insect pest population control. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 101, n. 42, p. 15042–15045. 2004.

ZEH, D. W.; ZEH, J. A.; BONILLA, M. M. *Wolbachia*, sex ratio bias and apparent male killing in the harlequin beetle riding pseudoscorpion. **Heredity**, v. 95, n. 1, p. 41–49. 2005.

ZHANG, K. J.; HAN, X.; HONG, X. Y. Various infection status and molecular evidence for horizontal transmission and recombination of *Wolbachia* and *Cardinium* among rice planthoppers and related species. **Insect Science**, v. 20, n. 3, p. 329–344. 2013.

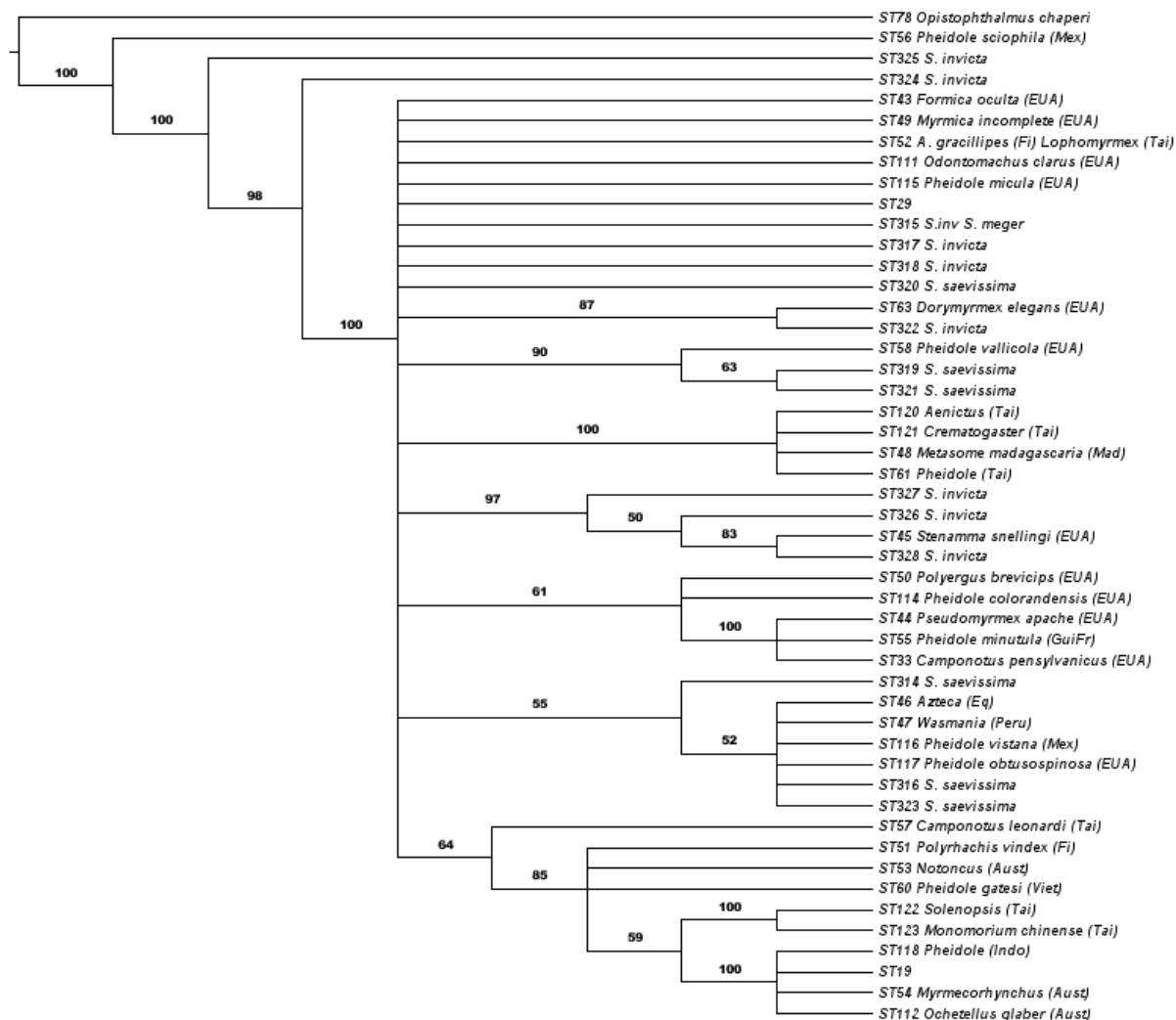
ZHANG, Y. K.; ZHANG, K. J.; SUN, J. T.; YANG, X. M.; GE, C.; HONG, X. Y. Diversity of *Wolbachia* in Natural Populations of Spider Mites (genus *Tetranychus*): Evidence for Complex Infection History and Disequilibrium Distribution. **Microbial Ecology**, v. 65, n. 3, p. 731-739. 2013.

ZHOU, W.; ROUSSET, F.; O'NEILL S. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. **Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Science**, v. 265, n. 1395, p. 509-515. 1998.

ZUG, R.; HAMMERSTEIN, P. Still a Host of Hosts for *Wolbachia*: Analysis of Recent Data Suggests That 40% of Terrestrial Arthropod Species Are Infected. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. 1-3. 2012.

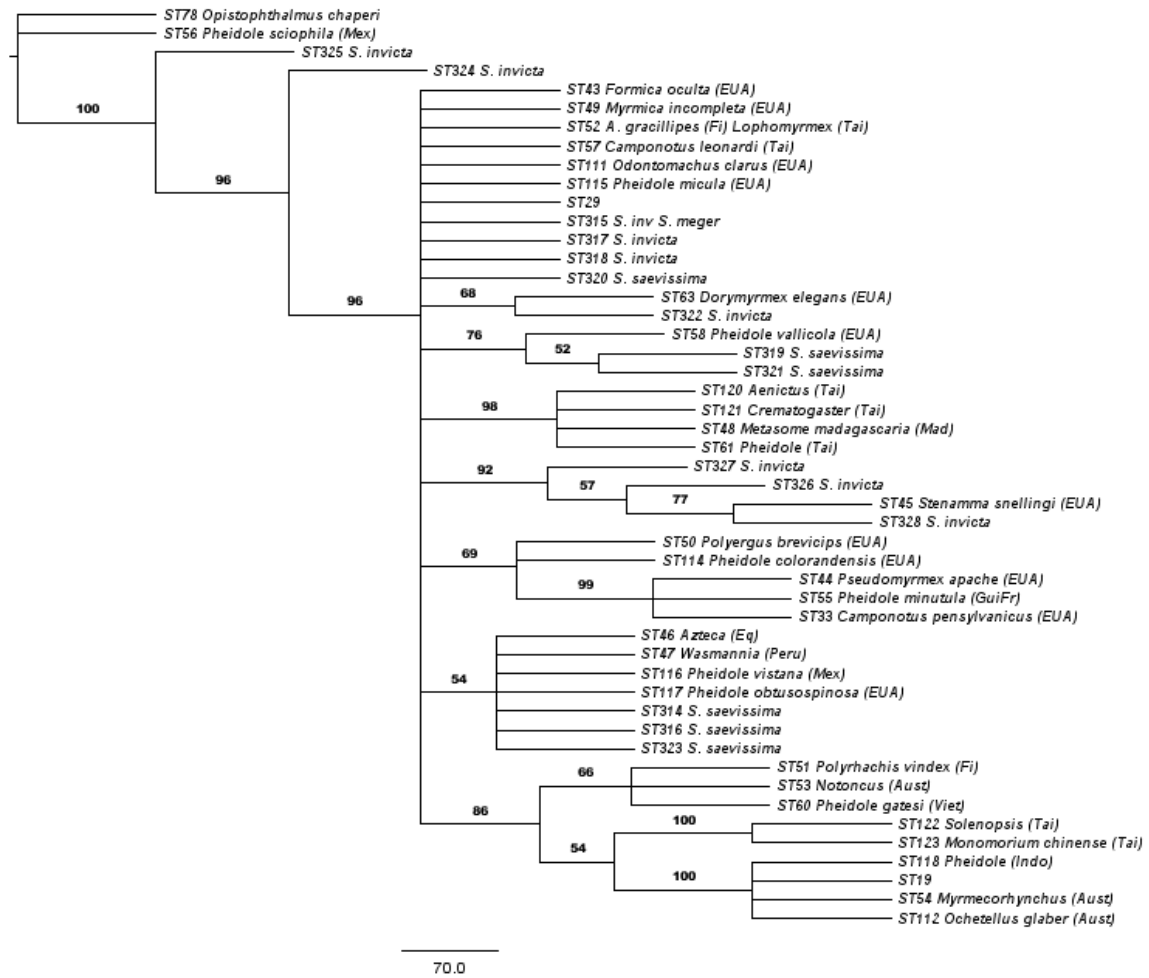
Apêndice

APÊNDICE 1 - Análise filogenética de máxima parcimônia.



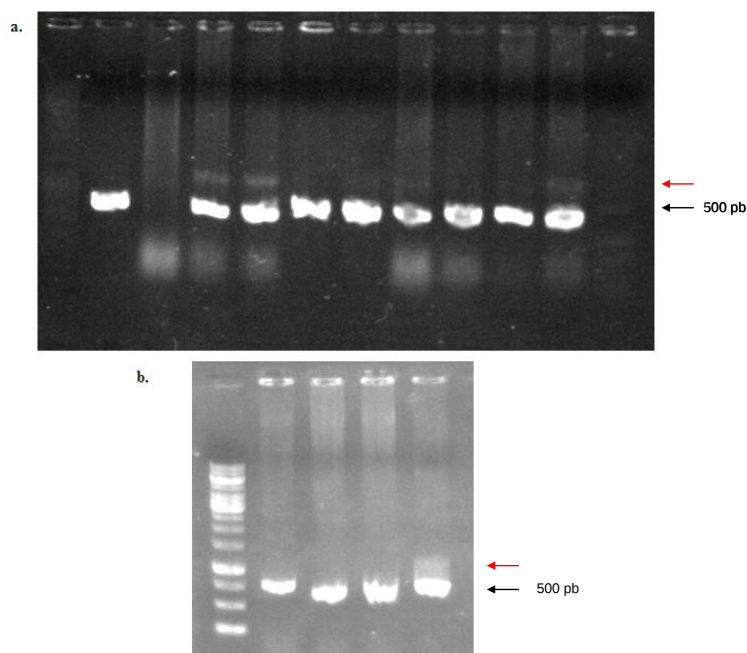
Os valores de bootstrap estão ilustrados acima dos ramos.

APÊNDICE 2 - Análise filogenética de máxima verossimilhança.



Os valores de bootstrap estão indicados acima dos ramos.

APÊNDICE 3 - Géis ilustrativos da detecção de bandas maiores que as esperadas para amplificações do gene *ftsZ*.



O tamanho esperado das bandas é de cerca de 524 pb, representada pelas bandas com maior intensidade. As bandas inespecíficas possuem em torno de 700 pb. Os tamanhos das bandas não correspondem aos do *ladder*, pois o agente fluorescente utilizado (GelRedTM Uniscience) pode causar atraso na migração, segundo informações do fabricante.

